

ACCIÓN PROLIFERATIVA Y PROPIEDAD ANTICANCEROSA DEL EXTRACTO
DE LAS HOJAS DE *CAMELLIA SINENSIS* (TÉ VERDE).

VALENTINA MURILLO VALENCIA

UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACEUTICA
SANTIAGO DE CALI
2015

ACCIÓN PROLIFERATIVA Y PROPIEDAD ANTICANCEROSA DE LAS HOJAS
DE *CAMELLIA SINENSIS* (TÉ VERDE).

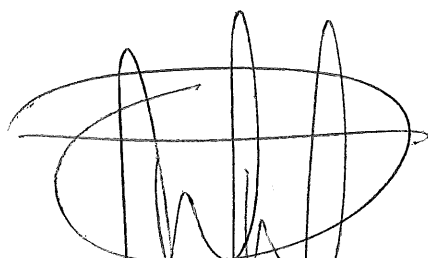
VALENTINA MURILLO VALENCIA

PROYECTO DE GRADO

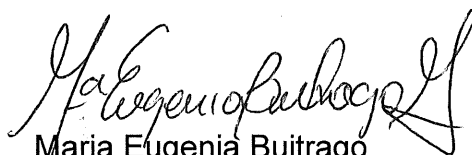
Dra. ALEJANDRA JERÉZ
TUTOR

UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROYECTO DE GRADO I
SANTIAGO DE CALI
2015

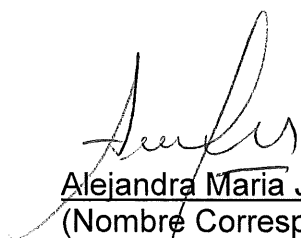
APROBADO POR:



Andrés Felipe Dávalos
(Nombre Correspondiente)
Evaluador Externo.



María Eugenia Buitrago
(Nombre Correspondiente)
Evaluador Externo.



Alejandra María Jerez
(Nombre Correspondiente)
Director del Proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

Contenido	
2. RESUMEN	6
2. ABSTRACT	8
3. INTRODUCCIÓN	10
4. DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO.....	13
4.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
4.2 MARCO TEÓRICO.....	15
4.3 OBJETIVOS	23
4.3.1 Objetivo General	23
4.3.2 Objetivos Específicos.....	23
4.4 METODOLOGÍA.....	24
4.4.1 Colección del material vegetal.....	22
4.4.2 Obtención del extracto.....	24
4.4.3 Identificación de catequinas y semicuantificación de epigallocatequina galato	24
4.4.4 Cultivo celular.....	25
4.4.5 Descongelación de células:.....	25
4.4.6 Tripsinización:	26
4.4.7 Cuantificación de células.....	26
4.4.8 Evaluación del extracto sobre células HeLa.....	27
4.4.9 Citotoxicidad: Ensayo con artemia Salina	27
4.5 RESULTADOS	29
4.6 DISCUSIÓN	34
4.7 CONCLUSIONES.....	42
4.8 RECOMENDACIONES	43
4.9 BIBLIOGRAFÍA	44

TABLA DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1- Configuración molecular de los polifenoles del té	11
Ilustración 2- Características generales del té verde	17
Ilustración 3- Estructura química del EGCG	19
Ilustración 4- Imagen de Artemia salina y su clasificación científica	22
Ilustración 5-Cromatografía en capa fina (TLC) del extracto de té verde (camellia sinensis) en proporciones 3/10 (A), 4/10 (B), 5/10 (C), 6/10 (D), 7/10 (E). Fase móvil: 2:2:1 acetona: tolueno: ácido fórmico. Revelador: Fast blue Salt B.....	29
Ilustración 6 - Cromatografía en capa fina (TLC) del extracto de té verde (camellia sinensis) en proporciones 3/10 (A), 4/10 (B), 5/10 (C), 6/10 (D), 7/10 (E). Fase móvil: 2:2:1 acetona: tolueno: ácido fórmico. Revelador: Fast blue Salt B.....	30
Ilustración 7- Cromatografía en capa fina de alto rendimiento del estándar de epigallocatequina galato y del extracto de las hojas de té verde (camellia sinensis) bajo cámara UV. Fase móvil: 2:2:1 acetona: tolueno: ácido fórmico. Estándar: (A) 8µg, (B) 4 µg, (C) 2 µg (D) 1 µg, (E) 0.5 µg y (F) 0.25 µg. Muestra: (G) 4/10, (H) 5/10, (I) 6/10. Revelador: Fast blue Salt B.	30
Ilustración 8 - (A) Placa para siembra de 24 pozos con 50.000 células hela por pozo. Previo a incubación por 24 horas a 37 °C Y 5% de humedad relativa. (B) Montaje de observación al microscopio de las células Hela posterior al día de incubación para confirmar adhesión.	32
Ilustración 9- Placa de cultivo de 24 pozos con 50.000 células Hela por pozo y el extracto de té verde en concentraciones de 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%. Adicionalmente, 3 pozos control (solo células Hela) y 3 pozos con cisplatino a una concentración de 100 µM.....	32
Ilustración 10- Prueba de citotoxicidad. (A) Placa de 24 pozos con 10 larvas de artemia salina en cada uno y extracto de té verde en concentraciones de 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,587%, 0,795%. Adicionalmente 3 pozos control (solo larvas de artemia salina).....	33
Ilustración 11- Curva de calibración de 6 puntos con un coeficiente de correlación, R2 = 0,9592. Esta curva esta expresada en términos de área bajo la curva contra concentración de EGCG.	33
Ilustración 12- (a) Huella dactilar del té verde. (A) Flavonoides, (B) alcaloides, (C) amino ácidos, (D) polifenoles. Tomado de: high performance thin-layer chromatography for the analysis of medicinal plants. (b) TLC realizado con el extracto de té verde.	34
Ilustración 13- Epimerización de las catequinas	36
Ilustración 14- Efecto de los polifenoles del té verde sobre la viabilidad celular mediante la utilización del azul de tripano. Tomado de: Growth inhibitory effect of green tea extract and (-)-epigallocatechin in Ehrlich ascites tumor cells involves a cellular thiol-dependent activation of mitogenic-activated protein kinases. (2001).38	38

TABLA DE ABREVIATURAS

SIGLA	DEFINICIÓN
EGCG	Epigallocatequina galato
ECG	Epicatequina-galato
EGC	Epigallocatequina
EC	Epicatequina
DNTMs	DNA metil transferasas
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol), bromuro protagonista en ensayo de citotoxicidad y viabilidad.
ATP	Adenosín trifosfato
LDH	Lactato deshidrogenasa, enzima protagonista en prueba de citotoxicidad.
TLC	Cromatografía en capa fina
HPTLC	Cromatografía en capa fina de alto rendimiento
CHO	Células sanas, provenientes de ovarios de Hámster Chino. (<i>Cricetulus griseus</i>)
HeLa	Células cancerígenas, línea celular proveniente de Henrietta Lacks (1951)

2. RESUMEN

El aumento del cáncer alrededor del mundo entero se ha convertido en un gran obstáculo para el bienestar de la humanidad. A pesar de la existencia de múltiples tratamientos, siguen siendo muchos los que pierden la batalla contra la compleja enfermedad; no solo por la reincidencia o la metástasis que frecuentemente conlleva el cáncer sino además por la desigualdad en el control y la atención de la misma entre las diferentes clases sociales. Concretamente, “para el año 2025 casi el 80 % del aumento en la cantidad total de muertes por cáncer se producirá en las regiones menos desarrolladas o de menores recursos”. Es por esto que la investigación de alternativas más asequibles es de gran importancia.

La inclusión de agentes terapéuticos a la práctica clínica y el desarrollo científico de nuevas opciones terapéuticas en la historia médica, han tenido inicio basándose en productos de origen natural. Aunque los beneficios para la salud que ha otorgado el té verde han sido conocidos por cientos de años, principalmente en la cultura oriental, estudios realizados en las décadas recientes han arrojado resultados que muestran que la EGCG (Epigallocatequina Galato: Principal compuesto activo del té verde) ha probado ser muy promisorio en diferentes campos y para algunos tipos de cáncer.

Es bien conocido que las terapias de elección en el tratamiento del cáncer están asociadas en su mayoría a una gran cantidad de efectos adversos que terminan por deteriorar sistemas que estaban sanos al iniciar la administración de los mismos. En este sentido, los tipos de cánceres el que se centra este proyecto (oral y bucofaringeo), genera en los pacientes úlceras como consecuencia de las sesiones de radioterapia y quimioterapia, que no solo son muy dolorosas e incómodas para quienes las padecen, sino que además son un medio ideal para el desarrollo de infecciones.

Para determinar las propiedades del té verde en esta patología se realizaron estudios in vitro que permitieron evaluar su actividad cancerígena sobre células Hela en porcentajes del 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25% y 3,187% se observó a las 12 y 24 horas. Del mismo modo y simultáneamente, se realizó el protocolo sobre células normales (fibroblastos) para analizar, si por el contrario, el extracto poseía propiedades proliferativas o cicatrizantes. (Adicionalmente, se evaluó sobre los cultivos el cisplatino, un medicamento con citotoxicidad conocida como un agente control). La prueba no arrojó resultados válidos que permitan concluir que el té verde tiene propiedades anticancerígenas como se esperaba.

Se realizó una prueba de citotoxicidad con artemia salina y se evaluó sobre las larvas el extracto en concentraciones de 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125%, 1.563%, 0.781%. A las 24 horas se observaron las larvas bajo el microscopio y se encontró el 100% de las larvas con extracto muertas.

Se pretende administrar el extracto a pacientes voluntarios con cáncer oral y bucofaríngeo tratados por la Doctora Martha Zambrano, Médico oncóloga de la Fundación Valle del Lili. Sin embargo, ante la falta de resultados concluyentes será necesario realizar nuevas pruebas replanteando algunos.

Palabras claves: *Camellia sinensis*, Epigallocatequinas, cáncer, estudios in vitro, cultivo celular.

2. ABSTRACT

The increase in cancer around the world has become a major obstacle to the welfare of humanity. Despite the existence of multiple treatments, many people still losing the fight against this complex disease; not only for recidivism or metastatic that often leads to cancer but also by the social class inequalities in the utilization, access and control of healthcare. Specifically, "by 2025 almost 80% of the increase in the total number of cancer deaths will take place in less developed or low-income regions." That is why looking and researching for more affordable alternatives has a great importance.

The inclusion of therapeutics agents into clinical practice and scientific development of new therapeutic options in medical history have started based on natural products. Although the health benefits of the green tea have been known for hundreds of years, mostly in Eastern culture, studies in recent decades have produced results showing that EGCG (Epigallocatechin gallate: Main active compound in green tea) it has proven to be very promising compound in different fields and for some types of cancer.

It is well known that most of the therapies of choice in the treatment of cancer are associated to a lot of side effects that eventually damage the systems that were healthy at the beginning of the treatment. Thus, the type of cancer that this project is focused (oral and oropharyngeal), it generates ulcers in patients with this disease as a result of the sessions of radiotherapy and chemotherapy, which are not only painful and uncomfortable for those ones who suffer it, but are also ideal for developing infections.

To determine the green tea properties in this pathology, vitro studies were made in the following way: the extract of *Camellia Sinensis* leaves was evaluated on HeLa cell cultures to determine its anticancer activity in percentages of 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25% and 3,187%, it was observed at 12 and 24 hours. Similarly and simultaneously, the protocol on normal cells (fibroblasts) was performed to analyze, if instead, the extract had proliferative or healing properties. (In addition, it was evaluated in the cultures, the cisplatin, a drug known as a cytotoxicity Control agent). The test did not return valid results which demonstrate that green tea has anti-cancer properties as expected.

Cytotoxicity test was performed with brine shrimp and it was evaluated in the larvae the extract at concentrations of 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125%, 1.563%, 0.781%. At 24 hours the larvae were observed under a microscope examination and 100% of the larvae with the extract were dead.

It is intended to administer the extract to volunteer patients with oral and oropharyngeal cancer, the patients were treated by Dr. Zambrano, Medical oncologist at the Valle del Lili Foundation. However, in the absence of conclusive results it will be needed rethinking some new practices and procedures will be recommended later.

Keywords: *Camellia sinensis*, epigallocatechin, cancer, in vitro studies, cell culture.

3. INTRODUCCIÓN

El cáncer constituye una de las enfermedades más comunes y devastadoras que existen alrededor del mundo. “Se calcula que en el 2013 alcanzó los 14 millones de casos nuevos y se prevé que seguirá aumentando hasta los 22 millones anuales en los próximos dos decenios”(World Cancer Report, 2014).

Se tiene gran conocimiento sobre los tratamientos convencionales como la radioterapia y la quimioterapia. Sin embargo, siendo los tratamientos de elección tienen múltiples efectos secundarios que deterioran la calidad de los pacientes con esta enfermedad.

Los pacientes con cáncer oral y/o bucofaríngeo después de los ciclos de radiación desarrollan úlceras profundas y dolorosas que les impide comer, deglutir y en las cuales se pueden desarrollar infecciones que empeoran aún más su situación teniendo en cuenta que son pacientes inmunosuprimidos. (Global Health Observatory (GHO), 2012).

Adicional a la problemática de los efectos adversos, en países principalmente de centro América y sur América no existe un sistema de salud equitativo, por lo que no toda la población tiene acceso a los tratamientos convencionales.

Ante este desafortunado panorama, la medicina alternativa ha tenido gran auge en los últimos años. Si bien no constituye una solución definitiva para el cáncer, muchas plantas logran disminuir el dolor, la ansiedad, y demás problemáticas.

Este proyecto se centra en el té verde, que ha sido usado principalmente en la cultura oriental por tradición y creencias, y es la segunda bebida más consumida en el mundo después del agua. El té verde se ha estudiado y se han identificado las catequinas que lo componen: epigallocatequina galato (EGCG) (59%), epigallocatequina (EGC) (19%), epicatequina-galato (ECG) (13.6%) y epicatequina (EC) (6.4%). (Chen, Schell, Ho, & Chen, 1998). (Ilustración 1)

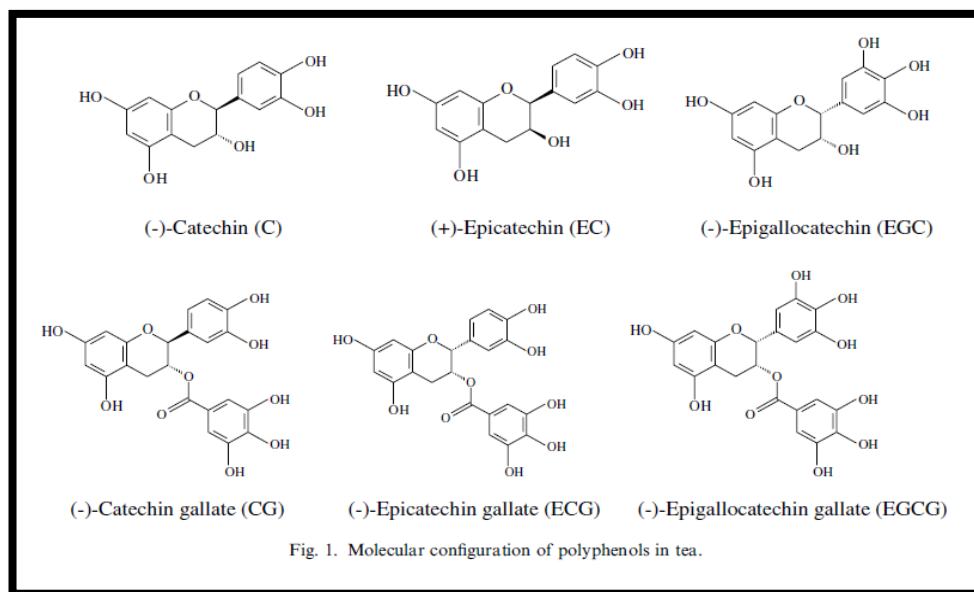


Fig. 1. Molecular configuration of polyphenols in tea.

Ilustración 1- Configuración molecular de los polifenoles del té.

Chen, Z. Schell, J. Ho, C. & Chen, K. (c.1998) Molecular configuration of polyphenols in tea (Imagen) *Green tea epigallocatechin gallate shows a pronounced growth effect on cancerous cells but no on their normal counterparts*. Cancer Lett. "Obtenido de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9719459>".

Si bien, ya se cuenta con información previa de la planta sobre sus componentes y su estabilidad; es necesario establecer sistemas de evaluación de actividad biológica que permitan detectar si contiene metabolitos que puedan ser utilizadas en patologías de alto impacto social y económico, como es el cáncer. En este orden de ideas, este trabajo propone la metodología de extracción, identificación y semicuantificación de las catequinas en las hojas de *Camellia sinensis* donadas por la marca "té Hindú. Se planea además, una metodología preliminar *in vitro* para determinar la potencial actividad anti cáncer de extractos naturales, evaluando su citotoxicidad sobre líneas celulares Hela y CHO.

Actualmente existe una tendencia a buscar alternativas que sustituyan el uso de animales en ensayos toxicológicos, debido al alto costo que implica y adicionalmente, al sufrimiento que se les causa a los animales con este tipo de pruebas. Las alternativas incluyen procedimientos orientados a reducir el número de animales usados por experimento, o al replanteamiento de la metodología para reducir dolor y estrés. Por lo anterior, durante este proyecto se describe la metodología utilizada para realizar una prueba de citotoxicidad sobre larvas de *Artemia salina*, un crustáceo que ha demostrado ser un organismo útil y eficaz en este tipo de pruebas.

Teniendo en cuenta ésta metodología y los datos que la revisión bibliográfica arroja, se pretende proponer una formulación orientada principalmente a pacientes

víctimas de las úlceras causadas por la quimioterapia o la radioterapia de la Fundación Valle del Lili.

4. DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO

4.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer se ha convertido en los últimos años en un motivo de gran preocupación debido a que su incidencia y mortalidad está aumentando rápidamente. Según el NCI (National Cancer Institute): “se calcula que para el 2030 más de 20 millones de personas morirán de cáncer en el mundo.”

A pesar de la existencia de los tratamientos tradicionales como la quimioterapia, la radioterapia y la extirpación de los tumores; siguen siendo muchos los pacientes víctimas de la compleja enfermedad. Una de las razones para que esto ocurra se basa en que las opciones más usadas para tratar los diferentes tipos de cáncer son sumamente invasivas y tienen múltiples efectos secundarios.

El cáncer oral y bucofaríngeo, foco de este proyecto, tiene como tratamiento de primera elección la intervención quirúrgica que debe incluir extirpación de al menos 1 cm de tejido sano alrededor de la lesión y en los casos en los que el tumor se ha diseminado hacia otras áreas (de la boca, cuello, garganta, laringe, labios, maxilar inferior, etc), estas áreas también se deben extirpar. Imaginen entonces cuanta cantidad de tejido sano es necesario retirar para asegurar que no queda rastro de células malignas; y aun con todas las consecuencias de tipo estético y funcional que conlleva esta alternativa para los pacientes, no hay garantía de una total erradicación de la enfermedad. Por lo anterior, en muchos casos es necesario continuar con radioterapia y quimioterapia después de la cirugía, ocasionando disminución de la función salival y del sentido del gusto complicando la ingesta de alimentos y por ende, el mantenimiento del peso y del buen estado general.

Por otro lado, es importante resaltar que en países como Colombia no es igual la asequibilidad para todos los estratos sociales a las terapias contra el cáncer, ya que los medicamentos y tratamientos son sumamente costosos. Ante este panorama, muchos pacientes optan por la elección de tratamientos alternativos y de origen natural por su menor costo y por la creencia de que usándolos tendrán menos efectos adversos.

Actualmente, en el sector de lo natural existe una amplia oferta causada por el aumento de la preferencia para este tipo de productos. Se convierte entonces en una responsabilidad y un reto para los investigadores la búsqueda de tratamientos de origen natural que tengan un efecto anticanceroso y una toxicidad menor para los pacientes, por medio de metodologías aptas que permitan garantizar seguridad y eficacia de su uso.

El té verde ha sido utilizado por siglos, sobretudoo en el oriente y se han desarrollado diferentes estudios serios acerca de esta planta y sus principales metabolitos permitiendo dilucidar en esta planta una promesa y un reto para mejorar la calidad de vida de pacientes con cáncer y/o tratar en sí la enfermedad.

Este proyecto tuvo como objetivo estudiar in vitro la acción del extracto del té verde “*Camellia sinensis*” que contiene todos sus metabolitos, evaluando el efecto anticanceroso de su principal componente (epigallocatechin-3-gallate) en células cancerosas (HeLa) y en células sanas (células CHO). Posteriormente, se evaluó la citotoxicidad del extracto mencionado por medio de una prueba en artemia salina.

4.2 MARCO TEÓRICO

La tumorigénesis es un proceso de múltiples etapas que puede ser activado por cualquiera de los diversos carcinógenos ambientales (tales como el humo del cigarrillo, las emisiones industriales, los vapores de la gasolina), promotores tumorales (tales como ésteres de forbol) y agentes inflamatorios (tales como TNF-alfa y H₂O₂) (Brahma , Sharmila , & Rakesh , 2011).

Las células cancerosas manifiestan, en diferentes grados, algunas características que las distinguen de las células normales entre las que se encuentran: “La proliferación incontrolada, la desdiferenciación y la pérdida de la función, la invasividad y la metástasis (Rang et al., 2008).

El desarrollo del cáncer es un proceso que se compone de diferentes pasos durante los cuales ocurren diferentes modificaciones moleculares y celulares. Para simplificar este proceso, existen tres pasos bien definidos: En primer lugar se encuentra la iniciación, que corresponde a la fase más rápida. Comprende la exposición e interacción de las células con el agente carcinogénico y su posterior distribución y transporte a órganos y tejidos a donde la activación metabólica y la interacción covalente con el ADN de la célula blanco ocurre, dando lugar al daño genotóxico. Luego, ocurre la promoción, fase considerada aun reversible en la cual la proliferación anormal de las células persiste activamente. Finalmente, la progresión, corresponde la fase final en donde el crecimiento descontrolado de la célula ocurre; incluye la conversión gradual de células premalignas a neoplásicas con un incremento en la invasión y metástasis potencial (Weinberg, 2007).

El cáncer corresponde a “la mayor causa individual de mortalidad en el mundo y se estima que en el 2012 hubo 8,2 millones de muertes por cáncer.” (Global Health Observatory (GHO), 2012) y su incidencia ha aumentado un “11% en los últimos cuatro años, hasta un total de casos estimados de 14,1 millones en el 2012” (Stewart & Wild, 2014). Se pronostica que “los casos de cáncer alrededor del mundo aumentarán a un 75% y llegaran a cerca de 25 millones en las próximas dos décadas” (Global Health Observatory (GHO), 2012).

En Colombia, “la enfermedad representa cerca del 15% del total de muertes, ocupando el tercer lugar dentro de la estructura de mortalidad general (después de la violencia y las enfermedades cardiovasculares)” (ministerio de salud y protección social, 2014).

En el caso particular del cáncer oral y bucofaríngeo, que corresponde al foco de este proyecto; la asociación Americana de cáncer muestra en sus informes que en el 2014, solo en Estados Unidos, cerca de 37000 personas tuvieron este tipo de cáncer y además, se estima que 7300 personas morirán por consecuencia del mismo (American Cancer Society, 2008).

El cáncer oral sigue siendo una enfermedad letal para el 50% de los casos diagnosticados anualmente, corresponde al sexto cáncer más frecuentemente en el mundo y representa aproximadamente el 4% de todos los tipos de cáncer (Warnakulasuriya, 2009). Esto se refleja en gran parte por el hecho de que la mayoría de los casos se encuentran en etapas avanzadas en el momento de la detección a pesar de fácil accesibilidad de la cavidad oral para examen regular.

La incidencia de los tipos de cáncer mencionados está creciendo mundialmente, ambos en jóvenes no fumadores y en aquellos que no consumen licor (estas dos prácticas son consideradas los principales factores de riesgo). En la actualidad, se sabe de acuerdo a estudios epidemiológicos que las infecciones con el virus del papiloma humano (HPV) están fuertemente relacionadas con el desarrollo de cáncer oral y bucofaríngeo (Martín-Hernán et al., 2013).

Ante el impacto de esta enfermedad en la población mundial, se ha convertido en un problema de salud pública y en un reto prioritario para los investigadores avanzar en la búsqueda de tratamientos.

Los tratamientos más usados para este tipo de cáncer son: La quimioterapia, la radioterapia, cirugías de extirpación de tumores o la combinación de ellos dependiendo de la etapa de la enfermedad. Sí bien, estas opciones han salvado muchas vidas y son tratamientos de primera elección, también se ha comprobado que sus usos son muy invasivos y generan efectos adversos que pueden comprometer funciones como el habla, la masticación y la deglución (Rang et al., 2008).

Según el Dr. John Cairns de la Escuela de Salud Pública de la Universidad de Harvard, “solo entre 2 y 3 por ciento de los diagnosticados con cáncer cada año son salvados por la quimioterapia” (Cairns, 1985). Sin embargo, la mayoría de los pacientes se someten a la acción de estos fármacos altamente tóxicos y que además, pueden ser cancerígenos, es decir, pueden influir en la reincidencia de la enfermedad.

En esta época donde el auge por lo natural es cada vez mayor, muchos pacientes desilusionados con los tratamientos habituales o aquellos que han sido desahuciados están optando por la elección de terapias no tóxicas o alternativas. Según la Sociedad Española de Oncología médica (SEOM), “alrededor de un 25-30 % de los pacientes en tratamiento oncológico utilizan algún tipo de terapia complementaria y/o integrativa como forma de paliar los síntomas producidos por el cáncer o los tratamientos” (Sociedad Española de Oncología médica, 2012); ante este tipo de información es importante conocer con certeza acerca de la seguridad y eficacia de estos métodos alternativos, mediante el desarrollo de estudios serios y metodológicamente correctos.

El uso de plantas medicinales o de algunas de sus partes corresponden a un tipo de medicina integrativa basada en el aprovechamiento de productos vegetales con distintas propiedades beneficiosas para la salud. Su utilización ha dominado en el continente Asiático; sin embargo en Occidente existen fármacos comercializados obtenidos de la naturaleza como los agentes antitumorales taxanos; la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que “aproximadamente, el 80 % de los habitantes a nivel mundial han utilizado la medicina tradicional en sus cuidados de salud” (Laza, Rodriguez, & Sardiña, 2003) Con todo y los beneficios demostrados de los productos de origen natural no es correcto asumir su inocuidad, para lo cual es importante antes de su comercialización asegurar las dosis, la eficacia, la seguridad y calidad del preparado y por supuesto, su composición.

El té verde (*Camellia sinensis*) es una bebida extremadamente popular alrededor del mundo, junto al agua y su habitual consumo ha sido ampliamente asociado con beneficios para la salud incluyendo eficacia quimiopreventiva (Brahma , Sharmila , & Rakesh , 2011). La cultura china ha conocido los beneficios medicinales del té verde desde tiempos remotos (por al menos 4000 años); usándolo en todo tipo de tratamientos, desde dolores de cabeza hasta depresiones (Sinija & Mishra, 2008), es por esta tradición y uso a través de los años que se tienen indicios de seguridad con el uso de esta planta y se pretende comprobar por medio de estudios serios su eficacia en el tratamiento de cáncer oral y bucofaríngeo.

	CLASIFICACION CIENTIFICA	
	Reino:	<i>Plantae</i>
	División:	<i>Magnoliophyta</i>
	Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
	Orden:	<i>Ericales</i>
	Familia:	<i>Theaceae</i>
	Tribu:	<i>Theeae</i>
	Género:	<i>Camellia</i>
	Especie:	<i>C. sinensis</i>
	NOMBRE BINOMIAL	
<i>Camellia sinensis</i>		

Hojas de la planta de té (*Camelliasinensis*)

Ilustración 2- Características generales del té verde.

Lopez, A. (c.2013) “Principales características de *Camellia sinensis*.” (Fotografía) *metodología para la determinación de epigalocatequina galato en té verde por uplc-pda*. “Obtenido de: http://bibliotecadigital.icesi.edu.co/biblioteca_digital/bitstream/10906/76827/1/metodologia_epigalocatequina_galato.pdf”.

Las hojas del árbol té contienen una serie de compuestos bioactivos que son responsables de las propiedades benéficas para la salud atribuidas a la bebida,

entre estos los de mayor relevancia son los compuestos antioxidantes. Los polifenoles del té, poseen fuertes propiedades de antioxidantes que destruyen los radicales libres de oxígeno, disminuyendo así el riesgo de padecer enfermedades degenerativas (Jain, Siddiqi, & Weisburger, 2006).

Los componentes del té verde se dividen así:

Los polifenoles: constituyen entre el 15 y el 20% del té verde y están compuestos por siete tipos diferentes de catequinas: (+) - catequina (C), (-) –epicatequina (EC), (+) –galocatequina (GC), (-) –epigalocatequina (EGC), (-) –epicatequina-3-galato (ECG), (-) –galocatequina-3-galato (GCG) y (-) –epigalocatequina-3-galato (EGCG).

Cafeína: el contenido de cafeína de las hojas de té verde alcanza el 5%.

Vitaminas: el té verde contiene vitamina A, vitamina B, Vitamina B2, Vitamina B3 y Vitamina C.

Amino ácidos: la teanina es el aminoácido mayoritario en el té verde, seguida de ácido glutámico, arginina, ácido aspártico y glutamina. Compuestos Nitrogenados: cafeína, purina, amidas, proteínas y ácidos nucleicos.

Elementos Inorgánicos: el contenido en aluminio, manganeso y fluor es relativamente alto comparado con el de otras plantas. Otros elementos mayoritarios son hierro, boro y selenio.

Carbohidratos, celulosa y almidón: el contenido total en carbohidratos es aproximadamente el 40% de la hoja del té verde, siendo 1/3 celulosa. El contenido de almidón varía de una muestra a otra (Zaveri, 2006)

Es importante tener en cuenta que la composición química del té verde varía con diferentes factores como: el clima, la estación, las prácticas hortícolas y la posición de la hoja previa a la cosecha (Sinija & Mishra, 2008). Esta inestabilidad supone entonces un reto, asociado a la manufactura del extracto en gel que se va a utilizar. Aunque ya se especificó la composición de los polifenoles y demás compuestos del té verde, es importante mencionar que la epigalocatequina galato (EGCG) constituye la catequina de mayor proporción y a la cual se le atribuyen las principales propiedades (Ilustración 3) (Mereles & Hunstein, 2011).

En cuanto a su taxonomía, *Camellia sinensis* o té verde, es un árbol de hoja perenne o arbusto de la familia THEACEAE que crece de 10 a 15 m de altura en la naturaleza, y 0,6 a 1,5 m bajo cultivo. Las hojas son de tallo corto, de color verde claro, coriáceo, alterno, elíptico-obovado o lanceolado, con los márgenes serrados, glabros o, a veces pubescentes por debajo, que varían en longitud de 5 a 30 cm, y aproximadamente 4 cm de ancho. Las flores son blancas, fragantes, de 2.5-4 cm de diámetro, solitarias o en grupos de dos a cuatro. Tienen numerosos estambres con anteras amarillas y produce uno a cuatro lóbulos. Cada lóbulo contiene de uno a tres semillas marrones esféricas o aplanadas (Ross, 2005).

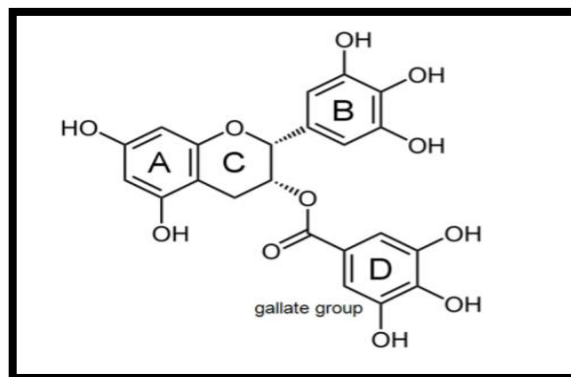


Ilustración 3- Estructura química del EGCG

Mereles, D. (c.2011) "Chemical Structure of EGCG." (Imagen) *Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) for clinical trials: More pitfalls than promises?*, International Journal of molecular Science. "Obtenido de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3189735/>".

Esta molécula a pesar de mostrar múltiples beneficios en diferentes enfermedades (como se ampliará más adelante) se le han atribuido problemas de estabilidad en soluciones neutras o alcalinas (Yu, y otros, 2008), de degradación cuando no se almacena a bajas temperaturas y en lugares secos. Por otro lado, la EGCG ha mostrado ser estable bajo condiciones anaeróbicas in vivo, a pesar que los mecanismos para su estabilización no han sido completamente caracterizados (Mereles & Hunstein, 2011).

La EGCG, al ser una catequina con una estructura tipo pirogalol en el anillo B, posee fuerte actividad antioxidante y se somete a auto oxidación para formar especies reactivas del oxígeno, resultando en polimerización y descomposición (Mereles & Hunstein, 2011).

Sharma y colaboradores (2012), incursionaron también en la investigación de la acción antibacterial, evaluándolo sobre *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Brevibacterium linens*, encontrando que eran sensibles a la EGCG utilizando un ensayo de difusión. Concluyeron además que el extracto acuoso no eran toxico. (Sudathip, Grove , & Lambert, 2011) Incursionaron en el uso del té verde sobre el síndrome metabólico (definida por la presencia de perímetro abdominal elevado, disglucemia, presión sanguínea elevada, alto colesterol, e incremento de los triglicéridos). Evaluaron in vitro y en modelos animales, y encontraron que el té verde tiene efecto sobre la producción de insulina, la hipertensión, y la hipercolesterolemia. Dentro de los mecanismos se tienen: incremento en la utilización de glucosa, disminución de novo de la lipogénesis, y efectos antioxidantes.

Por otro lado, los efectos del té verde fueron examinados sobre la agregación plaquetaria en humanos (in vivo) y sobre parámetros de coagulación (ex vivo). Se

encontró evidencia de la prevención de muerte causada por trombosis pulmonar en ratones in vivo, ya que las catequinas prolongan significativamente el tiempo de sangrado e inhiben la adenosina difosfato. Sin embargo, no se encontró evidencia que permita concluir que el té verde no altera el tiempo de tromboplastina parcial, ni el tiempo de protrombina. (Kang, y otros, 1999)

La EGCG ha sido estudiada ampliamente encontrándola benéfica en la inducción de apoptosis y en la prevención de metástasis en cáncer de: piel, próstata (Gupta, Hussain, & Muhktar, 2003), seno (Thangapazham, Passi, & Maheshwari, 2007), pulmón (Yamauchi, Sasaki, & Yoshida, 2009), colón (Okello et al., 2011), páncreas (Yu et al., 2008). Además hay publicaciones que demuestran que el EGCG induce apoptosis y, niveles de proteínas antioxidantes y desintoxicantes en células de leucemia linfoides humanas (Brahma, Sharmila, & Rakesh, 2011).

Aun no se tiene muy claro el mecanismo mediante el cual la EGCG realiza su actividad anti carcinogénica. Sin embargo, se han postulado 3 posibles formas:

- La EGCG inhibe las etapas asociadas con el cáncer e inhibe la metilación del ADN bloqueando el rendimiento de los DNMTs, se dan fuertes actividades antioxidantes y eliminación de radicales libres (Brahma, Sharmila, & Rakesh, 2011).
- La EGCG actúa sobre la fase de promoción del crecimiento del tumor bloqueando receptores en las células afectadas (Brahma, Sharmila, & Rakesh, 2011).
- La EGCG facilita la unión directa a ciertas sustancias cancerígenas del cáncer en desarrollo (Brahma, Sharmila, & Rakesh, 2011).

Para evaluar el efecto del extracto de *Camellia sinensis* se utilizaron cultivos celulares que corresponden al producto de la colección de células animales de diferentes órganos que se mantienen en condiciones especiales que favorezcan la supervivencia y la multiplicación; para ello es necesario mantener todas sus funciones metabólicas de manera semejante a la que tenía el huésped. Es decir, condiciones de humedad, temperatura, pH, viscosidad y nutrición específicas (Universidad Nacional de Quilmes, 2012). El uso de cultivos tiene ventajas innegables entre las que se pueden mencionar un mayor control del medio fisicoquímico y fisiológico, mayor homogeneidad en la morfología y composición de las células, mayor economía y menores dilemas éticos que en la experimentación con animales (Durán et al., 2004).

En aquellos casos en los que las células requieren la adhesión a un sustrato para crecer y dividirse, el crecimiento se realiza en una única capa celular (monocapa). Esta monocapa crecerá hasta alcanzar cerca del 100% de confluencia (máxima capacidad de cubrimiento de superficie); pasado esta etapa, el crecimiento se detiene por inhibición por contacto y las células pueden comenzar a degenerar, desprenderse y morir (Cultek, 2008).

El tipo de células que se utilizaron en este estudio son células HeLa y células CHO. Las células HeLa son muy conocidas y utilizadas en el ambiente científico, han contribuido en múltiples estudios como, por ejemplo, la vacuna contra la polio y estudios de antineoplásicos. Estas células fueron tomadas de una mujer que padeció cáncer de cuello uterino llamada Henrietta Lacks en 1951 (Nishi, 2006). HeLa, es entonces, “una línea de células epiteliales humana derivada de carcinoma de cuello uterino que han sido transformadas por el virus del papiloma humano 18 (VPH 18), son células adherentes y su tiempo de replicación es de 23 horas” (Nishi, 2006). Durante el desarrollo de este proyecto se usaron para evaluar la acción anticancerosa del extracto de té verde.

Como ya se mencionó anteriormente, se utilizaron células CHO, línea obtenida a partir de ovario de hámster chino (*Cricetulus griseus*), en 1973, por Puck y colaboradores. Esta ha sido la línea de mayor difusión en el estudio de daño genético al nivel cromosómico (Lamar, 1999), y corresponden al tipo de celular sano que se utilizó en contraste con las células HeLa para evaluar la diferenciación del extracto.

“La citotoxicidad es la cualidad de ser tóxico para las células.” (molecular devices, 2015). Las células expuestas a un compuesto citotóxico pueden responder de diferentes formas. Una de ellas es desarrollando necrosis, durante este proceso ellas pierden la integridad de su membrana y mueren rápidamente como resultado de la lisis de las células; otra opción consiste en que su crecimiento y división se detiene y finalmente, se puede activar el proceso de apoptosis (que se define como el programa genético que controla la muerte celular) (Brown & Brown, 1999).

Las pruebas de citotoxicidad se realizan generalmente para evaluar moléculas en estudio que pretenden comercializarse posteriormente y se realizan para evaluar su seguridad. Existen varias maneras de medirla; sin embargo, la mayoría se relaciona con la evaluación de la integridad de la membrana. Colorantes vitales como el azul de tripano, biomarcadores de proteasa, ensayo de potencial redox MTT, o la medición del contenido de ATP son algunos de los métodos, que son principalmente colorimétricos, fluorescentes o de detección de luminiscencia (Kuetze, y otros, 2011).

Durante este proyecto se utilizó la *Artemia salina* para saber si los componentes del té verde eran tóxicos y para determinar la dosis letal 50. La *artemia salina* es un artrópodo acuático primitivo (lagos salinos) perteneciente a la familia Artemiidae, con una edad de aproximadamente 100 millones de años. Pueden tolerar grandes cantidades de sal (hasta 300 gramos de sal por litro de agua) y pueden vivir en muy diferentes soluciones de agua de mar como permanganato de potasio y nitrato de plata. (Dumitrascu, 2011).

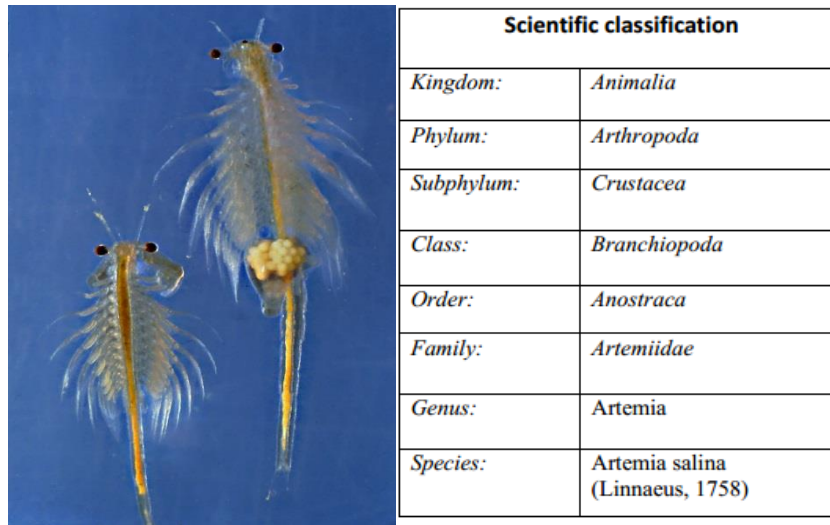


Ilustración 4- Imagen de Artemia salina y su clasificación científica
 Lazo, J. (c.2010) "Artemia salina y su clasificación científica." (Imagen) *Ensayo de artemia: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales*, scielo. La Habana, Cuba.

Las larvas de Artemia salina, especialmente en estado nauplia, son usados para alimentar diferentes especies de peces y crustáceos.

La resiliencia de estos animales los hace ideales para el análisis de muestras en los experimentos. Son por este motivo, uno de los organismos utilizados regularmente en las pruebas de toxicidad de compuestos químicos en estudio. (Lagarto Parra, Silva Yhebra, Guerra Sardiñas , & Iglesias Buela, 2008).

Adicionalmente, se están usando en la actualidad para tratar enfermedades reumáticas, ginecológicas y endocrinas (Brown & Brown, 1999).

4.3 OBJETIVOS

4.3.1 Objetivo General

Evaluar in vitro la capacidad proliferativa y anticancerosa de un extracto de té verde, determinando viabilidad celular y toxicidad.

4.3.2 Objetivos Específicos

- Determinar la capacidad proliferativa del extracto de hojas de té verde en células normales.
- Evaluar en cultivos de células tumorales (Hela) si hay replicación o disminución de las mismas a partir extracto de hojas de té verde.
- Determinar la dosis efectiva y evaluar toxicidad del extracto de té verde sobre artemia salina.

4.4 METODOLOGÍA

4.4.1 Colección del material vegetal

Las hojas de té verde (*Camellia sinensis*) fueron donados en el mes de Agosto de 2014 por la empresa Agrícola Himalaya Ltda, específicamente por su reconocida marca “Té Hindú”, la cual es la única empresa de té y aromáticas del mercado colombiano que tiene sus propias plantaciones en el corregimiento de Bitaco, en el municipio de La Cumbre (Colombia). Las hojas se secaron a temperatura ambiente durante una semana; posterior a ello, fueron molidas y pesadas (365 g).

4.4.2 Obtención del extracto

Los 365 gramos de té verde obtenidos se dividieron en 4 beakers de 500 ml, con el objetivo de realizar extracciones sucesivas con etanol al 96%. El macerado se mezcla con una solución hidroalcohólica 1:1 previamente realizada. Luego, se llevaron al sonicador a 37 °C durante 30 minutos hasta agotar el material vegetal. Posteriormente, se realizaron filtraciones con vacío. Los filtrados obtenidos se unieron para finalmente ser llevados al rotaevaporador (1 atm, 45 °C) y se concentró el extracto durante 1 hora y media.

4.4.3 Identificación de catequinas y semicuantificación de epigallocatequina galato

- Estándar: Se utilizó un estándar de Epigallocatequina galato (EGCG, CAS 989-51-5. Producto de Japón.
- Solventes: Metanol, agua tipo 1, acetona, tolueno, ácido fórmico.
- Revelador: Fast blue Salt B

Se realizaron diluciones de la muestra en proporciones 3:10, 4:10, 5:10, 6:10, 7:10 muestra: metanol respectivamente. Se realizó una cromatografía en capa fina, con fase móvil 2:2:1 acetona: tolueno: ácido fórmico.

Fuente: Reich, E & Schibli, A. (2006) *High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants*. (Ed. Thieme)

Se pesaron 4 mg del estándar de Epigallocatequina Galato, y se le agregaron 50 µl de metanol (solución inicial). De esta solución se tomaron 25 µl y se realizaron diluciones para obtener concentraciones de 8 µg, 4 µg, 2 µg, 1 µg, 0.5 µg y 0.25 µg. Se realizó una cromatografía en capa fina de alto rendimiento (HPTLC), en la cual se sembró 1 µl de cada concentración de estándar y 1 µl de muestra en proporciones 5:10, 6:10, 7:10 muestra: metanol (la siembra de 1 µl se hizo mediante un “dispensador capilar CAMAG”), se utilizó como fase móvil una solución 2:2:1

acetona: tolueno: ácido fórmico y se reveló con fast blue salt, del cual se pesó 0,1 g y se llevó a un volumen de 20 ml con agua tipo 1.

Por medio de fotos de la placa obtenida y mediante el uso del software ImageJ, se hallaron las áreas del estándar de epigalocatequina galato en las concentraciones mencionadas y se semicuantificó la cantidad de epigalocatequina galato contenida en la muestra.

4.4.4 Cultivo celular

Las células HeLa y las células CHO fueron donadas por el laboratorio in vitro de la universidad del valle, lugar en el que se realizaron todas las pruebas in vitro y de citotoxicidad. Ambas líneas celulares fueron cultivadas con 5% de CO₂ y a una temperatura de 37°C.

1. Medio de cultivo para células HeLa (MEDIO 1): 5% SFB, 1% Gln, BME (Medio basal Eagle)
2. Medio de cultivo para células CHO (MEDIO 2): RPMI 1640 suplementado con SBF (Suero Bovino Fetal) y 100 unidades/ml de penicilina.

4.4.5 Descongelación de células:

- Se sacó la ampolla del tanque nitrógeno líquido rápidamente y sumergió en un baño de agua a 37°C hasta descongelación.
- Se limpió la ampolla con un algodón embebido en alcohol al 70 %.
- Luego, se procedió a abrirla y se recogió con una micropipeta el contenido y se trasladó al tubo de centrifuga y se agregaron 10 ml de medio de cultivo. (MEDIO 1 y MEDIO 2 respectivamente).
- Se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- El sobrenadante se descartó, y el paquete celular se resuspendió en 1 ml de medio de cultivo (MEDIO 1 y MEDIO 2 respectivamente). La suspensión celular obtenida se sembró en botellas de cultivo de 25 cm² con 5 ml de medio de cultivo.
- Se llevaron a una incubación a 37°C de CO₂ al 5%.
- Cada dos días se les cambio el medio de cultivo y se observó la confluencia, es decir, si había suficiente espacio entre las células.

- Después de 6 días, se observó que no había suficiente espacio entre las células, por lo cual fue necesario subcultivarlas.

4.4.6 Tripsinización:

- En la campana de flujo laminar, con una pipeta de 10 ml se sacó y desechó el medio de cultivo. (MEDIO 1 y MEDIO 2 respectivamente).
- Se lavó la botella de cultivo con buffer fosfato salino (PBS), posteriormente se aspiró y se desechó.
- Se adicionaron 2 ml de tripsina- EDTA al 0,25% y con la botella cerrada, se esparció por todo el cultivo por gravedad.
- Se observaron al microscopio hasta que las células se desprendieron de la botella.
- Se añadieron 5 ml del medio de cultivo (MEDIO 1 y MEDIO 2 respectivamente) para detener la reacción.
- La suspensión obtenida se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos a 30°C.
- El sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron en 1 ml de medio de cultivo. (MEDIO 1 y MEDIO 2 respectivamente).

4.4.7 Cuantificación de células

- Para cuantificar las células, en un tubo Eppendorf se colocaron 20 μ l de la suspensión celular más 80 μ l de Azul de Tripano al 0.4%
- Se mezclaron y se colocaron 10 μ l en ambas secciones de la cámara de Neubauer.
- La cámara se observó bajo microscopio óptico con el objetivo de 10X y se contaron el número de células no teñidas (vivas-blancas) por mm^2 en los 4 cuadrantes. La cuenta se repite en la otra sección de la cámara de Neubauer. Se realizaron los cálculos correspondientes a la viabilidad y el número de células por ml de suspensión.

4.4.8 Evaluación del extracto de té sobre células HeLa

- De acuerdo al conteo de células, se sembraron 50.000 células por pozo en 3 cajas de cultivo de 24 pozos por cada línea celular (6 cajas).
- Se incubaron las cajas a 37°C y 5% CO₂ durante 24 horas para que las células se adhirieran.
- Se prepararon diluciones con el extracto al 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%.
- Después de transcurridas las 24 horas se observaron al microscopio óptico, objetivo 10X y se evaluó si había algún tipo de contaminación. (a partir de este punto el procedimiento solo se realizó con la línea celular HeLa debido a que las células CHO se contaminaron como se explicará en la sección resultados).
- Se agregaron a cajas de 24 pozos: (Pozo 1-3): 2 ml del extracto puro, (Pozo 4-6): 1 ml del extracto al 50%, (Pozo 7-9): 0.5 ml del extracto al 25%, (Pozo 10-12): 0.25 ml del extracto al 12,5%, (Pozo 13-15): 0.125 ml del extracto al 6,25%, (Pozo 16-18): 0.0625 ml del extracto al 3,125%. Cada una de las concentraciones por triplicado. Posteriormente, se llevó a un volumen de 2 ml con medio de cultivo (MEDIO 1) en cada pozo.
- Adicionalmente, se asignaron 3 pozos control en cada caja (Pozo 19-21), en los cuales se agregaron 2 ml de medio de cultivo en cada uno.
- Por otro lado, se utilizaron 3 pozos en cada caja (Pozo 22-24), para un control positivo con cisplatino en una concentración de 100 µM.
- Se esperaba realizar conteos a las 12h, 24h y 48h en cada caja por medio de la cámara de Neubauer y realizar las gráficas correspondientes al cambio en el número de células con respecto al tiempo y a las diferentes concentraciones utilizadas.

4.4.9 Citotoxicidad: Ensayo con artemia Salina

- Se pesaron 3 gramos de huevos de Artemia salina y 36 gramos de sal marina sin flúor.
- Se agregó la sal marina a un litro de agua. Los huevos de artemia se agregaron a la solución salina y se incubaron en presencia de luz artificial y a temperatura ambiente durante 48 horas.

- Se tomaron 3 cajas de cultivo de 24 pozos y en cada pozo con ayuda de un gotero y una lupa se agregaron 10 organismos (larvas). Adicionalmente, se agregaron 100 μ l de solución salina.
- Se prepararon diluciones con solución salina y el extracto al 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125%, 1.563%, 0.781%.
- Se asignaron 3 pozos de cada caja de cultivo para cada concentración y se agregaron 900 μ l de las diluciones al pozo correspondiente.
- Como control se utilizó la solución salina en ausencia de las diluciones del extracto.
- Se incubaron a temperatura ambiente por 24 horas, en presencia de luz artificial.
- Se realizó el conteo de larvas vivas y muertas de cada pozo, por parámetro de movimiento y respuesta a la luz.

4.5 RESULTADOS

Identificación de polifenoles en extracto de té verde por Cromatografía en capa fina.

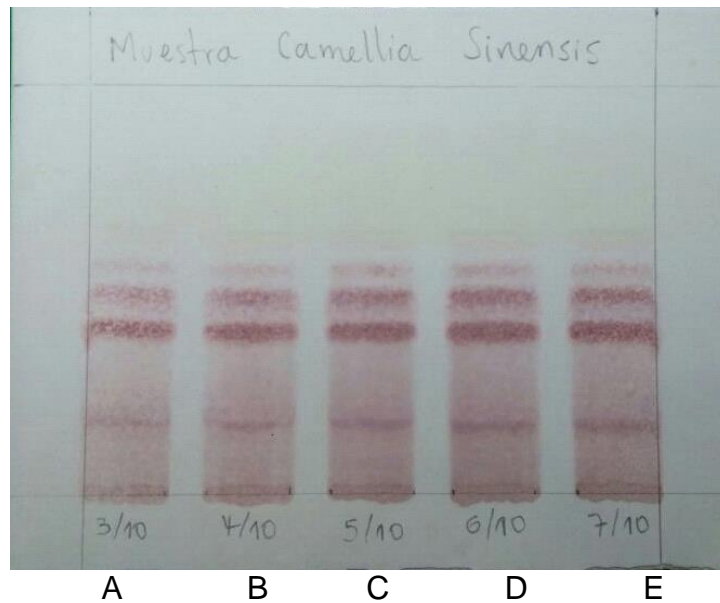


Ilustración 5-Cromatografía en capa fina (TLC) del extracto de té verde (camellia sinensis) en proporciones 3/10 (A), 4/10 (B), 5/10 (C), 6/10 (D), 7/10 (E). Fase móvil: 2:2:1 acetona: tolueno: ácido fórmico. Revelador: Fast blue Salt B.

Identificación de Epigallocatequina Galato en Extracto de té verde (Cromatografía en capa fina de alto rendimiento)

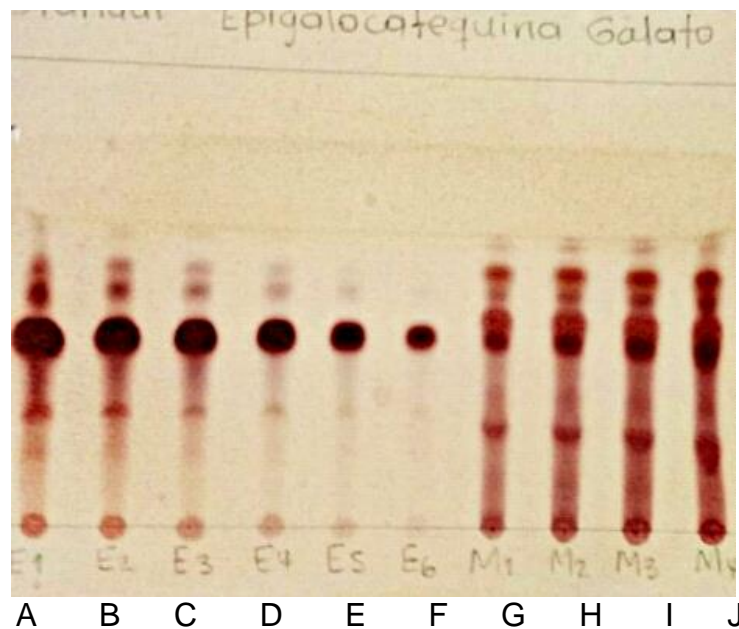


Ilustración 6 - Cromatografía en capa fina de alto rendimiento del estándar de epigalocatequina galato y del extracto de las hojas de té verde (*Camellia sinensis*). Fase móvil: 2:2:1 acetona: tolueno: ácido fórmico. Estándar: (A) 8 µg, (B) 4 µg, (C) 2 µg (D) 1 µg, (E) 0.5 µg y (F) 0.25 µg. Muestra: (G) 4/10, (H) 5/10, (I) 6/10 (J) 7/10. Revelador: Fast blue Salt B.

Identificación de Epigalocatequina Galato en Extracto de té verde bajo cámara UV (Cromatografía en capa fina de alto rendimiento)

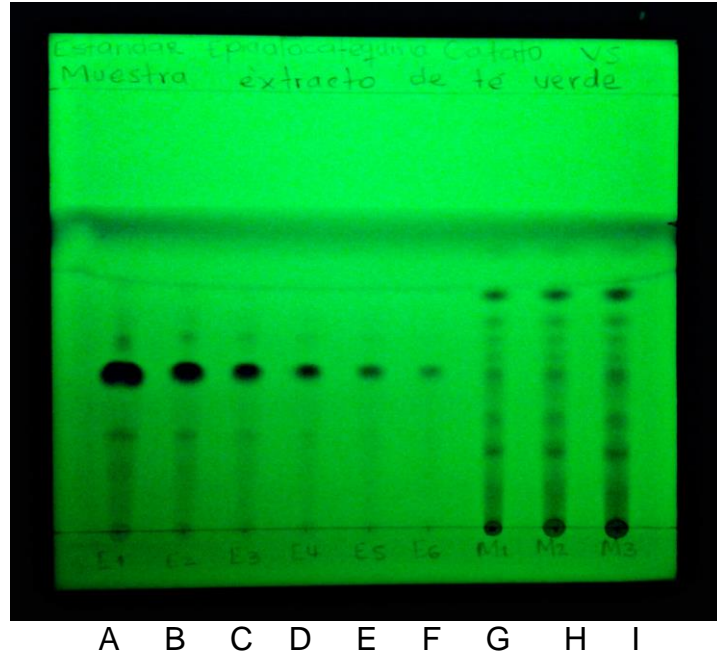


Ilustración 7- Cromatografía en capa fina de alto rendimiento del estándar de epigalocatequina galato y del extracto de las hojas de té verde (*Camellia sinensis*) bajo cámara UV. Fase móvil: 2:2:1 acetona: tolueno: ácido fórmico. Estándar: (A) 8 µg, (B) 4 µg, (C) 2 µg (D) 1 µg, (E) 0.5 µg y (F) 0.25 µg. Muestra: (G) 4/10, (H) 5/10, (I) 6/10. Revelador: Fast blue Salt B.

Áreas del Estándar de Epigalocatequina Galato

Cantidad de Estándar	Área
0,25 µg	9.238.066
0,5 µg	11.830.409
1 µg	18.861.572
2 µg	23.459.836
4 µg	29.049.706
8 µg	35.557.475

Tabla 1- Curva de calibración de las áreas del estándar de epigalocatequina galato obtenidas con el software imageJ.

Áreas del extracto de té verde

Proporción extracto: metanol (1000 µl)	Área
500:500	20.297.806
600:400	25.568.706
700:300	26.839.413

Tabla 2- Tabla 2: Áreas del extracto de té verde (camellia sinensis) obtenidas con el software imageJ

Conteo Celular

Cámara 1	26
Cámara 2	27
Promedio	24,5
Células totales / ml	24'500.000

Tabla 3- Tabla 3: Conteo de células Hela en cámara de Neubauer previo a la adición del extracto de té verde.

- **Muestra del cálculo**

Promedio de las cámaras/ número de cuadrantes x factor de dilución x factor de la cámara x volumen medio con células

$$\frac{24,5}{4} = 6.125 \times 10 \times 10000 \times 40 \text{ ml}$$

$$\text{Células totales / ml} = 24500000$$

Se necesitaba sembrar 50000 células/ 1 ml por pozo, entonces:

$$C_1V_1=C_2V_2$$

$$\frac{250000 \text{ células} \times 50 \text{ ml}}{24500000 \text{ células}} = V_2$$

$$5,1 \text{ ml} = V_2$$

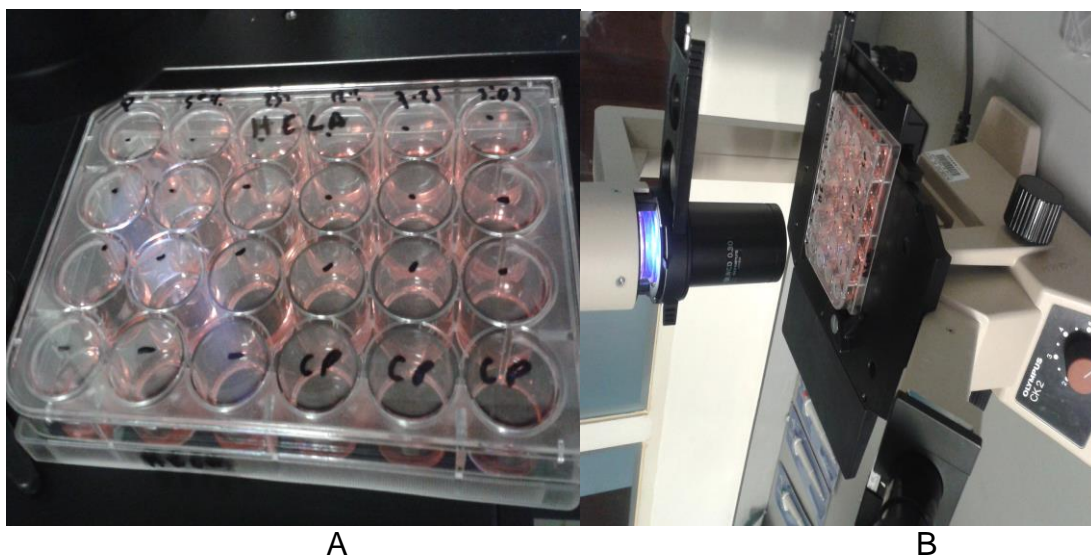


Ilustración 8 - (A) Placa para siembra de 24 pozos con 50.000 células hela por pozo. Previo a incubación por 24 horas a 37 °C Y 5% de humedad relativa. (B) Montaje de observación al microscopio de las células Hela posterior al día de incubación para confirmar adhesión.

Evaluación extracto de té verde sobre células HeLa



Ilustración 9- Placa de cultivo de 24 pozos con 50.000 células Hela por pozo y el extracto de té verde en concentraciones de 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%. Adicionalmente, 3 pozos control (solo células Hela) y 3 pozos con cisplatino a una concentración de 100 μ M.

Evaluación de citotoxicidad del extracto de té verde sobre Artemia Salina

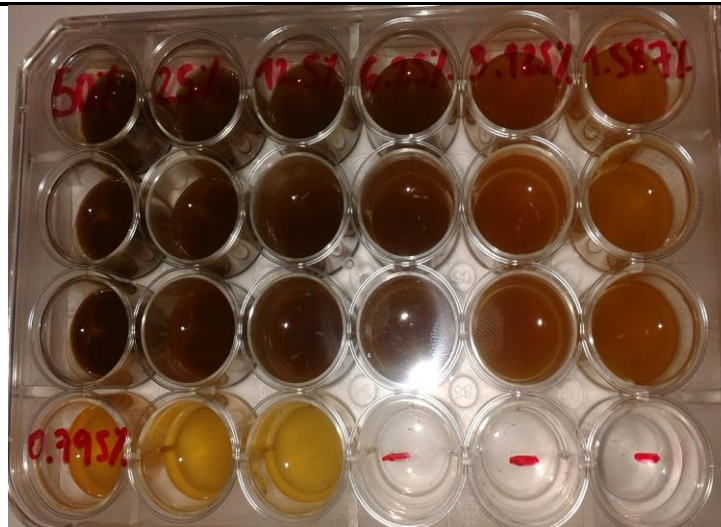


Ilustración 10- Prueba de citotoxicidad. (A) Placa de 24 pozos con 10 larvas de artemia salina en cada uno y extracto de té verde en concentraciones de 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,587%, 0,795%. Adicionalmente 3 pozos control (solo larvas de artemia salina).

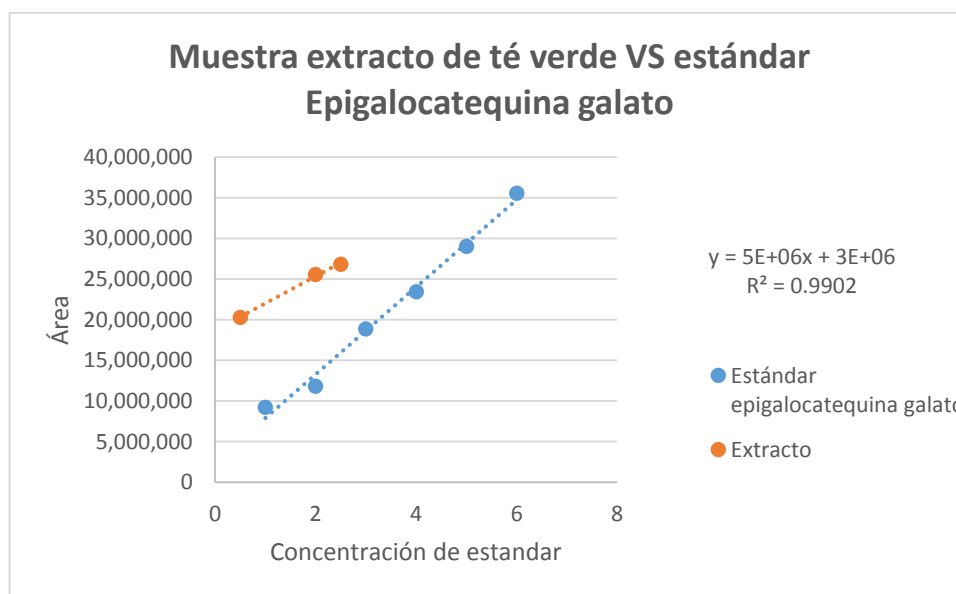


Ilustración 11- Curva de calibración de 6 puntos con un coeficiente de correlación, $R^2 = 0,9902$. Esta curva esta expresada en términos de área bajo la curva contra concentración de EGCG.

4.6 DISCUSIÓN

Con el extracto obtenido a partir de las hojas de té verde se realizó una cromatografía en capa fina en diferentes concentraciones como se muestra en la ilustración 1, con el objetivo de identificar las diferentes catequinas y especialmente la epigalocatequina galato, que constituye el antioxidante poli fenólico de mayor proporción del té verde y el responsable de la mayor parte de su actividad biológica (Babich, Zuckerbraun, & Weinerman, 2007).

El resultado de esta identificación era importante, ya que si no se encontraban las bandas características de las mencionadas catequinas no sería lógica su posterior evaluación sobre los cultivos celulares.

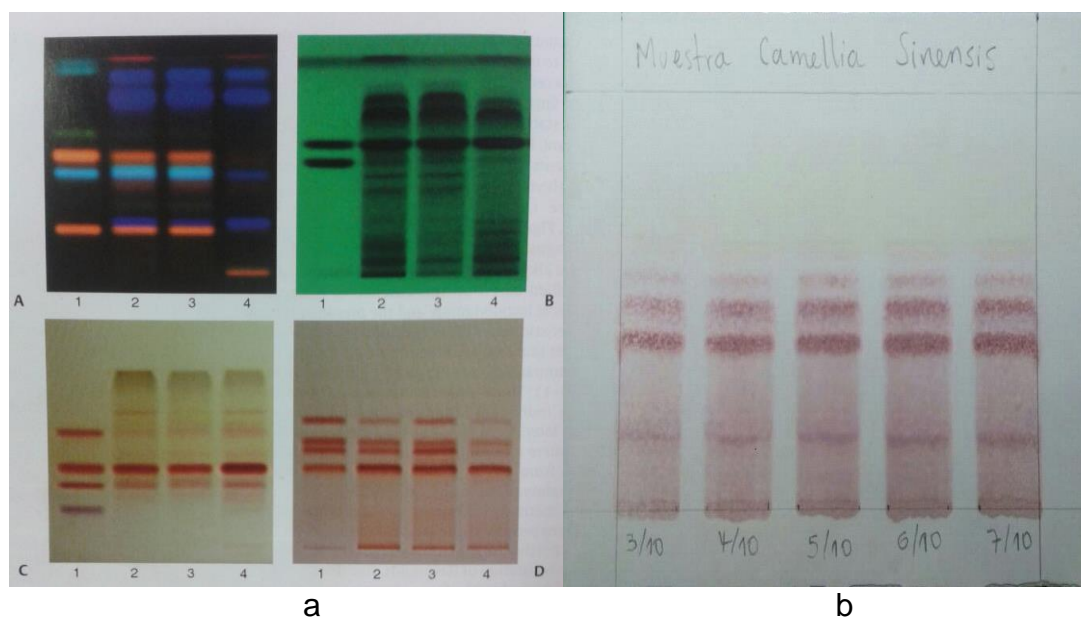


Ilustración 12- (a) Huella dactilar del té verde. (A) Flavonoides, (B) alcaloides, (C) amino ácidos, (D) polifenoles. Tomado de: high performance thin-layer chromatography for the analysis of medicinal plants. (b) TLC realizado con el extracto de té verde.

Se puede observar en la ilustración 12, en el cuadrante D que correspondiente a los polifenoles que las bandas de separación de la cromatografía son las mismas que las que se obtuvieron en la muestra de extracto, es decir, la muestra contiene las catequinas de interés.

De acuerdo a la metodología que se planteó inicialmente, una vez que se había realizado la extracción de las hojas de té verde se debía llevar a cabo un proceso de liofilización, que se define como "la desecación en la que se elimina el agua por congelación del producto húmedo y posterior sublimación del hielo en condiciones de vacío. Al suministrar calor, el hielo sublima y se evita el paso por la fase líquida."

(kasper , Winter, & Friess, 2013). Este paso con el propósito de convertir el extracto en un polvo fácilmente reconstituible y libre de solvente, para la posterior evaluación sobre las células Hela y CHO.

La liofilización se viene utilizando hace muchos años, y es aun en este siglo el método de elección para una amplia gama de aplicaciones farmacéuticas en desarrollo y expansión. Tiene como ventaja que después de este proceso se obtiene productos de redisolución rápida, la forma y características del producto final son esencialmente las originales. Adicionalmente, es un proceso idóneo para sustancias termolábiles y se obtiene un contenido muy bajo de humedad final. (kasper , Winter, & Friess, 2013).

Sin embargo, no fue posible realizar este proceso debido a que el liofilizador de la universidad se encuentra dañado. Se buscó adicionalmente el apoyo de universidades como la javeriana y univalle, sin resultados positivos. Ante este panorama, se tomó la decisión de concentrar el extracto hasta el máximo posible por medio de un sistema de roto evaporación con vacío con el objetivo de eliminar la mayor cantidad de solvente posible. Para realizar este proceso se colocó el extracto en un matraz de fondo redondo sin llenarlo completamente, sin superar las tres cuartas partes del volumen total del recipiente. Se acopló al roto evaporador de manera que pudiera rotar durante todo el proceso. Para calentar la solución a evaporar se utilizó un baño de agua termostatizado donde la temperatura no excedió los 40-45 °C. Se mantuvo en este sistema durante 1 hora y 40 minutos, hasta que el volumen había disminuido radicalmente y se habían destilado 700 ml del solvente con el que se realizó la extracción, es decir, etanol.

Se debía tener especial cuidado en no provocar un sobrecalentamiento, ya que sería un error grave debido a que según (Vuong, Golding, Nguyen, & Roach, 2010), la temperatura es un factor crítico que afecta la estabilidad fisicoquímica de las catequinas y en consecuencia se puede producir la epimerización de las mismas. A temperaturas mayores a 90 °C la configuración 2,3- cis de las catequinas sufre una epimerización reversible a su epímero correspondiente 2,3- trans. Adicionalmente, existe el riesgo de una degradación y pérdida de la epigalocatequina galato (metabolito de interés).

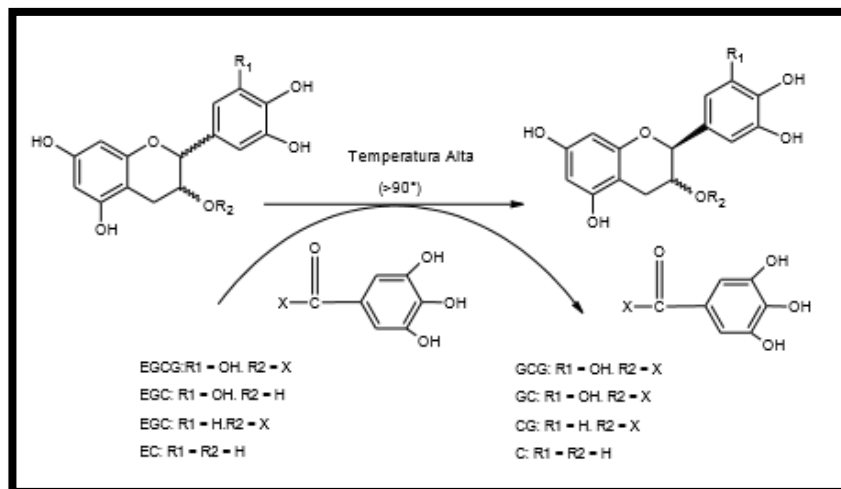


Ilustración 13- Epimerización de las catequinas

Opore Kennedy, D. Kojima, A. Hasuma, T. Yano, Y. Otani, S. Matsui-Yuasa, I. (c.2001) Epimerización de las catequinas. (Imagen) *Growth inhibitory effect of green tea extract and (-)-epigallocatechin in Ehrlich ascites tumor cells involves a cellular thiol-dependent activation of mitogenic-activated protein kinases*. PubMed.gov “Obtenido de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/113112092>”.

Una vez que se había realizado este paso, aun con las precauciones tomadas con respecto a la temperatura, se realizó una cromatografía en capa fina de alto rendimiento del extracto concentrado obtenido para garantizar que no había ocurrido una degradación o epimerización que tuviera como consecuencia la pérdida de las catequinas. Como se puede ver en la ilustración 2, se comparó con un estándar de epigallocatequina galato y se obtuvo que aun después de la roto evaporación, el extracto seguía presentando la mancha a la altura característica dada por el estándar.

Adicionalmente, se utilizó el software imageJ (un programa de procesamiento de imagen digital), para hallar las áreas bajo la curva (tabla 1) en un barrido de seis concentraciones del estándar y compararlas con las áreas bajo la curva obtenidas de tres concentraciones del extracto (tabla 2). A partir de estos datos, en la Ilustración 11, es posible semicuantificar la cantidad de epigallocatequina galato que tiene el extracto concentrado teniendo en cuenta la ecuación de la recta. La cantidad aproximada de epigallocatequina galato presente en el extracto de té verde evaluado fue de 0,732 µg/µl.

La curva de calibración mostrada en la ilustración 11 presenta un coeficiente de correlación (R^2) de 0,9902 por lo cual se acepta la linealidad de la curva, ya que r^2 es mayor a 0.98 (Cáceres, 2007).

Simultáneamente, en el laboratorio de la universidad del valle, se descongelaron las células Hela y las células CHO (células derivadas de ovario de hámster chino). Se sembraron en botellas de cultivo de 25 cm² en 5 ml de medio y se incubaron. A los

seis días cuando alcanzaron una confluencia alta, es decir, había poco espacio entre las células se subcultivaron y se incubaron por 24 horas. Se realizó el conteo de células por medio de la cámara de Neubauer ya que era necesario controlar los cambios en la densidad celular una vez se agregara el extracto de té; se sembraron 3 cajas de 24 pozos por cultivo en las cuales se agregaron 50.000 células por pozo y se incubaron para que las células se adhirieran a la placa. Cuando se retiraron de la incubadora al día siguiente y se observaron, las células Hela presentaban un color rosado claro característico de este tipo de cultivo en medio. Sin embargo, las células CHO mostraron un color entre blanquecino y amarillento que no se esperaba y que no es característico, lo que permitió concluir que el cultivo se encontraba contaminado.

La contaminación de líneas celulares bacteriana y fúngica (incluyendo hongos y levaduras se detecta fácilmente, ya que estos organismos causan un aumento en la turbidez, un cambio en el pH del medio (cambio de color del medio) y destrucción de las células. A pesar que el medio de estas células (CHO) contenía antibiótico para precisamente prevenir este tipo de problemas, el uso habitual de antibióticos en cultivos conduce al desarrollo de organismos resistentes. (Mirjalili, Parmoor, Moradi Bidhendi, & Sarkari, 2005). Según la turbidez del medio y el color que adquirió se llegó a la conclusión que la causa era de tipo biológica y que correspondía a hongos.

La introducción de contaminación a un cultivo puede darse por errores del operador, por técnicas de manipulación del cultivo, por la atmosfera, las superficies, los materiales y por los medios. (Mirjalili, Parmoor, Moradi Bidhendi, & Sarkari, 2005) Lo primero que es importante resaltar, es que la fuente de contaminación no fue la atmosfera de la incubadora, ya que allí también se encontraba el cultivo de células Hela y este no se contaminó. Por otro lado, siempre se utilizó la luz UV previo a la utilización de la cabina de flujo laminar y se siguieron los protocolos de desinfección previos y posteriores apropiados. De igual manera, los materiales empleados se habían auto clavado antes de usarlos. De acuerdo a lo anterior, se infiere que alguna técnica de manipulación fue realizada incorrectamente o que el medio estaba contaminado.

Los efectos adversos de la contaminación en la línea de células de crecimiento pueden ser problemas graves que causan la pérdida de cultivos y experimentos enteros o grandes catástrofes que afectan la validez del trabajo actual. Como consecuencia de este hecho, el extracto concentrado de té verde solo se evaluó en el cultivo de células Hela debido a que no se contaban con más células CHO, ni con más recursos para adquirirlas nuevamente.

Se estableció que el extracto se evaluaría en seis concentraciones diferentes, se asignó un blanco negativo que solo contenía las células y un blanco positivo que fue el cisplatino. El estudio se diseñó de tal forma que cada concentración del extracto, y cada blanco se evaluaría por triplicado y a su vez que el experimento se

realizaría tres veces para que la confiabilidad del ensayo fuera mayor y para que los resultados del análisis estadístico posterior arrojara que correspondía a un ensayo significativo, válido y reproducible.

Una vez se tenían las placas con las células adheridas, se agregó la cantidad de extracto y de cisplatino en los pozos rotulados y se incubaron a 37 °C y 5% de humedad para que las células interactuaran con él. Al sacarlas, se tripsinizaron con el objetivo de desprenderlas de la placa y con la intención de contarlas nuevamente para tener un registro del cambio. Desafortunadamente, las células no lograron desprenderse de la placa ni con la tripsinización, ni con asistencia mecánica. Por lo tanto, no fue posible realizar el conteo comparativo por medio del azul de Tripano y no se puede concluir si el extracto de té verde tiene propiedades anticancerígenas o proliferativas debido a que las células murieron fijadas a la placa. Este resultado se le atribuye al etanol que durante el proceso de roto evaporación no se logró eliminar, es decir, a la falta de liofilización del extracto.

Ante esta limitante se describirán a continuación los resultados esperados según la literatura y las recomendaciones oportunas para proyectos que pretendan evaluar la evaluación del extracto de camellia sinensis sobre cultivos celulares.

(Opare Kennedy, y otros, 2001), evaluaron el té verde sobre células tumorales (erlich ascites tumor cells), en las mismas condiciones de temperatura y humedad relativa que las utilizadas en este proyecto. De igual manera, utilizaron etanol para disolver el extracto. En su ensayo de viabilidad celular realizado con azul de tripán obtuvieron una disminución del crecimiento de las células tumorales, principalmente cuando utilizaban solo el polifenol EGC (Epigallocatequina), tal y como se muestra en la siguiente gráfica:

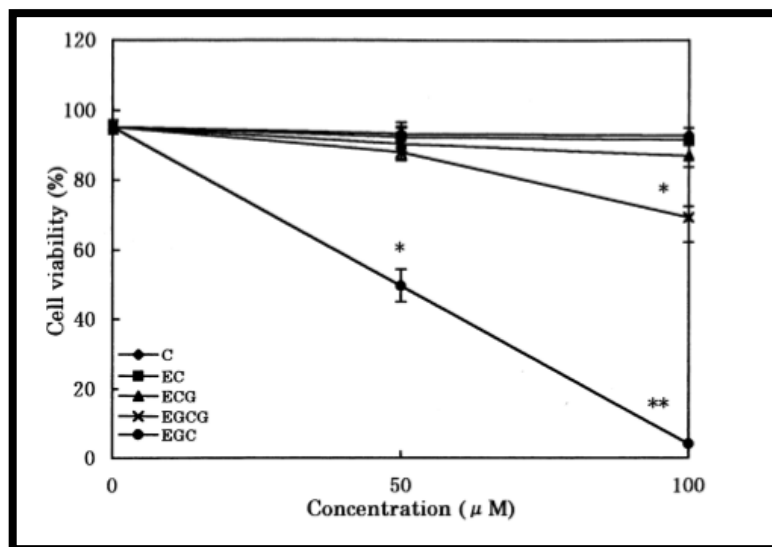


Ilustración 14- Efecto de los polifenoles del té verde sobre la viabilidad celular mediante la utilización del azul de tripano.

Opere Kennedy, D. Kojima , A. Hasuma, T. Yano ,Y. Otani, S. Matsui-Yuasa, I. (c.2001) Epimerización de las catequinas. (Imagen) Growth inhibitory effect of green tea extract and (-)-epigallocatechin in Ehrlich ascites tumor cells involves a cellular thiol-dependent activation of mitogenic-activated protein kinases. PubMed.gov “Obtenido de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/113112092>”.

En cuanto a la especificidad de los componentes del té verde sobre células cancerígenas y sanas, (Chen, Schell, Ho, & Chen, 1998), compararon la acción de la epigallocatequina galato (EGCG) sobre fibroblastos humanos viralmente transformados (WI38VA) con células normales (WI38). Ellos expusieron las células a 200µM de EGCG por 8 horas y hallaron que más del 50% de las células WI38VA en un cultivo confluyente se convirtieron en células apoptóticas. En contraste, tiene muy poco o no tiene efecto sobre el crecimiento de las células sanas (menos del 1% mostraron apoptosis bajo las mismas condiciones). Obtuvieron los mismos resultados acerca de la inhibición diferencial del crecimiento observando líneas celulares de cáncer humano colorectal (Caco-2) y cáncer de seno (Hs578T) y sus respectivas células sanas. Estas teorías se demostraron por medio de un ensayo terminal de deoxinucleotidil transferasa. (Chen, Schell, Ho, & Chen, 1998).

Posteriormente, Carvalho y colaboradores (2010) realizaron pruebas con té verde sobre líneas celulares renales (A-498 y 769-P), por medio de un ensayo MTT. Este ensayo se basa en la " reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular“.La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. Dentro de sus resultados, obtuvieron que al evaluar 5 concentraciones del extracto, el té verde inhibía el crecimiento de ambas líneas celulares renales de manera directamente proporcional a la concentración. El efecto inhibitorio estuvo entre rangos de 26% a 97% (Carvalho, Jerónimo, Andrade, & Silva , 2010).

En estudios in vivo, se ha demostrado la misma tendencia. El efecto inhibitorio de la epigallocatequina galato y en general del extracto de té verde fue evaluado sobre el cáncer previamente inducido en el duodeno, en el estómago, y en el colon de ratones. Los resultados que obtuvieron mostraron que las catequinas del té verde inhibían la carcinogénesis del tracto gastrointestinal de los roedores. Los investigadores determinaron que 1 g por día de *Camellia sinensis* podría ser una dosis efectiva, basándose en epidemiología y hallazgos experimentales. (Yamane, y otros, 1996).

Finalmente, se realizó una prueba sobre artemia salina para conocer la citotoxicidad de las catequinas del té. Sin embargo, se evidenció nuevamente el problema causado por no haber podido liofilizar el extracto. Pasadas las 24 horas posteriores al sometimiento de las larvas a la acción del té, el etanol había fijado completamente las larvas al fondo de cada pozo en todas las concentraciones evaluadas, matando

el 100%. Las únicas larvas que sobrevivieron fueron las del blanco, a las cuales no se les había agregado el extracto.

Por lo expuesto, no fue posible determinar la citotoxicidad. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la metodología implementada en la oclusión de los huevos, en la preparación de las diluciones y en el conteo inicial de las larvas fueron las correctas. Se tuvo además en cuenta que las larvas son óptimas para este tipo de pruebas después de 24 horas bajo la luz artificial y la simulación con sal marina y oxígeno de su hábitat original.

De manera que, se expondrán las ventajas de utilizar este tipo de organismo en pruebas de citotoxicidad y que se esperaba del experimento.

Para empezar, se esperaba que el extracto matara un porcentaje de las larvas dependiendo de la concentración utilizada. En el caso que fuera altamente tóxico, (que no era lo esperado) podrían haber muerto la mayoría; pero no fijarse al pozo completamente, ya que en este caso lo que sucedió fue que el etanol mató las larvas y no los componentes del extracto.

Los estudios de evaluación de citotoxicidad de extractos de plantas sobre células tumorales, representan evidencias experimentales en la búsqueda de nuevos compuestos antitumorales. Estos ensayos han sido empleados de forma rutinaria como métodos de tamizaje de extractos naturales y compuestos puros con potencialidades en la terapia contra el cáncer. (Singh & Katiyar, 2013)

Debido a la bioética, actualmente el uso de animales en laboratorios de pruebas toxicológicas es limitado (Yajes, 1997), y la artemia salina es un crustáceo cuya larva es sensible a múltiples sustancias, se ha convertido entonces en una opción utilizarlas como un ensayo rápido y simple para predecir la toxicidad de extractos de plantas. (Cáceres A. , 1996)

Algunos autores exponen que no existe correlación entre los ensayos realizados con las larvas y los efectos toxicológicos en el animal entero. (Cáceres A. , 1996). Sin embargo, (Ohno, y otros, 1997) realizaron la evaluación toxicológica de 20 extractos de plantas usando métodos “in vivo” e “in vitro” que mostraron una buena correlación ($r = 0,85$ con $p < 0.05$), lo que sugiere que las larvas de artemia salina constituyen un organismo modelo útil.

Adicionalmente, a diferencia de un ensayo colorimétrico de LDH (el cual se había propuesto en el anteproyecto), este bioensayo ofrece un bajo costo, no requiere extrema asépsis, y permite que una gran cantidad de muestras en diferentes concentraciones sean probadas y procesadas adecuadamente.

Estudios realizados por (Babich, Krupka, Nissim, & Zuckerbraun, 2005), muestran que la citotoxicidad de la epigalocatequina galato es mayor para las células cancerígena que para las células sanas, y otros realizados por (Singh & Katiyar,

2013), han sugerido que la EGCG, el compuesto más abundante del té verde fue el principal agente en la mediación de las propiedades preventivas del cáncer atribuidas al té. Sin embargo, el resultado anterior no excluye las demás catequinas ya que ellos mismos lograron demostrar que la mezcla de polifenoles interactúan sinérgicamente sobre las células cancerígenas mediante un ensayo de la actividad de la caspasa-3. Es de gran relevancia resaltar que este último estudio en el cual se está haciendo énfasis fue realizado sobre células de la cavidad oral humana, que como se mencionó es el tipo de cáncer sobre el cual se basa el motor de este proyecto (HSC-2, HGF-2).

Las fallas en el equipo de liofilización y la falta de recursos económicos para nuevas líneas celulares causaron resultados que no permiten concluir que las catequinas del té verde tienen un efecto sobre células cancerosas o sanas, a pesar de las soluciones que se plantearon ante las adversidades descritas con asesoría profesional. Sin embargo, vale la pena incursionar en la reproducibilidad de la metodología propuesta en este proyecto para obtener evidencia concluyente sobre los efectos de la planta *Camellia sinensis*.

4.7 CONCLUSIONES

- Se extrajeron las catequinas del té verde, se identificó la epigalocatequina galato, se semicuantificó mediante una curva de calibración realizada mediante su estándar y se procesó mediante el software ImageJ.
- Se determinó que son necesarios ajustes en las metodologías de extracción para evitar que la acción del solvente impida evaluar los efectos de las catequinas del té verde.
- No fue posible determinar la acción proliferativa y/o anticancerosa del extracto de *Camellia sinensis*, debido a las limitantes económicas y de procesos (costos de líneas celulares, equipos de liofilización, medios de cultivo). Sin embargo, la revisión bibliográfica da fuertes indicios de la acción dependiente de la concentración que tienen las catequinas del té verde, especialmente la epigalocatequina galato, sobre la viabilidad celular diferencialmente sobre células cancerígenas.
- Es necesario contar con equipos y laboratorios óptimos, especialmente de liofilización, ya que se considera que la omisión de este proceso fue la principal limitante para lograr los objetivos propuestos.

4.8 RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar una extracción acuosa del material vegetal con el fin de evitar la fijación de las células y las larvas causada por el etanol.
- Se recomienda liofilizar la muestra aun si el extracto es acuoso.
- Se recomienda utilizar antibióticos de amplio espectro en los medios de cultivos de las células y seguir detenidamente los protocolos de técnica aséptica para evitar contaminaciones.
- Se recomienda monitorear constantemente cambios morfológicos, de color y de pH en los frascos de cultivo de las células, para detectar indicios de contaminación.
- Se recomienda seguir utilizando las larvas de artemia salina para realizar la prueba de toxicidad, ya que supone un ahorro de tiempo y recursos, debido a su simplicidad y rapidez.
- Se recomienda retomar el proyecto, ya que si bien el té verde no constituye la solución definitiva al cáncer como tal, si hay indicios que permiten considerarlo como un tratamiento paleativo y que mejoraría la calidad de vida de los pacientes con cáncer oral y bucofaríngeo tratados en la Fundación Valle del Lili inicialmente.

4.9 BIBLIOGRAFÍA

- American Cancer Society. (2008). *Global cancer facts & figures*. Recuperado el 13 de Marzo de 2014, de <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-027766.pdf>
- Babich, H., Krupka, M., Nissim, H., & Zuckerbraun, H. (2005). *Elsevier*, 231-242.
- Babich, H., Zuckerbraun, H. L., & Weinerman. (2007). In vitro cytotoxicity of (-) catechin gallate. a minor polyphenol in green tea. *Elsevier*, 171-180.
- Brahma , N., Sharmila , S., & Rakesh , K. (2011). Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Mechanisms, perspectives and clinical applications. *ELSEVIER*.
- Brown, R., & Brown, U. (1999). *Cytotoxic Drug Resistance Mechanisms*. Humana Press.
- Cáceres, A. (1996). *Plantas de Uso Medicinal en Guatemala* (1 ed ed.). Guatemala: San Carlos de Guatemala. Recuperado el 20 de 12 de 2014
- Cáceres, R. Á. (2007). *Estadística aplicada a las ciencias de la salud*. España : Ediciones Díaz de Santos.
- Cairns, J. (Noviembre de 1985). *The treatment of diseases and the war against cancer*. Recuperado el marzo de 2014, de Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4071033>
- Carvalho, M., Jerónimo, C., Andrade, P., & Silva , B. (2010). Green tea: A promising anticancer agent for renal cell carcinoma. *Elsevier*, 230-237.
- Chen, Z., Schell, J., Ho, C., & Chen, K. (1998). Green tea epigallocatechin gallate shows a pronounced growth effect on cancerous cells but not on their normal counterparts. *Cancer Lett*, 173-179.
- Cultek. (2008). *Documento de Aplicación*. Recuperado el 3 de Mayo de 2014, de http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Cultivos%20Celulares/Aplica_Cultivos_Celulares_2007.pdf
- Dumitrascu, M. (02 de 01 de 2011). *balneo-reserch journal*. Obtenido de <http://bioclima.ro/J244.pdf>

- Durán, R., Valle, A., Villa, X., & Mujica, B. (2004). IMPORTANCIA BIOLÓGICA DEL MANTENIMIENTO DE LÍNEAS CELULARES ESTABLES. *Revista Digital CENIAP HOY*. Recuperado el 4 de Mayo de 2014, de www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/ne/arti/duran_r1/arti/duran_r1.htm
- Global Health Observatory (GHO). (2012). *World Health Organization*. Recuperado el 20 de Marzo de 2014, de Cancer mortality and morbidity: http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/cancer/en/
- Gupta, S., Hussain, T., & Muhktar, H. (2003). Molecular pathway for (-)-epigallocatechin-3-gallate-induced cell cycle arrest and apoptosis of human prostate carcinoma cells. *ELSEVIER*. Recuperado el 6 de Mayo de 2014
- Jain, N., Siddiqi, M., & Weisburger, J. (2006). *Protective Effects of Tea on Human Health*. Oxfordshire, UK: CABI. Recuperado el Abril de 2014
- Kang, W.-S., Lim, I.-H., Yuk, D.-Y., Chung, K., Park, J.-B., & Yoo, H.-S. (1999). Antithrombotic activities of green tea catechins and (-) Epigallocatechin gallate. *thrombosis research*, 229-237.
- Kasper, J., Winter, G., & Friess, W. (2013). Recent advances and further challenges in lyophilization. *Elsevier*, 163-167.
- Kuete, V., Krusche, B., Youns, M., Voukeng, I., Fankan, A., Tankeo, S., . . . Efferth, T. (2011). Cytotoxicity of some Cameroonian spices and selected medicinal plant extracts. *Elsevier*, 803-812.
- Lagarto Parra, A., Silva Yhebra, R., Guerra Sardiñas, I., & Iglesias Buena, L. (2008). Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, 395-400.
- Laza Loaces, D., Rodríguez, I., & Sardiña Cabrera, G. (2003). *Descubrimiento y desarrollo de agentes cancerígenos derivados de plantas medicinales*. Recuperado el 1 de Mayo de 2014, de *Rev Cubana Plant Med*: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962003000300012
- Lazo, J. (2010). *Ensayo de artemia: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales*. SciELO. Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S10107522010000100008&script=sci_arttext&tlng=pt

- López, A. (2013) Metodología para la determinación de epigallocatequina galato en té verde por uplc-pda. 40-50. Recuperado el 10 de Diciembre de 2014."Obtenidode:http://bibliotecadigital.icesi.edu.co/biblioteca_digital/bitstream/10906/76827/1/metodologia_epigallocatequina_galato.pdf
- Martín-Hernán, F., Hernández, J. G., Cano, J., Campo, J., & Romero, J. d. (2013). Oral cancer, HPV infection and evidence of sexual transmission. *Oral Medicine and Pathology*, e439-e442. Recuperado el 28 de Abril de 2014
- Mereles, D., & Hunstein, W. (2011). Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) for clinical trials: More pitfalls than promises? *International Journal of Molecular Science*, 5593-5595. Recuperado el Marzo de 2014
- ministerio de salud y protección social. (2014). *Comportamiento biológico y epidemiológico del cancer en Colombia*. Recuperado el 29 de Marzo de 2014, de instituto nacional de cancerología: <http://www.cancer.gov.co/documentos/Planeacion/Macroproyecto%20Investigaciones%202013-2016.pdf>
- Mirjalili, A., Parmoor, E., Moradi Bidhendi, S., & Sarkari, B. (2005). Microbial Contamination of cell cultures: A 2 years study . *science direct*, 82-86.
- *molecular devices*. (02 de 01 de 2015). Obtenido de <http://www.moleculardevices.com/applications/areas-research/cytotoxicity>
- Nishi, S. (2006). *HeLa Cells*. Recuperado el 2 de Mayo de 2014, de Ezine Articles: <http://ezinearticles.com/?Hela-Cells&id=3748570>
- Ohno, Y., Kaneko, Y., Inove, T., Morikawa, T., Yoshida, A., Fujii, A., . . . Matsukawa, K. (1997). *Interlaboratory Validation of alternative methods to the eye irritation test for safety evaluation*. Welfare and ethics .
- Okelo, E., Mcdougall, G., Kumar, S., & Seal, C. J. (2011). In vitro protective effects of Colon-available extract of Camellia Sinensis (tea) against hydrogen peroxide and beta amyloid induced cytotoxicity in differentiated PC12 cells. *ELSEVIER*. Recuperado el 1 de Mayo de 2014
- Opare Kennedy, D., Kojima, A., Hasuma, T., Yano , Y., Otani, S., & Matsui-Yuasa, I. (2001). Growth inhibitory effect of green tea extract and (-)-epigallocatechin in Ehrlich ascites tumor cells involves a cellular thiol-dependent activation of mitogenic-activated protein kinases. *Elsevier*, 114-129.

- Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., & Flower, R. J. (2008). *Farmacología* (Ed. Sexta ed.). Barcelona: ELSEVIER. Recuperado el 5 de Mayo de 2014
- Ross, I. A. (2005). *Medicinal Plants of the World: Chemicals constituents, Modern and Traditional Medical Uses. Volume 3.* totowa, New Jersey: Humana Press.
- Singh, T., & Katiyar, S. (2013). Green tea polyphenol, (-)-epigallocatechin-3-gallate, induces toxicity in. *Elsevier*, 421-424.
- SINIJA, V. R., & MISHRA, H. N. (2008). Green tea: Health benefits. *INFORMA healthcare*, 2-3. Recuperado el Marzo de 2014
- Sociedad Española de Oncología médica. (2012). *oncosaludable*. Obtenido de guía de terapias integrativas: <http://www.oncosaludable.es/es/inicio/terapias-integrativas>
- Stewart, B. W., & Wild, C. P. (2014). *World Cancer Report*. Recuperado el 6 de Mayo de 2014, de World Health Organization: <http://whocp3.codemantra.com/Marketing.aspx?ID=WCR2014&ISBN=9789283204299&sts=b>
- Sudathip, S.-t., Grove, K., & Lambert, J. (2011). Weight control and prevention of metabolic syndrome by green tea. *Elsevier*, 147-152.
- Thangapazham, R. L., Passi, N., & Maheshwari, R. K. (2007). Green Tea Polyphenol and Epigallocatechin Gallate Induce Apoptosis. *Lands Bioscience*, 1940-1945. Recuperado el 3 de Mayo de 2014
- Universidad Nacional de Quilmes. (2012). *Guía de TP Nro. 2 Mantenimiento de líneas celulares*. Recuperado el 1 de Mayo de 2014
- Vuong, Q., Golding, J., Nguyen, M., & Roach, P. (2010). *Extraction and isolation of catechins from tea*.
- Warnakulasuriya, S. (2009). Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *ELSEVIER*, 310-313. Recuperado el 1 de Mayo de 2014
- Weinberg, R. A. (2007). *the biology of CANCER* (3rd ed.). Oxford, UK: Garland Science, Taylor & Francis Group. Recuperado el 10 de Abril de 2014
- Yamane, T., Nakatani, H., Kikuo, N., Matsumoto, H., Iwata, Y., Kitao, Y., & Takahashi, T. (1996). Inhibitory effects and toxicity of green tea polyphenols for gastrointestinal carcinogenesis. *Cancer*, 1662–1667.

- Yamauchi, R., Sasaki, K., & Yoshida, K. (2009). Identification of epigallocatechin-3-gallate in green tea polyphenols as a potent inducer of p53-dependent apoptosis in the human lung cancer cell line A549. *ELSEVIER*, 4-5. Recuperado el 28 de Abril de 2014
- Yu, Z., Qin, X., Gu, Y., Chen, D., Cui, Q., Jiang, T., . . . Dou, Q. (2008). Prodrugs of Fluoro-substituted Benzoates of EGC as Tumor Cellular Proteasome Inhibitors and Apoptosis Inducers. *International Journal of Molecular Sciences*, 952. Recuperado el 1 de Mayo de 2014
- Zaveri, N. (2006). Green tea and its polyphenolic catechins: Medicinal uses in cancer and noncancer applications. *elsevier*, 2074-2079.

