

**Universidad Católica Santa María**  
**Facultad De Ciencia Farmacéuticas, Bioquímicas Y**  
**Biotechnológicas**  
**Escuela Profesional de Ingeniería Biotechnológica**



**DETERMINACIÓN DE LA ACCIÓN IN VITRO DEL EXTRACTO  
METANÓLICO DE CEDRÓN (*LIPPIA CITRIODORA*) SOBRE  
CÉLULAS DE MELANOMA INHIBIENDO LA MELANOGÉNESIS  
Y SOBRE LA ACTIVIDAD IN VITRO DE LA ENZIMA  
TIROSINASA SOBRE EL SUSTRATO L-TIROSINA.**

*Tesis presentada por la Bachiller:*

*Cruz Mamani, Xiomara Elizabeth*

*Para optar el Título Profesional de:*

*Ingeniera biotecnóloga*

*Asesor: Ing. Carpio Carpio, José*

**Arequipa – Perú**

**2017**

FORMATO DE TITULACION PROFESIONAL

DE: CRUZ MAMANI, Xiomara Elizabeth

TITULO DEL PROYECTO DE TESIS:

"DETERMINACION DE LA ACCION IN VITRO DEL EXTRACTO METANOLICO DE CEDRON (Lippia citriodora) SOBRE CELULAS DE MELANOMA HUMANA COMO INHIBIDOR DE LA MELANOGENESIS Y ACTIVADOR DE APOPTOSIS CELULAR (CASPASAS 3 Y 7)"

DICTAMINADORES: 1) Blgo. Carlos Paz Aliaga 2) Mgter. Julitza Paredes Fuentes

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis informa que, hechas las observaciones y subsanadas las correcciones, consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

Atentamente

Firmas:



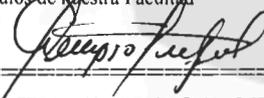
(Devolver antes de 8 días hábiles)

Fecha 19 de julio 2017

ASESOR: Mgter. José Carpio Carpio

DICTAMEN DE ASESOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesor del trabajo de investigación presentado por la recurrente, tengo a bien informar que luego de verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes y debiendo cambiar el título a: "DETERMINACION DE LA ACCION IN VITRO DEL EXTRACTO METANOLICO DE CEDRON (Lippia citriodora) SOBRE CELULAS DE MELANOMA INHIBIENDO LA MELANOGENESIS Y SOBRE LA ACTIVIDAD IN VITRO DE LA ENZIMA TIROSINASA SOBRE EL SUSTRATO L-TIROSINA", considero que el presente trabajo está APTO para continuar con el trámite, en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad

Atentamente  
Firma



Fecha 13 de Noviembre 2017

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) Dra. Yenny López Valencia 3) Mgter. Julitza Paredes Fuentes  
2) Blgo. Carlos Eitel Paz Aliaga

DICTAMEN DE BORRADOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, atendiendo a su designación como Dictaminadores del presente Borrador de Tesis y luego de hechas las observaciones y correcciones pertinentes, cumpliendo con las exigencias mínimas establecidas para un trabajo de investigación de Tesis profesional, es que consideramos APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

Firma

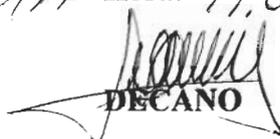


(Devolver antes de 15 días hábiles) Fecha 06/12/2017

JURADOS: Presidente  
Vocal  
Secretario

SUSTENTACIÓN DE TRABAJO:

Fecha: 13/12/17 Hora: 19.00 Local: C- 402 (SUM)



DECANO

## DEDICATORIA

*Dedico esta tesis, primeramente a DIOS, por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor, a mis padres y hermanos, quienes han sido la guía, inspiración y fortaleza para poder llegar hasta donde estoy, porque con su ejemplo, dedicación y palabras de aliento me impulsaron a seguir adelante, a mi enamorado, quien me impulso y me apoyo a lo largo de la elaboración de esta tesis, a mis amigos por su amistad sincera y a mis docentes que me asesoraron y guiaron a lo largo de esta tesis.*

*Con su bendición sé que lograre lo que me proponga.*

*En memoria de mi abuela Francisca, a quien quiero y extraño mucho, y otros seres que a lo largo de este camino me acompañaron y ya no están conmigo.*

## AGRADECIMIENTOS

*Agradezco a Dios, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.*

*A mis padres Enrique e Ysabel, por todo el apoyo brindado a lo largo de mi vida, por ser un gran ejemplo y por promover el desarrollo y la unión familiar en nuestra familia.*

*A mi hermana Jhosselyn, por ser un gran apoyo a lo largo de mi carrera y mi amiga incondicional.*

*A mis hermanos Axell y Hendrick, por enseñarme que no necesitas un motivo para reír o para disfrutar y valorar todo lo que nos rodea.*

*Al Instituto Regional de Enfermedades Neoplásicos del Sur (IREN SUR), por brindarme generosamente el material que necesitaba para realizar este estudio*

*Al personal del Instituto Regional de Enfermedades Neoplásicos del Sur (IREN SUR), por su cálido trato, guía y apoyo para la obtención del material que necesitaba.*

*A mi alma mater la Universidad Católica de Santa María, pero sobre todo a mi Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica, por darme la oportunidad de estudiar y ser una profesional de éxito con principios morales y éticos.*

*A la empresa SELMEC-IM S.R.L, por creer en la investigación y apoyar económicamente en este estudio.*

*A la Dra. Luz Ventura por su asesoramiento y confiar en mí para realizar este estudio*

*A la Dra. Belsi Giraldi, por su apoyo, asesoramiento, carisma y confianza.*

*A mi asesor el Ing. José Carpio, por brindarme apoyo y asesoramiento.*

*A mis dictaminadores, la Mgter. Julitza Paredes, el Dr. Iván Paz y la Dra. Yenny López, por su paciencia, brindarme apoyo, asesoramiento y contribuir en mi formación profesional.*

*Al personal de laboratorio y administrativo de la Universidad Católica de Santa María, por su paciencia, ayuda y guía en el desarrollo de este estudio.*

*A mis amigos, por todos los momentos que pasamos juntos y por la confianza que en mí depositaron.*

*A mi enamorado, Hugo, quien me impulso, me apoyo y siempre busco la manera de que yo lo lograra. Por ser mi mejor amigo.*

*Son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional y a las que me encantaría agradecer su amistad, apoyo, ánimo y compañía en todos los momentos que pasamos juntos.*

*Para todos ellos: Muchas gracias y que Dios los bendiga.*

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	i
ABSTRACT.....	iii
INTRODUCCIÓN.....	iv
OBJETIVOS .....	vi
HIPÓTESIS .....	vii
VARIABLES E INDICADORES .....	viii
CAPITULO I.....	1
MARCO TEÓRICO .....	1
1.1.    LA PIEL.....	1
1.1.1.    ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA .....	1
1.1.1.1.    EPIDERMIS .....	1
1.1.1.2.    DERMIS .....	4
1.1.1.3.    HIPODERMIS .....	5
1.2.    MELANOGÉNESIS.....	5
1.2.1.    MELANINA:.....	8
1.2.2.    MELANOCITO.....	9
1.2.3.    PREMELANOSOMA Y MELANOSOMA.....	10
1.2.4.    TIROSINASA.....	12
1.2.4.1.    CINÉTICA ENZIMÁTICA.....	13
1.2.4.2.    INHIBIDORES ENZIMÁTICOS DE LA TIROSINASA .....	13
1.3.    PATOLOGÍAS .....	14
1.3.1.    MELANOMA HUMANO .....	14
1.3.1.1.    RADIACIÓN SOLAR.....	16
1.3.1.2.    DIAGNOSTICO .....	19
a.    ANTÍGENOS ASOCIADOS AL MELANOMA .....	19

b.	PROTEÍNA S100.....	20
c.	HMW-MAA.....	20
d.	ANTÍGENO NK1/C3.....	20
e.	ANTÍGENO HMB-45.....	20
1.3.1.3.	GENES IMPLICADOS.....	21
a.	CDKN2A (Cyclin dependent kinase inhibitor 2A).....	21
b.	CDK4.....	23
c.	BRAF.....	23
d.	MC1R.....	24
e.	MITF (Microftalmia).....	25
1.3.1.4.	INCIDENCIA.....	26
1.4.	CEDRÓN ( <i>Lippia citriodora</i> ).....	29
1.4.1.	CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA.....	29
1.4.2.	CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS.....	30
1.4.3.	UBICACIÓN.....	30
1.4.4.	USOS MEDICINALES.....	31
1.4.5.	COMPOSICIÓN QUÍMICA.....	31
1.5.	METODOLOGÍA DE ESTUDIO.....	32
1.5.1.	CULTIVO CELULAR.....	32
1.5.1.1.	CULTIVO CELULAR PRIMARIO.....	32
1.5.1.2.	DENSIDAD CELULAR (VIABILIDAD Y CONTEO CELULAR)	
	33	
1.5.2.	EXTRACCIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS DE UNA PLANTA.....	34
1.5.3.	ENZIMA.....	34
1.5.4.	ESPECTROMETRÍA.....	36
1.5.4.1.	ENSAYO DE ABSORCIÓN UV.....	36

CAPITULO II.....	37
MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
2.1.    MATERIALES.....	37
2.1.1.    INSUMOS.....	37
2.1.2.    MATERIALES DE LABORATORIO.....	37
2.1.3.    MATERIAL DE VIDRIO.....	38
2.1.4.    MATERIAL BIOLÓGICO.....	38
2.1.5.    REACTIVOS QUÍMICOS.....	38
2.1.6.    MEDIOS DE CULTIVO.....	39
2.1.7.    EQUIPOS DE LABORATORIO.....	39
2.1.8.    OTROS MATERIALES.....	40
2.2.    MÉTODOS.....	40
2.2.1.    RECOLECCIÓN Y OBTENCIÓN DE EXTRACTO DE CEDRÓN ( <i>Lippia citriodora</i> ).....	40
2.2.2.    OBTENCIÓN DE CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO.....	42
2.2.3.    PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO CELULAR.....	42
2.2.4.    CULTIVO DE CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO.....	43
2.2.5.    CULTIVO DE CÉLULAS DE RATÓN (MACRÓFAGOS).....	44
2.2.6.    TRATAMIENTO DE CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO Y CÉLULAS DE MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN ( <i>Mus Musculus</i> ) CON EXTRACTO DE CEDRÓN ( <i>Lippia citriodora</i> ).....	45
2.2.7.    EVALUACIÓN DE VIABILIDAD DEL CULTIVO CELULAR.....	45
2.2.8.    EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA CON Y SIN EXTRACTO DE CEDRÓN ( <i>Lippia citriodora</i> ).....	46
2.2.9.    ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	46
CAPITULO III.....	47
RESULTADOS.....	47

3.1	RECOLECCIÓN Y OBTENCIÓN DE EXTRACTO DE CEDRÓN ( <i>Lippia citriodora</i> ).....	47
3.2	OBTENCIÓN DE CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO .....	48
3.3	PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO CELULAR .....	49
3.4	CULTIVO DE CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO.....	50
3.5	CULTIVO DE CÉLULAS DE RATÓN (MACROFAGOS).....	50
3.6	TRATAMIENTO DE CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO Y CÉLULAS DE MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN ( <i>Mus Musculus</i> ) CON EXTRACTO DE CEDRÓN ( <i>Lippia citriodora</i> ).....	52
3.7	EVALUACIÓN DE VIABILIDAD DEL CULTIVO CELULAR.....	54
3.8	EVALUACIÓN DE LA DE LA CINÉTICA CON Y SIN EXTRACTO DE CEDRÓN ( <i>Lippia citriodora</i> ).....	57
	DISCUSIONES .....	63
	CONCLUSIONES .....	65
	RECOMENDACIONES.....	67
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	68
	ANEXOS .....	77

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura de la piel (11) .....	2
Figura 2.	Esquema de los estratos de la Epidermis (12) .....	2
Figura 3.	Esquema de melanocito y su función (Producción de melanina) (19) .....	6
Figura 4.	Síntesis de Melanina. (20) .....	7
Figura 5.	Síntesis de melanina en relación al receptor MC1R. (23) .....	8
Figura 6.	Melanocito (25) .....	9
Figura 7.	Formación de Melanosomas y Melanina (14) .....	11
Figura 8.	Estructura de tirosinasa (TYR) (PDB: 1js8), .....	12
Figura 9.	Melanoma lentiginoso acro (MLA) (34) .....	14
Figura 10.	El ABCDE para detectar un melanoma (39) .....	17
Figura 11.	Impacto de las radiaciones solares (40) .....	18
Figura 12.	Formación de dímeros de timinas (42) .....	18
Figura 13.	Genes implicados en el Melanoma Humano (6).....	22
Figura 14.	Alteración del gen CDKN2A. (43) .....	23
Figura 15.	Vía de señalización del oncogén BRAF (44).....	24
Figura 16.	Mutación del Gen MITF .....	25
Figura 17.	Cedrón (47) .....	30
Figura 18.	Cámara de Neubauer (56) .....	33
Figura 19.	Acción general de una enzima (61) .....	34
Figura 20.	Curva de formación de producto con respecto al tiempo. (63).....	34
Figura 21.	Actividad inhibitoria reversible de una enzima (64) .....	35
Figura 22.	Rango de Espectrometría (67) .....	36
Figura 23.	Medio DMEM enriquecido.....	49
Figura 24.	Ratón ( <i>Mus Musculus</i> ) .....	51

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

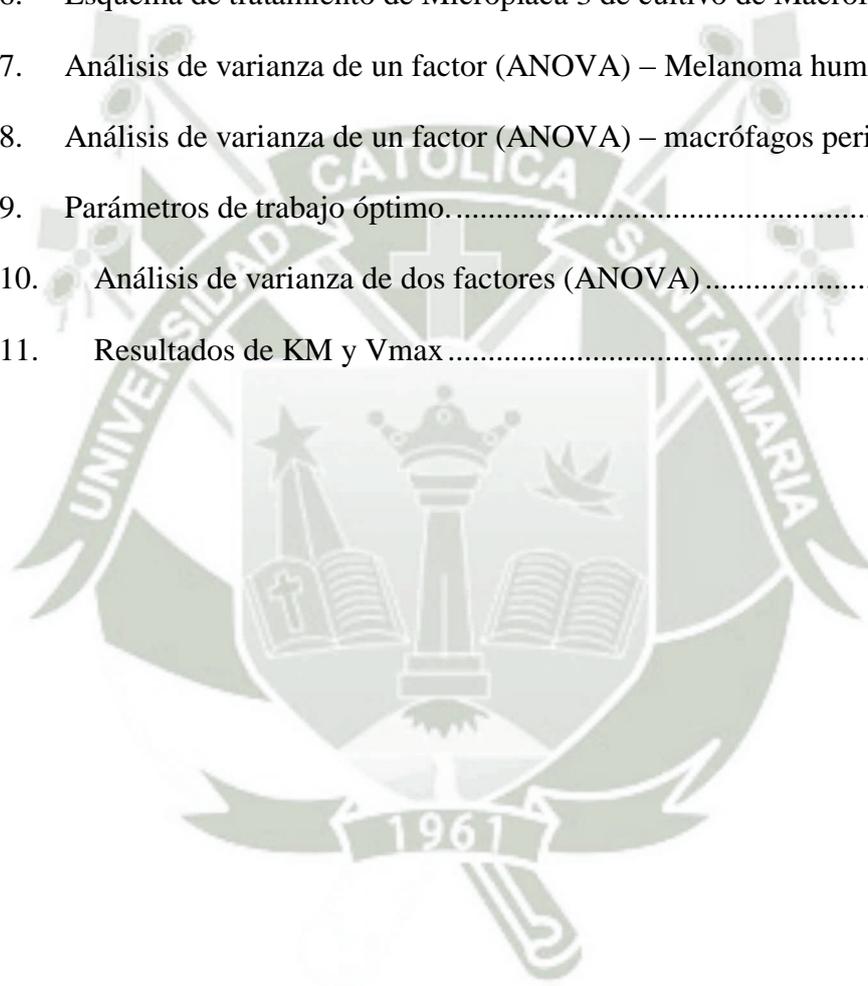
Gráfica 1.	Cantidad de células aproximadamente en la Epidermis. ....	4
Gráfica 2.	Melanoma maligno según género del paciente en IREN-SUR.....	26
Gráfica 3.	Melanoma maligno según lugar de procedencia del paciente en IREN-SUR .....	27
Gráfica 4.	Melanoma maligno según estado del paciente en IREN-SUR .....	27
Gráfica 5.	Melanoma maligno según tipo de seguro de paciente en IREN-SUR .....	28
Gráfica 6.	Melanoma maligno según tipo de diagnóstico en pacientes en IREN-SUR. .....	28
Gráfica 7.	Melanoma maligno según diagnóstico clínico en pacientes en IREN-SUR. .....	29
Gráfica 8.	Obtención de extracto de Cedrón ( <i>Lippia citriodora</i> ). ....	41
Gráfica 9.	Preparación de medio DMEM enriquecido. ....	42
Gráfica 10.	Cultivo de Células de Melanoma.....	43
Gráfica 11.	Cultivo de células de macrófagos peritoneales de Ratón ( <i>Mus musculus</i> ) (Parte I) .....	44
Gráfica 12.	Cultivo de células de macrófagos peritoneales de Ratón ( <i>Mus musculus</i> ) (Parte II) .....	45
Gráfica 13.	Obtención de concentraciones del extracto de Cedrón ( <i>Lippia citriodora</i> ).. .....	48
Gráfica 14.	Muestras (Biopsias) de Melanoma Humano.....	49
Gráfica 15.	Células de Melanoma Humano a 18 días de cultivo.....	50
Gráfica 16.	Macrófagos peritoneales de ratón ( <i>Mus musculus</i> ).....	51
Gráfica 17.	Observación de células viables del cultivo de melanoma humano al microscopio. ....	54
Gráfica 18.	Observación de macrófagos peritoneales de ratón al microscopio.....	54
Gráfica 19.	Viabilidad celular de células de melanoma tratadas con extracto metanólico de Cedrón ( <i>Lippia Citriodora</i> ).....	55

Gráfica 20. Viabilidad celular de macrófagos peritoneales de ratón ( <i>Mus músculos</i> ) tratado con extracto metanólico de Cedrón ( <i>Lippia Citriodora</i> ) .....	57
Gráfica 21. Medición de pH .....	58
Gráfica 22. Comparación de la Velocidad de reacción ( $V_o$ Vs $[S]$ ).....	60
Gráfica 23. Comparación del mecanismo de acción de la enzima con Inhibidores y Control ( $1/V_o$ vs $1/[S]$ ).....	61



## ÍNDICE DE TABLAS

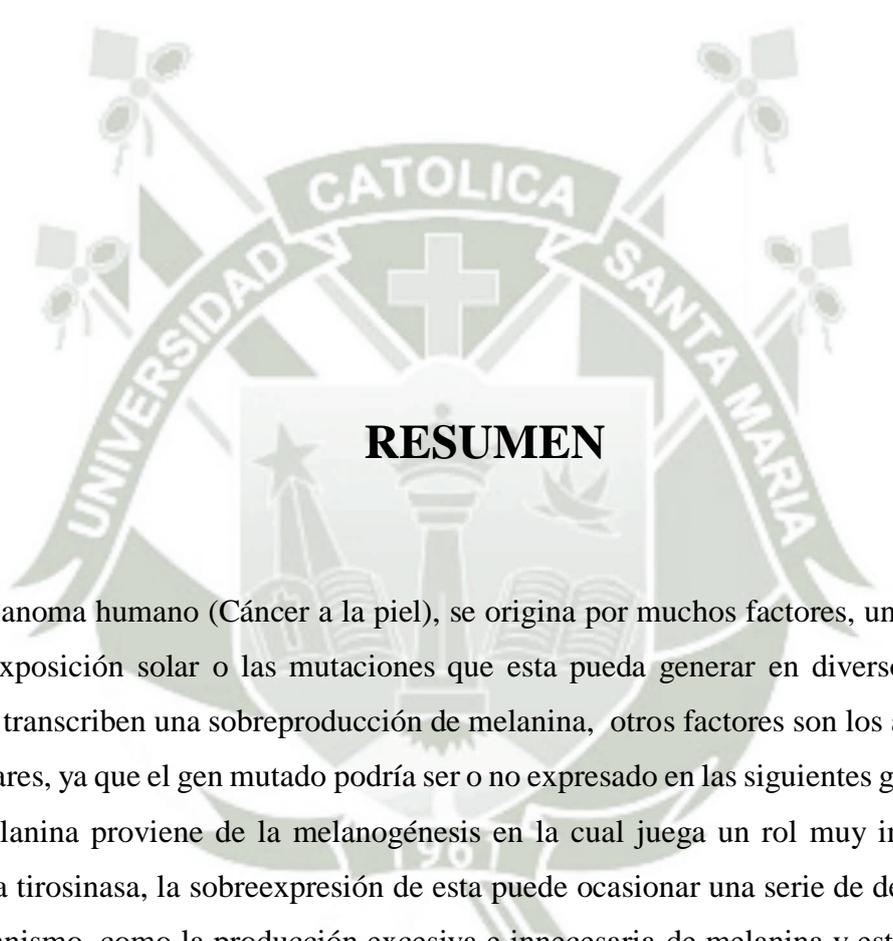
Tabla 1.	Genes implicados en el desarrollo de melanoma cutáneo. ....	21
Tabla 2.	Estadística de cirugías en el IREN SUR.....	26
Tabla 3.	Principios activos del cedrón ( <i>Lippia citriodora</i> ) .....	31
Tabla 4.	Esquema de tratamiento de Microplaca 1 de Biopsia 1 .....	52
Tabla 5.	Esquema de tratamiento de Microplaca 2 de Biopsia 2 .....	53
Tabla 6.	Esquema de tratamiento de Microplaca 3 de cultivo de Macrófagos.....	53
Tabla 7.	Análisis de varianza de un factor (ANOVA) – Melanoma humano.....	55
Tabla 8.	Análisis de varianza de un factor (ANOVA) – macrófagos peritoneales.....	56
Tabla 9.	Parámetros de trabajo óptimo.....	57
Tabla 10.	Análisis de varianza de dos factores (ANOVA).....	59
Tabla 11.	Resultados de KM y Vmax .....	62



## ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1.	Modelo de la actividad de la tirosina. (30).....	13
Ecuación 2.	Cálculo de células por mililitro .....	33
Ecuación 3.	Cálculo de viabilidad celular.....	33





## RESUMEN

El melanoma humano (Cáncer a la piel), se origina por muchos factores, uno de ellos la sobreexposición solar o las mutaciones que esta pueda generar en diversos genes los cuales transcriben una sobreproducción de melanina, otros factores son los antecedentes familiares, ya que el gen mutado podría ser o no expresado en las siguientes generaciones. La melanina proviene de la melanogénesis en la cual juega un rol muy importante la enzima tirosinasa, la sobreexpresión de esta puede ocasionar una serie de desórdenes en el organismo, como la producción excesiva e innecesaria de melanina y esto conducir a trastornos y/o patologías de hiperpigmentación, desde simples problemas estéticos como las pecas hasta graves problemas clínicos como el melanoma humano. En los últimos años el uso de plantas medicinales han sido un gran aliado de la salud humana, para contrarrestar un sin número de enfermedades, y han sido una alternativa para evitar el consumo de productos sintetizados químicamente, el cedrón (*Lippia citriodora*) es utilizado como medicina alternativa en Perú para trastornos digestivos, trastornos en el sistema nervioso como un relajante (en insomnio y ansiedad) y en estados gripales, por lo que el tema principal en este estudio es la evaluación del extracto metanólico de cedrón

*(Lippia citriodora)* como inhibidor de tirosinasa en la melanogénesis, los ensayos mostraron que el extracto no es citotóxico sin embargo no presentó una actividad inhibitoria significativa como se esperaban, pero son un indicio de que podría utilizarse como un ayudante en los tratamientos de melanoma humano. Por lo que se concluye que a una concentración de 40 µg/ml del extracto metanólico de cedrón (*Lippia citriodora*) se obtuvo un mejor resultado, logrando inhibir la acción de la enzima tirosinasa en comparación de las otras concentraciones estudiadas en este trabajo.

**Palabras Claves:** *Melanogénesis, melanoma humano, tirosinasa, Lippia citriodora, cedrón.*



## ABSTRACT

The human melanoma (cancer to the skin), is caused by many factors, one of them solar overexposure or mutations that this can generate in various genes which transcribe an overproduction of melanin, other factors are the family history, since the mutated gene could be or not expressed in the following generations. Melanin comes melanogenesis in which plays an important role tyrosinase enzyme, overexpression of this can cause a series of disorders in the body, such as excessive and unnecessary production of melanin and this lead to disorders and / or pathologies hyperpigmentation, from simple aesthetic problems such as freckles to serious clinical problems such as human melanoma. In recent years the use of medicinal plants have been a great ally of human health, to counter a number of diseases, and have been an alternative to avoid the consumption of chemically synthesized products, lemon verbena (*Lippia citriodora*) it is used as alternative medicine in Peru for digestive disorders, nervous system as a relaxant (in insomnia and anxiety) and flu-like states, so that the main issue in this study is the evaluation of the methanol extract of verbena (*Lippia citriodora*) inhibitor of tyrosinase in melanogenesis, the tests showed that the extract is not cytotoxic, however, I do not present a significant inhibitory activity as expected, but they are an indication that it could be used as an adjuvant in human melanoma treatments. As it concluded that at a concentration of 40µg / ml methanolic extract of lemon verbena (*Lippia citriodora*) a better result was obtained, achieving inhibit the action of the enzyme tyrosinase compared to other concentration studied in this work.

**Key words:** *Melanogenesis, human melanoma, tyrosinase, Lippia citriodora, cedrón.*

## INTRODUCCIÓN

En el periodo de 2016 hasta Agosto 2017 en la ciudad de Arequipa se han presentado pacientes diagnosticados con melanoma humano en el Instituto Regional de Enfermedades Neoplásicas del Sur (IREN – SUR), de los cuales 36 pacientes han tenido intervención quirúrgica debido al avance del melanoma, para evitar que este pueda llegar y comprometer a otras regiones u órganos.

La melanina, producto final de la melanogénesis, se sintetiza dentro de los melanocitos por los melanosomas y determina el color de la piel humana, cabello y ojos, la melanogénesis es un mecanismo bien conocido para prevenir el daño de la piel causado por la radiación ultravioleta (UV), pero se puede regular por diversos factores como ambientales, hormonales y genéticos. La sobreproducción de melanina produce trastornos de hiperpigmentación, la cual pueden ocasionar manchas en la piel de un color más oscuro paulatinamente, el trastorno más común de hiperpigmentación es melasma, pero en ocasiones puede ser un trastorno más grave como el melanoma maligno (Cáncer de piel). (1) (2) (3)

La radiación UV, es la porción más energética del espectro solar que alcanza la superficie terrestre. Este tipo de radiación es capaz de modificar la estructura química de ciertas macromoléculas (proteínas, ácido desoxirribonucleico (ADN)), generando alteraciones que pueden conducir a la muerte celular, o su mutación. La exposición crónica intermitente a los rayos solares UV-B puede causar dímeros de timinas, impidiendo la correcta replicación y transcripción de ADN. (4) (5)

La sobreexpresión de la enzima tirosinasa es el causante de la producción excesiva e innecesaria de melanina por la ruta de la melanogénesis y esto conducir a trastornos y/o patologías de hiperpigmentación. (1) (6) (7)

En la actualidad existe una gran variedad de productos que ayudan a trastornos ocasionados por la sobreproducción de melanina, sin embargo la utilización de estos productos no pueden ser de manera continua ya que la mayoría de ellos producen efectos

secundarios, entre ellos tenemos la hidroquinona como uno de los despigmentantes en primera línea, pero desgraciadamente no puede emplearse durante más de seis meses por los efectos secundarios como la atrofia, producidos por el corticoide y la inducción al cáncer. También podemos encontrar los despigmentantes en segunda línea como: Imatinib, Imiquimod, Difenciprona. Son medicamentos con otras indicaciones que tienen como efecto secundario la producción de lesiones vitíligo en la piel. Son sustancias no exentas de efectos secundarios que deben usarse con una precaución extrema, y así una infinidad de productos, y otros que aún están en estudio. (8)

Es por ello que en los últimos años el uso de plantas medicinales han sido un gran aliado de la salud humana, ya que en dosis controladas no ocasionan toxicidad, ni efectos secundarios, es así que crece el interés de estudiar las plantas y sus principios activos, en este estudio se realizaron ensayos con cedrón (*Lippia citriodora*), ya que existen estudios que el género *Lippia*, tiene cierta efectividad sobre la inhibición de la enzima tirosinasa. (9) (1)

El cedrón (*Lippia citriodora*) es utilizado como medicina alternativa en muchos países, Sobre todo en América del Sur, en Perú también podemos encontrar este ejemplar y son utilizados desde hace muchos años para trastornos digestivos, trastornos en el sistema nervioso como un relajante en insomnio y ansiedad y en estados gripales. (1) (9)

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto del extracto metanólico de cedrón (*Lippia citriodora*) sobre células de melanoma humano malignos de manera in vitro, determinado la viabilidad celular, con y sin extracto a diferentes concentraciones, adicionalmente determinar la acción inhibitoria sobre la enzima tirosinasa para estimar la disminución de la melanogénesis con diferentes concentraciones del extracto metanólico de cedrón (*Lippia citriodora*).

## OBJETIVOS

### GENERAL:

Determinar la acción in vitro del extracto metanólico de cedrón (*Lippia citriodora*) sobre células de melanoma inhibiendo la melanogénesis y sobre la actividad in vitro de la enzima tirosinasa sobre el sustrato L-Tirosina.

### ESPECÍFICOS:

- ❖ Obtener diferentes concentraciones de extractos metanólico a partir de hojas de *Lippia citriodora* (cedrón) empleando el método de Soxhlet.
- ❖ Cultivar y acondicionar células primarias de melanoma humano.
- ❖ Evaluar la viabilidad celular del cultivo de células primarias de melanoma humano.
- ❖ Evaluar la viabilidad celular del cultivo de células primarias de melanoma humano expuestas al tratamiento con el extracto de cedrón (*Lippia citriodora*) a diferentes concentraciones.
- ❖ Evaluar la citotoxicidad del extracto de cedrón (*Lippia citriodora*) sobre macrófagos peritoneales de Ratón (*Mus musculus*).
- ❖ Determinar la actividad cinética de la enzima Tirosinasa utilizando L-tirosina como sustrato.
- ❖ Determinar la actividad inhibitoria del extracto de cedrón (*Lippia citriodora*) a diferentes concentraciones sobre la enzima Tirosinasa.

## HIPÓTESIS

Dado que existen estudios que afirman que el género *Lippia* inhibe significativamente la genotoxicidad inducido por la radiación ultravioleta, es probable que el extracto de las hojas de *Lippia citriodora* (cedrón) tenga una acción como inhibidor de melanogénesis.



## VARIABLES E INDICADORES

En este estudio, se determinó variables dependientes e independientes con sus respectivos indicadores.

VARIABLES INDEPENDIENTES	INDICADORES
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Concentración del extracto</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2.5 <math>\mu\text{g/ml}</math></li> <li>• 50 <math>\mu\text{g/ml}</math></li> <li>• 10 <math>\mu\text{g/ml}</math></li> <li>• 20 <math>\mu\text{g/ml}</math></li> <li>• 40 <math>\mu\text{g/ml}</math></li> </ul>
VARIABLES DEPENDIENTES	INDICADORES
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Viabilidad celular en células de melanoma</li> <li>• Citotoxicidad en células de macrófagos peritoneales de ratón (Mus músculos)</li> <li>• Inhibición enzimática de la tirosinasa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Crecimiento y proliferación celular.</li> <li>• Crecimiento y proliferación celular</li> <li>• Lecturas del espectrofotómetro</li> <li>• Cinética enzimática de Michaelis Menten</li> <li>• Cinética enzimática de Lineweaver-Burk</li> </ul>

# CAPITULO I

## MARCO TEÓRICO

### 1.1. LA PIEL

La piel es un órgano importante para la vida, constituye la “frontera” entre el medio ambiente y el medio interno del organismo, la piel:

- Protege a los tejidos contra lesiones mecánicas, químicas o físicas, así como la penetración de microorganismos.
- Actúa como regulador térmico.
- Funciona como órgano sensorial. (10)

#### 1.1.1. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA

Su estructura se divide en tres: Epidermis, Dermis e Hipodermis

Sus componentes químicos son: agua, electrolitos, proteínas (aminoácidos, metionina, cisteína, colágeno), lípidos, hidratos de carbono, enzimas y vitaminas.

##### 1.1.1.1. EPIDERMIS

La epidermis es la capa superficial formada por un epitelio plano poliestratificado queratinizado y avascular de origen ectodérmico.

Se divide en los siguientes estratos (Figura 1 y 2):

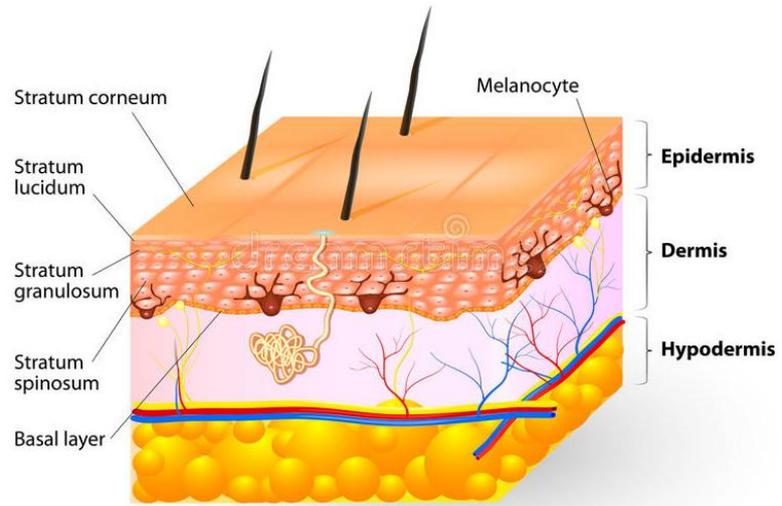


Figura 1. Estructura de la piel (11)

- Basal o germinativo: Contiene queratinocitos basales melanocitos y células de Merkel
- Espinoso: queratinocitos unidos por puentes intercelulares (desmosomas). (Proporcionan sostén y estabilidad)

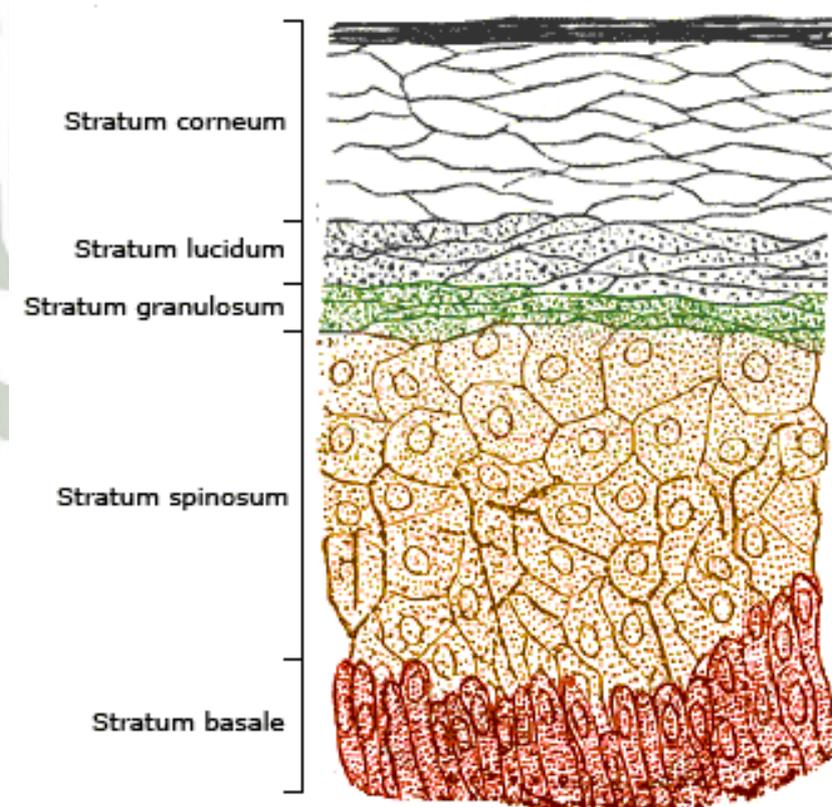
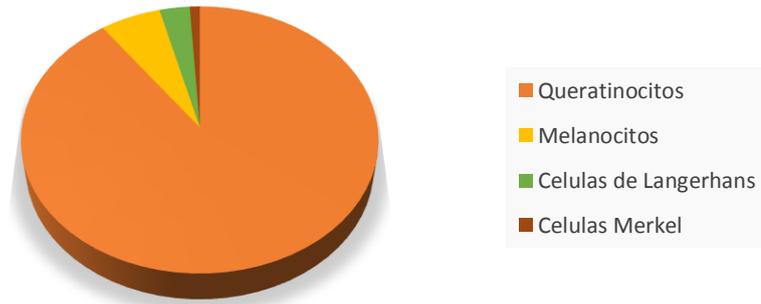


Figura 2. Esquema de los estratos de la Epidermis (12)

- Granuloso: Queratinocitos que contienen granulos de queratohialina (precursor de la queratina)
- Lucido: Solo presente en palmas y plantas. (Contiene eleidina que aporta electricidad)
- Córneo: Células muertas, queratinizadas, sin núcleo (corneocitos). Proporciona una barrera mecánica frente a agentes externos. (13)

La epidermis contiene las siguientes células (Gráfica 1):

- Queratinocitos (90%), contienen dos estructuras:
  - Gránulos de queratohialina: presentes en queratinocitos del estado granuloso. Contienen filagrina, un precursor de la queratina.
  - Corpúsculos de Orland o queratinosomas: en los queratinocitos de los estratos granuloso y espinoso de la epidermis, contienen lípidos y proteínas que será vertidos al espacio intercelular para permitir la cohesión de los corneocitos y formar una barrera impermeable que evita la perdida de agua.
- Melanocitos (5-10%) están en la capa basal en proporción 1/10 con los queratinocitos, derivan de la cresta neural. Se relacionan con otras células mediante dendritas, por las cuales traspasan la melanina de los melanosomas a los queratinocitos.
- Células de Langerhans (2-5%) células dendríticas de origen mesodérmico localizadas en el estrato espinoso. Forman parte de la inmunidad celular, pues presentan antígenos a los linfocitos T.
- Células de Merkel (<1%) son de origen neuroectodérmico. Se localizan en la capa basal y se cree que son receptores táctiles. (13)



Gráfica 1. Cantidad de células aproximadamente en la Epidermis.

### 1.1.1.2. DERMIS

Se encuentra bajo la epidermis, separada por la membrana basal. Procede del mesodermo límite entre epidermis y dermis se le llama límite dermoepidérmico (Papilas), se divide en dermis papilar o superficial y en dermis reticular o profunda. El mayor componente es el colágeno tipo I. Además existen fibras elásticas, fibroblastos, mastocitos, histiocitos, vasos sanguíneos y terminaciones nerviosas. La dermis es 20 o 30 veces más gruesa que la epidermis.

Células de la dermis: fibroblastos, histiocitos y mastocitos

- Fibroblastos: aportan la elasticidad y turgencia a la piel y fabrican tres tipos de fibras:
  - Fibras de colágeno: son gruesas y estriadas, contienen una proteína llamada colágeno cuyo deterioro provoca pérdida de tensión en la piel (flacidez) y aparición de arrugas
  - Fibras elásticas: son finas y lisas. Su componente principal es la elastina que da elasticidad a la piel
  - Fibras reticulares: son gruesas y lisas. Su principal proteína es la reticulina. Se encuentran dispuestas formando redes y sirven de soporte a las estructuras dérmicas

- Histiocitos son células alargadas en forma de estrella cuya función principal es la defensiva. Fagocitan las sustancias extrañas que entran en el organismo.
- Mastocitos Productoras de histamina, Heparina y otros mediadores de inflamación. (13)

### 1.1.1.3. HIPODERMIS

Es la capa que se sitúa debajo de la dermis. Está formada por tejido adiposo y separa la piel de los músculos. Las células de la hipodermis se llaman adipocitos que acumulan grasa en el interior de unas grandes vacuolas. Su función es almacenar grasa, reservarla y ponerla a disposición del organismo cuando haga falta un aporte energético superior al ingerido en la alimentación. (13)

## 1.2. MELANOGÉNESIS

La melanogénesis es el mecanismo que previene el daño a la piel causado por la radiación ultravioleta (UV), así como el desarrollo del cáncer de piel el cual sintetiza la melanina, un polímero de composición relativamente variable y derivado en todos los casos de un aminoácido no esencial: la tirosina (Tyr). (14) (15).

La pigmentación melánica está predeterminada genéticamente, y es regulada tanto por la radiación ultravioleta (UV) como por diversos factores químicos. La radiación UV, además de estimular un aumento en el número de melanocitos y sus dendritas, es el principal estímulo para la melanogénesis. (16)

En melanocitos y células de melanoma, la melanina se sintetiza a través de una cascada enzimática regulada a nivel de tirosinasa. La melanina se sintetiza en el interior de los melanosomas. Los melanosomas que contienen la melanina migran a través de las prolongaciones de los melanocitos desplazándose desde el estrato basal a los estratos superiores de la epidermis, a los queratinocitos, en los cuales la melanina desarrolla su función protectora contra los rayos UV, disponiéndose en torno al núcleo celular. (15) (17)

La pigmentación cutánea está bajo control genético complejo regulado por más de 150 alelos repartidos en 90 loci, En la Figura 4, se muestra como primera etapa la

hidroxilación de la L- tirosina a la L-DOPA catalizada por la actividad de la enzima tirosinasa y es el paso limitante de la síntesis de melanina, ya que es un proceso lento. Una vez que se forma L- DOPA, se genera la dopaquinona utilizándose como catalizador a la misma enzima (tirosinasa) de una manera más rápida que la hidroxilación en la primera etapa, luego pueden producirse espontáneamente etapas adicionales (series de reacciones de oxidación y transformaciones intramoleculares), a velocidades variables dependiendo de la concentración de iones hidrógeno, presencia y concentración de cationes metálicos, agentes reductores, tioles y oxígeno para producir la eumelanina, mientras que la feomelanina se obtiene mediante la incorporación de derivados sulfatados por una vía anabólica alternativa. (7) (18) (16)

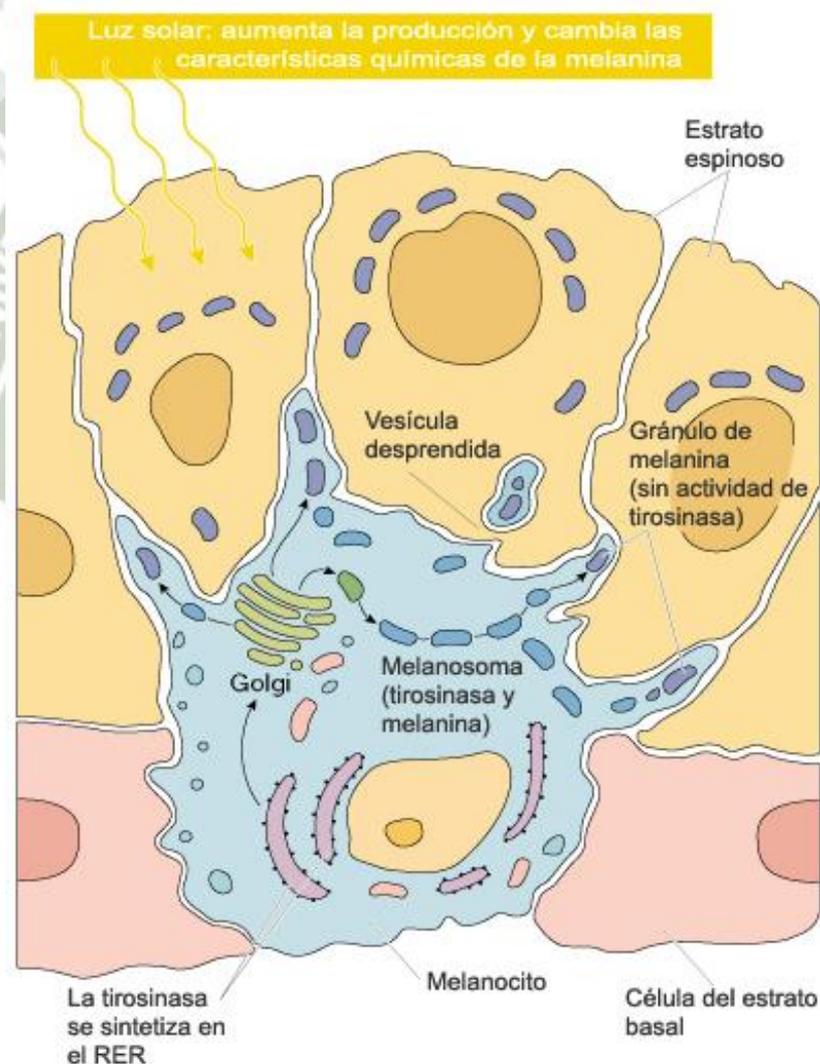


Figura 3. Esquema de melanocito y su función (Producción de melanina)

(19)

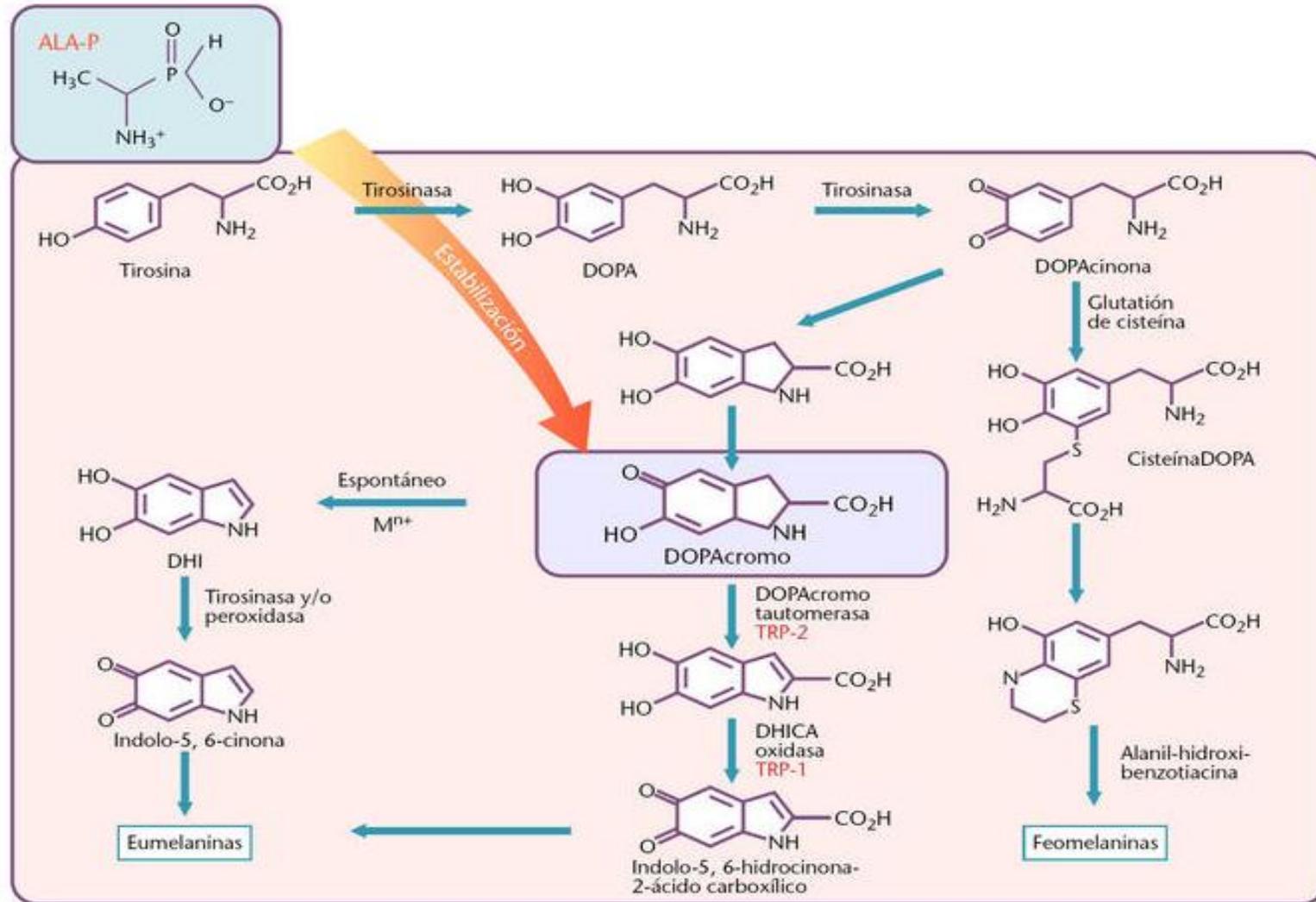


Figura 4. Síntesis de Melanina. (20)

### 1.2.1. MELANINA:

La melanina es un pigmento que se halla en la mayor parte de los seres vivos, la radiación solar activa la melanogénesis, que sigue la cascada de reacciones (Figura 4) hasta convertirse en melanina, como resultado se obtiene la eumelanina (responsable del color marrón/negro) o la producción de la feomelanina (responsable del color amarillo/rojo) que se consigue mediante una vía metabólica alternativa. La producción del primer tipo de melanina sería la responsable del moreno de piel y de una coloración oscura en el cabello y en los ojos. La feomelanina por el contrario, da lugar a un fototipo de piel clara, que no se broncea adecuadamente y a un color de pelo rubio o pelirrojo. La producción de un tipo de melanina u otra se debe a la acción del gen MC1R. Éste, activa a un receptor, el melanocortina-1 que responde al estímulo de la hormona ACTH y la MSH. La acción de estas hormonas en el interior celular incrementa el AMPcíclico, estimulando a su vez la producción de eumelanina. Si este receptor, el melanocortina-1 se encuentra inactivo o bloqueado por alguna mutación, se produce feomelanina. (21) (22) (Figura 5)

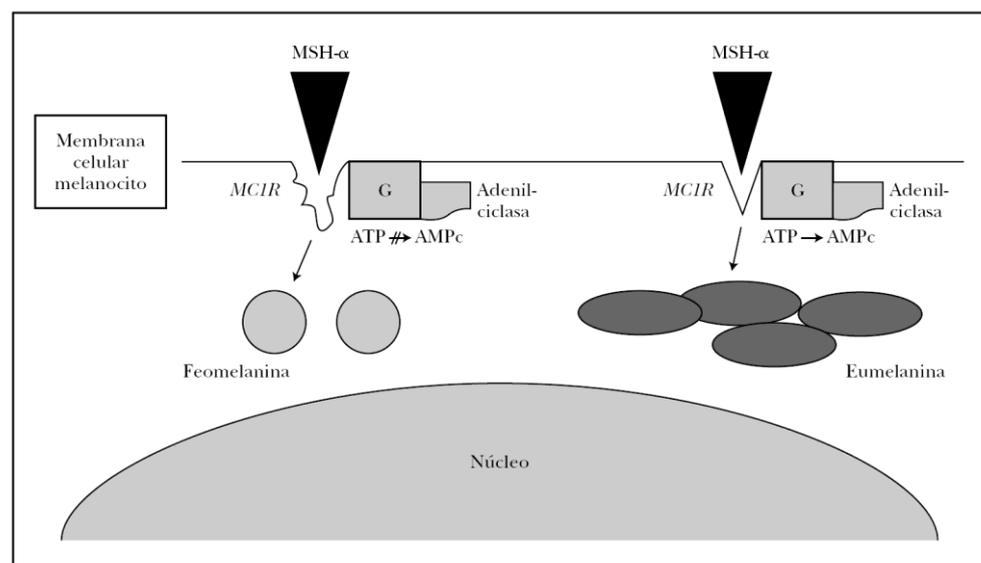


Figura 5. Síntesis de melanina en relación al receptor MC1R. (23)

En general, la estructura melanosómica se correlaciona con el tipo de melanina producida, por ejemplo, los eumelanosomas son elípticos y contienen matriz fibrilar mientras que la forma de los feomelanosomas es

variable con contorno predominantemente redondeado y contiene matriz vesiculoglobular (24)

La formación de eumelanina o feomelanina está directamente determinada por la presencia o ausencia de cisteína (transportada activamente a través de la membrana melanosómica, y de GSH en estado tiolado completamente reducido y potencial redox (alto GSH para eumelanina y baja para feomelanina). Cuando la concentración de compuestos sulfhidrilos es baja, la dopaquinona se convierte en dopacromo, iniciando la vía eumelanogénica. (18)

### 1.2.2. MELANOCITO

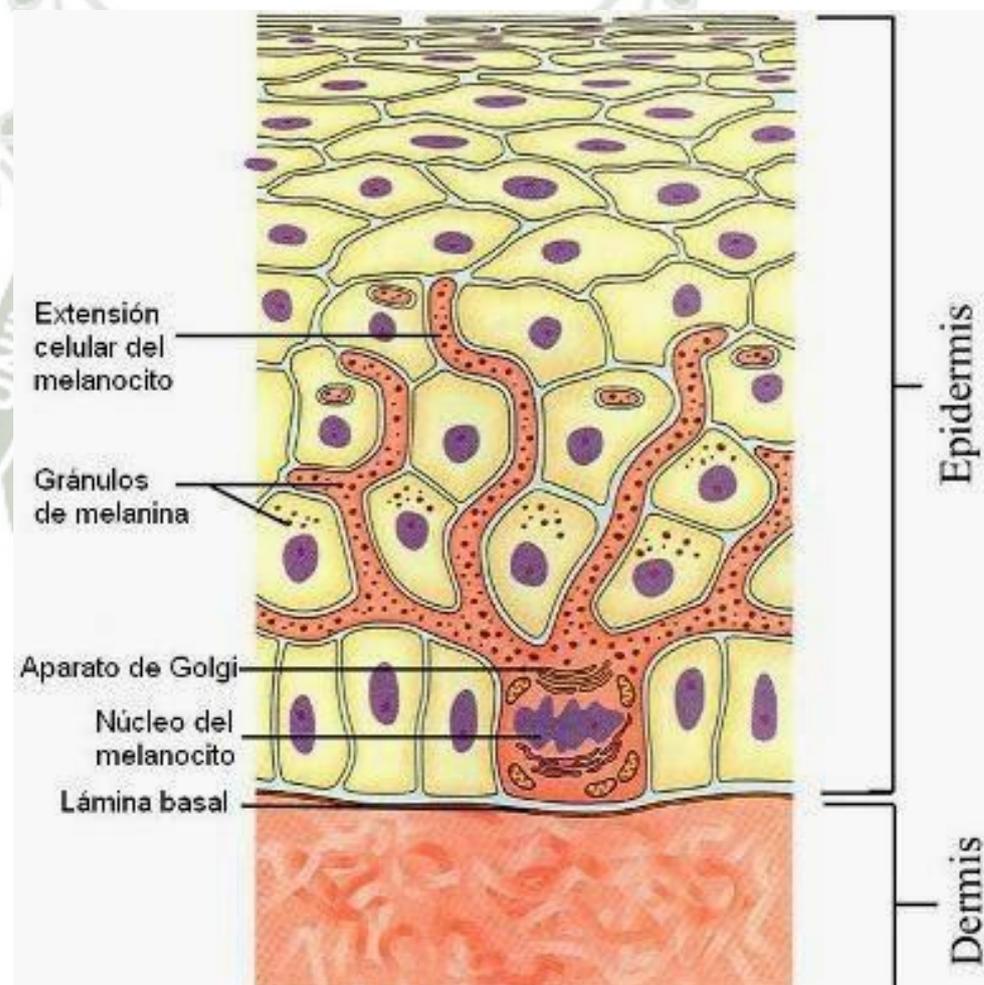


Figura 6. Melanocito (25)

Los melanocitos derivan del neuroectodermo y se localizan en la capa basal en contacto con la membrana basal. En el citoplasma de los melanocitos se puede observar un núcleo ovoideo y un Retículo

Endoplasmático Rugoso muy desarrollado dónde se produce la tirosina, sustancia a partir de la cual se sintetiza la melanina. También se observan unos gránulos característicos cerca de la membrana dónde se produce y almacena la melanina. (Figura 6) El número de los melanocitos es más o menos constante, pero su grado de actividad varía genéticamente. (25) (26)

### 1.2.3. PREMELANOSOMA Y MELANOSOMA

El desarrollo de los melanosomas implica cuatro pasos. La etapa I corresponde a la organización matricial temprana. En la etapa II, la matriz ya está organizada pero sin formación de melanina (eumelanosomas); en los feomelanosomas la melanina ya está formada en esta etapa. En la etapa III hay deposición de melanina. En la etapa IV, los melanosomas están completamente melanizados (completamente llenos de melanina). (18)

Como se muestra en la Figura 7 los premelanosomas se forman por un desprendimiento de una membrana lisa del Retículo Endoplasmático Rugoso (RER) contienen los gránulos que se encuentran en el melanocito, dónde se almacena tirosina que se irá transformando en melanina, los melanosomas son la forma madura de los premelanosomas (Etapa IV) cuándo alcanzan una alta concentración de melanina. (26) (18)

La tirosina pasa del RER a los premelanosomas y aquí, en presencia de oxígeno y por acción del enzima tirosinasa, es transformada en L-DOPA y esta a su vez en DOPAquinona, y así continuara y dará lugar a eumelanina o a feomelanina. (Figura 8) A medida que se va sintetizando melanina, los premelanosomas van desarrollándose y madurando hasta alcanzar el estadio de melanosomas. (26)

En los melanosomas la tirosinasa cesa su actividad y se sitúan en las dendritas dispuestos a ser transferidos a los queratinocitos. La unidad formada por el melanocito y los queratinocitos con los que contactan sus dendritas forman la conocida como unidad melanocítica cutánea.

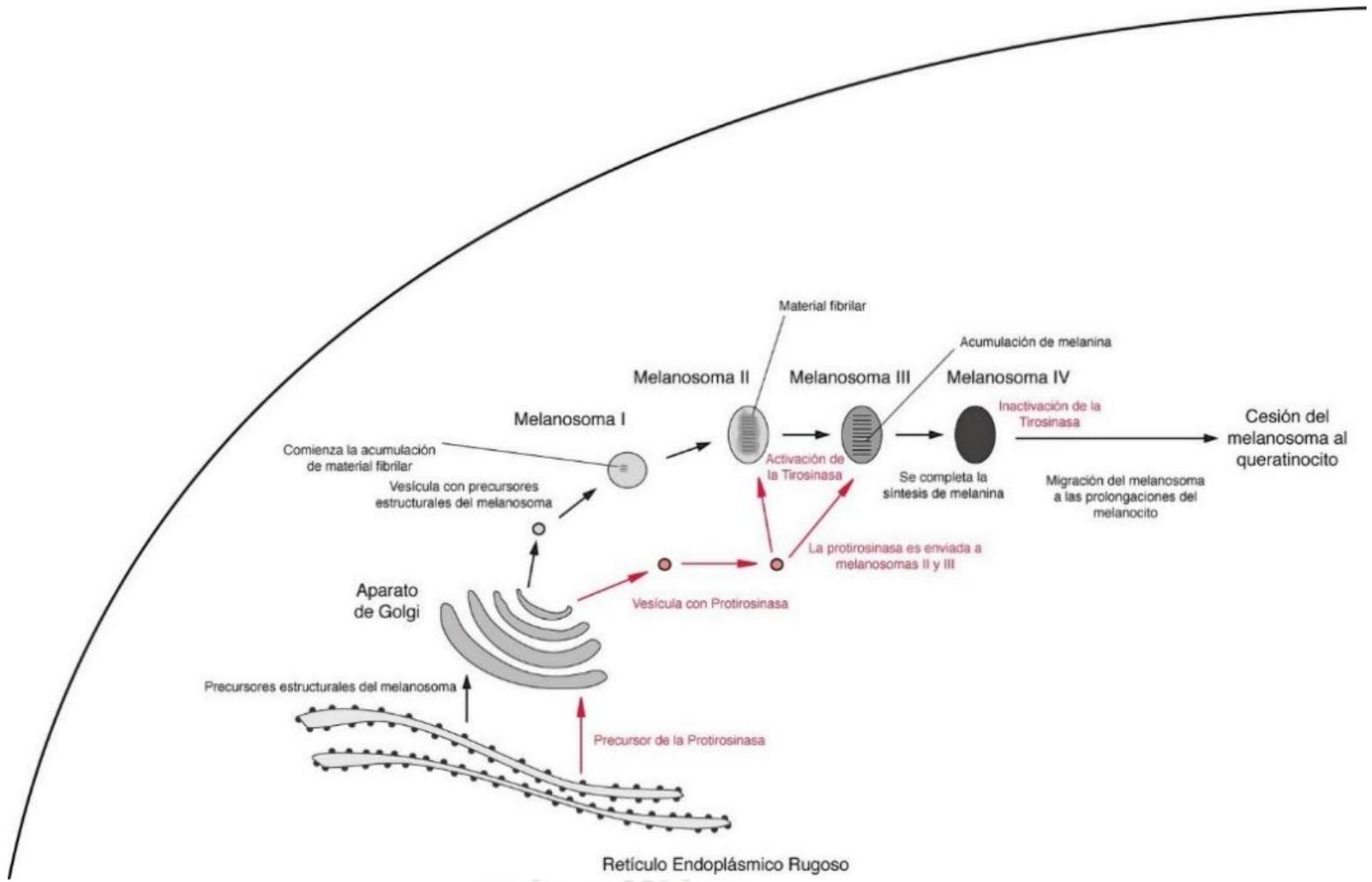


Figura 7. Formación de Melanosomas y Melanina (14)

Los melanosomas se distribuyen alrededor del núcleo dónde la melanina ejercerá su acción: proteger al ADN de la radiación ultravioleta de onda corta (UV-B, más perjudicial que la radiación ultravioleta de onda larga o UV-A) al ser absorbida por la melanina. La propia radiación ultravioleta estimula la melanogénesis, lo que supone un mecanismo efectivo de incrementar la protección cuándo incrementa la exposición. (26)

#### 1.2.4. TIROSINASA

Es la enzima principal que regula la síntesis de melanina, está codificada por el TYR (tirosinasa) que se correlaciona con el cromosoma 11q14-21 en humanos y el cromosoma 7 en ratones, y está compuesto de cinco exones y cuatro intrones (18)

La tirosinasa (monofenol monooxigenasa) es una enzima cuprífera como se muestra en la figura 8 que cataliza la oxidación de fenoles (como la tirosina) y está extendida en tejidos de plantas y animales, la enzima posee dos cadenas A y B y aproximadamente 5 ligandos entre ellos el complejo de tres residuos de histidina con un centro de cobre tipo III (27)

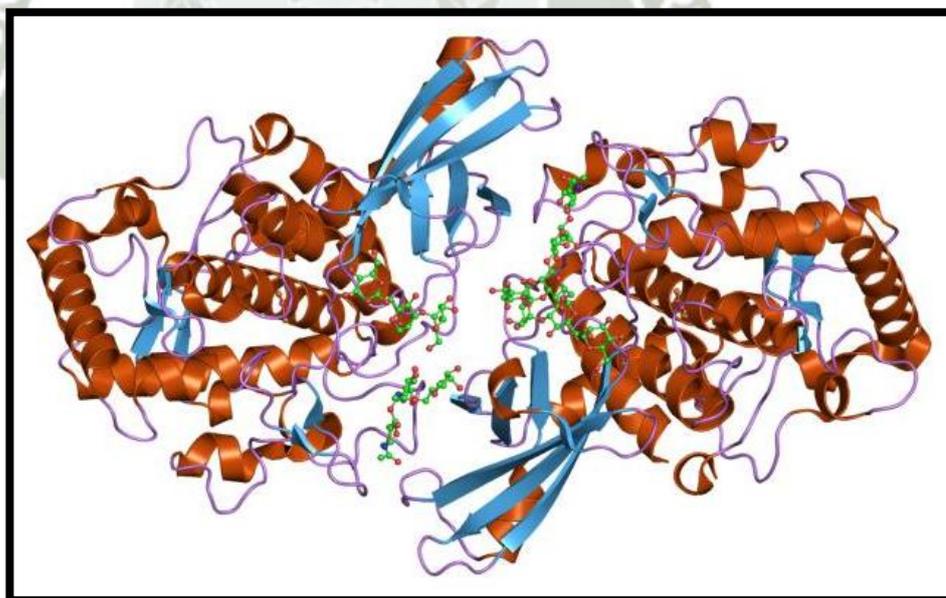


Figura 8. Estructura de tirosinasa (TYR) (PDB: 1js8),

La tirosinasa contiene cantidades de trazas de cobre, que existen en estado cuproso a cúprico. También la actividad de la tirosinasa se manifiesta por

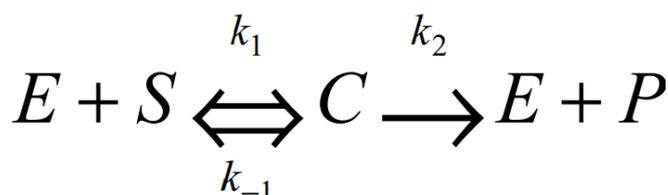
complejos similares que contienen otros iones polivalentes, tales como cobalto, níquel y vanadio, pero su eficacia es inferior a la del cobre. (28).

Las reacciones de hidroxilación iniciales, así como la estabilidad de L- DOPA, requieren un medio ácido que es proporcionado por los premelanosomas, donde el pH se regula mediante un sistema de bomba de protones. Sin embargo, una vez que está presente L-DOPA, la formación eficaz de pigmento de melanina requiere un pH aumentado (preferiblemente neutro o básico), ya que la acidificación inhibe la síntesis de melanina. (18)

#### 1.2.4.1. CINÉTICA ENZIMÁTICA

La cinética enzimática estudia la velocidad de las reacciones bioquímicas, es la medida de la formación de producto o la desaparición de sustrato por unidad de tiempo. (29)

La enzima tirosinasa se comporta según el modelo de Michaelis-Menten, de acuerdo con las ecuaciones químicas siguientes:



Ecuación 1. Modelo de la actividad de la tirosina. (30)

#### 1.2.4.2. INHIBIDORES ENZIMÁTICOS DE LA TIROSINASA

La enzima Tirosinasa se puede inhibir por:

- Agentes reductores: Reducción de o quinonas a o-difenoles no coloreados. Los compuestos derivados del azufre son los más ampliamente empleados en la industria de los alimentos. Ejemplo el bisulfito ( $\text{HSO}_3^-$ ) y sulfitos ( $\text{SO}_3^{2-}$ ). En esta clasificación también encontramos al ácido ascórbico y la cisteína (31)
- Acidulantes: Los acidulantes son aplicados generalmente para mantener el pH por debajo del punto óptimo de actividad

catalítica de la enzima. Acidulantes como el ácido cítrico, málico y fosfórico (31)

- Quelantes: Las enzimas generalmente poseen iones de metales en su sitio activo. Los agentes quelantes remueven estos iones inactivando a la enzima. (31)
- Agentes acomplejantes: La más importante propiedad funcional de la ciclodextrina como agente acomplejante es su habilidad para la inclusión de moléculas dentro del núcleo hidrofóbico o ligeramente apolar (31)

### 1.3. PATOLOGÍAS

Los trastornos pigmentarios más comunes no son trastornos de la calidad de la melanina, sino más bien de la propia célula productora de pigmentos, que puede ser reducida en número, ausente o hiperactiva y comúnmente con localización regional. Las patologías relacionadas son por hipopigmentación (albinismo, vitíligo, etc.) y por hiperpigmentación (melanoma humano, pecas, manchas, entre otras); sin embargo existen otros desordenes relacionadas con el metabolismo de la tirosinasa como la tirosinemia y alcaptonuria, además se dice que esta enzima jugaría un papel importante en la enfermedad del Parkinson. (18) (32)

#### 1.3.1. MELANOMA HUMANO

El melanoma cutáneo maligno representa alrededor del 10% de las neoplasias cutáneas y es responsable de más de 90% de las muertes por cáncer de piel, su incidencia se aumenta con el paso de los años. (33)



Figura 9. Melanoma lentiginoso acro (MLA) (34)

El melanoma es un cáncer que se origina en los melanocitos. Entre otros nombres de este tipo de cáncer se encuentran los de melanoma maligno y melanoma cutáneo. La mayoría de las células del melanoma continúan produciendo melanina de modo que los tumores tipo melanoma usualmente son de color café o negro. Sin embargo, algunos melanomas no producen melanina y pueden lucir color rosado, café o incluso blanco. Tener una piel con pigmentación oscura disminuye su riesgo de melanoma en estos lugares más comunes, aunque cualquier persona puede desarrollar este tipo de cáncer en las palmas de las manos, las plantas de los pies y debajo de las uñas. Los melanomas en estas áreas representan más de la mitad de todos los melanomas. Sin embargo, el melanoma tiene muchas más probabilidades de propagarse a otras partes del cuerpo, si no se detecta temprano, en comparación con el cáncer de células basales o escamosas. (35)

En la figura 9 se puede observar el melanoma lentiginoso acro, el cual se localiza en las plantas de los pies y palmas de las manos, inclusive en mucosas o uniones mucocutáneas oral y genital, este tipo de melanoma es el menos frecuente por lo que su diagnóstico suele ser tardío, por lo que suelen presentar metástasis al momento del diagnóstico. (36)

El desarrollo del melanoma maligno se puede clasificar de la siguiente manera: (37)

- i. Nivel de invasión (Clark)
  - Nivel I: Afecta solo a la epidermis (melanoma in situ)
  - Nivel II: Invasión de la dermis papilar sin alcanzar la interface papilar reticular de la dermis
  - Nivel III: La lesión infiltra e invade la dermis papilar pero no penetra en la dermis reticular
  - Nivel IV: Invasión de la dermis reticular sin llegar al tejido subcutáneo
  - Nivel V: Invasión del tejido subcutáneo a través de la dermis reticular

- ii. Espesor del tumor (Breslow).
  - MM <0,76 mm
  - MM 0,76 mm-1,50 mm
  - MM 1,55 mm-4 mm
  - MM >4 mm
- iii. TNM (AJCC).
  - T: Tumor
  - N: Ganglios
  - M: Metástasis

En la Figura 10 se puede ver el ABCDE para detectar un melanoma cutáneo, con estos simples observaciones se puede detectar un melanoma maligno, es por ello que se debe revisar con el médico para que este pueda clasificar de un manera correcta.

#### **1.3.1.1. RADIACIÓN SOLAR**

Esta radiación de una longitud de onda más corta que la de color violeta recibe el nombre de ultravioleta (UV), cubre un rango entre 200 y 400 nanómetros, es invisible y sólo puede ser detectada con instrumentos adecuados o por sus efectos biológicos. La radiación de onda más corta (entre 200 y 290 nm) es llamada UVC y es la más activa biológicamente: es altamente cancerígena y bactericida pero es filtrada por completo por la capa de ozono en la atmósfera superior. (38)

La radiación UVB (entre 290 y 320 nm) es también cancerígena y produce quemadura solar aguda. Este tipo de radiación es parcialmente filtrada por la capa de ozono y puede ser totalmente absorbida por los protectores solares convencionales. La radiación UVB nos llega en cantidades importantes y puede penetrar hasta la capa basal de la epidermis. (Figura 11) Allí puede inducir alteraciones cancerígenas en las células y es por lo tanto responsable del carcinoma baso celular.

	Benigno		Maligno	
Simétricos		<b>A</b> Asimetría		Asimétricos (los dos lados no coinciden)
Bordes regulares		<b>B</b> Borde		Bordes irregulares
Color homogéneo		<b>C</b> Color		Color no homogéneo, dos o más tonos
Tamaño inferior a 6 mm (1/4 inch)		<b>D</b> Diámetro		Diámetro mayor a 6 mm (1/4 inch)
Lunar normal		<b>E</b> Evolución		Cambios en el tamaño, forma, color, o en otro aspecto

Figura 10. El ABCDE para detectar un melanoma (39)

Los rayos UVA comprenden la radiación de longitud de onda más larga (320 a 400 nm) y son los principales responsables del bronceado solar. Aunque se sabe que pueden producir envejecimiento prematuro de la piel, hasta no hace mucho tiempo se pensaba que no eran cancerígenos. Sin embargo, estudios recientes en animales han demostrado su potencial cancerígeno y sus efectos sobre el sistema inmunológico de la piel. (38)

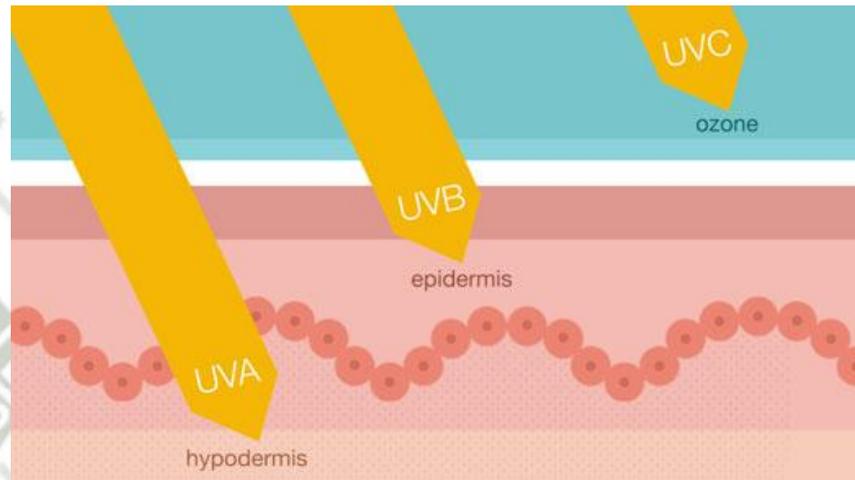


Figura 11. Impacto de las radiaciones solares (40)

El factor ambiental más relacionado al desarrollo del melanoma cutáneo maligno es la exposición crónica intermitente a los rayos solares UV-B (espectro de 290-320 nm) debido a que:

- Dañan directamente al ADN de las células expuestas, provocando mutaciones (ruptura de cadenas, formación de dímeros de timinas, (Figura 12) que impiden la correcta replicación y transcripción del ADN) (41) (5)

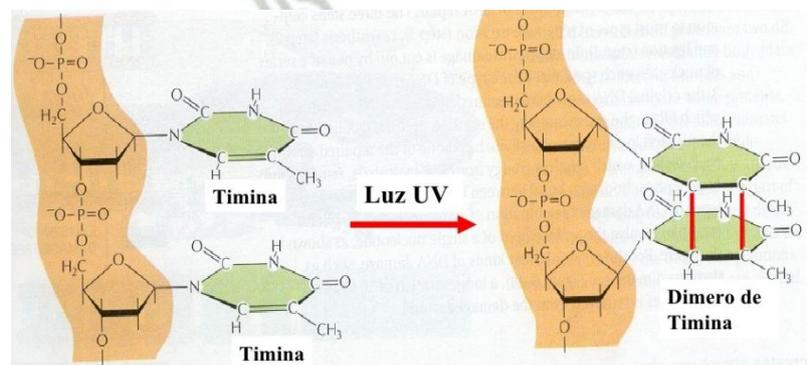


Figura 12. Formación de dímeros de timinas (42)

- Estimulan la producción de factores de crecimiento, que aceleran la proliferación. (41)
- Debilitan la respuesta inmune en la piel y fallan mecanismos de reparación del DNA (41) (5)
- Promueven la síntesis de especies reactivas de oxígeno (radicales libres de oxígeno que dañan al ADN, y suprimen la apoptosis. (41)

### 1.3.1.2. DIAGNOSTICO

El tema de la biopsia incisión en una lesión, que puede ser un melanoma maligno, fue motivo de innumerables controversias ya que podría causar siembra metastásica. La biopsia por afeitado y el curetaje están contraindicados porque el material obtenido no determina la profundidad de penetración del tumor, dato fundamental para plantear la terapéutica indicada y el pronóstico. La inmunohistología y las técnicas moleculares son hoy en día decisiones importantes ya que permiten arribar a un pronóstico más certero. Técnicas moleculares como la hibridación genómica comparativa o la hibridación fluorescente in situ son promesas en el futuro para nuestro medio. (38)

Líneas de antígenos melanocíticos específicos son útiles para el diagnóstico simple, diferencial y de las metástasis, mientras que los antígenos melanocíticos asociados a la progresión resultan interesantes para el pronóstico. Son utilizadas también técnicas inmunológicas como la adhesión de receptores y citoquinas en el suero de pacientes con melanoma (38)

#### a. ANTÍGENOS ASOCIADOS AL MELANOMA

Se clasifican de acuerdo a su naturaleza química, su función o la distribución celular. Son ellos: los gangliosidos primitivos, proteínas oncofetales, receptores de factores de crecimiento, antígenos pigmentarios asociados, proteínas de la matriz extracelular y moléculas distinguidas. En este contexto, es más sencillo distinguir antígenos de diferenciación y antígenos de

progresión, y, desde el diagnóstico diferencial, entre tumores melanocíticos y no melanocíticos. (38)

**b. PROTEÍNA S100**

La proteína S100 se hace prácticamente en todas las lesiones de tipo melanocíticas, también en metástasis encontradas. Es un ácido, proteína calcio-ligando, esta proteína no sólo se encuentra fuertemente en el sistema nervioso y en especímenes melanocíticos, también en células de Langerhans, condrocitos y células mioepiteliales. Químicamente es una mezcla de 3 proteínas similares. Un antisuero de conejo contra la proteína S100 se hace en los diagnósticos de rutina comenzando en los cortes en parafina. El patrón del color es citoplasmático y a veces intranuclear, mayormente la expresión es homogénea, rara vez heterogénea. La sensibilidad es alta, la especificidad baja, ya que los tumores neurales, los condromas, condrosarcomas, algunos carcinomas y tumores mioepiteliales también responden positivamente (38)

**c. HMW-MAA**

Es un antígeno de alto peso molecular asociado al melanoma, reacciona con los queratinocitos basales, el epitelio del folículo piloso así como con las células musculares lisas. (38)

**d. ANTÍGENO NKI/C3**

Es una glicoproteína, verificable con un anticuerpo monoclonal, en material parafinado. La sensibilidad en tumores melanocíticos es alta, la especificidad sin embargo es baja, ya que responde positivamente en los tumores neuroendocrinos, en sarcomas y a veces en carcinomas. La expresión del antígeno NKI/C3 en un melanoma no es homogénea. (38)

**e. ANTÍGENO HMB-45**

La glicoproteína HMB-45 de peso molecular 100 se aplica proporcionalmente en la rutina de los cortes parafinados. La

sensibilidad no es alta como para la proteína S100, sin embargo la especificidad es alta. (38)

### 1.3.1.3. GENES IMPLICADOS

Existen genes implicados en la alteración de la melanogénesis los cuales ocasionan la sobre producción de melanina ocasionando el melanoma maligno.

Tabla 1. Genes implicados en el desarrollo de melanoma cutáneo.

<i>Gen/locus/ cromosoma</i>	<i>Melanoma esporádico</i>	<i>Melanoma familiar</i>
<i>Mutaciones de baja penetrancia</i>		
MC1R/16q243	+++	+/-
XRCC3	+/-	
<i>Mutaciones de alta penetrancia</i>		
CDK4/12q13/9p21	+	+
CDNK2A/p16/9p21	+	++
p14ARF		+
1p22		+/-
<i>Oncogenes</i>		
BRAF	+	
RAS	+	
<i>Otros</i>		
cdc2/PITSLRE/1p36	+	
PTEN/MMAC1/10q23	+	
AIM 1	+	
6q	+	

#### a. CDKN2A (Cyclin dependent kinase inhibitor 2A)

Es el gen asociado de mayor relevancia, localizado en el brazo corto del cromosoma 9 (9p21), este gen tiene la capacidad de transcribir 2 proteínas de forma alternante, por un lado es responsable de la codificación de p16 (Figura 14), proteína de aproximadamente 16 kDa de peso molecular, que interviene en el control del ciclo y la apoptosis celular. El segundo producto de este locus, conocido como p14ARF, regula el ciclo celular pero a través de una vía dependiente de p53. (33) (23)

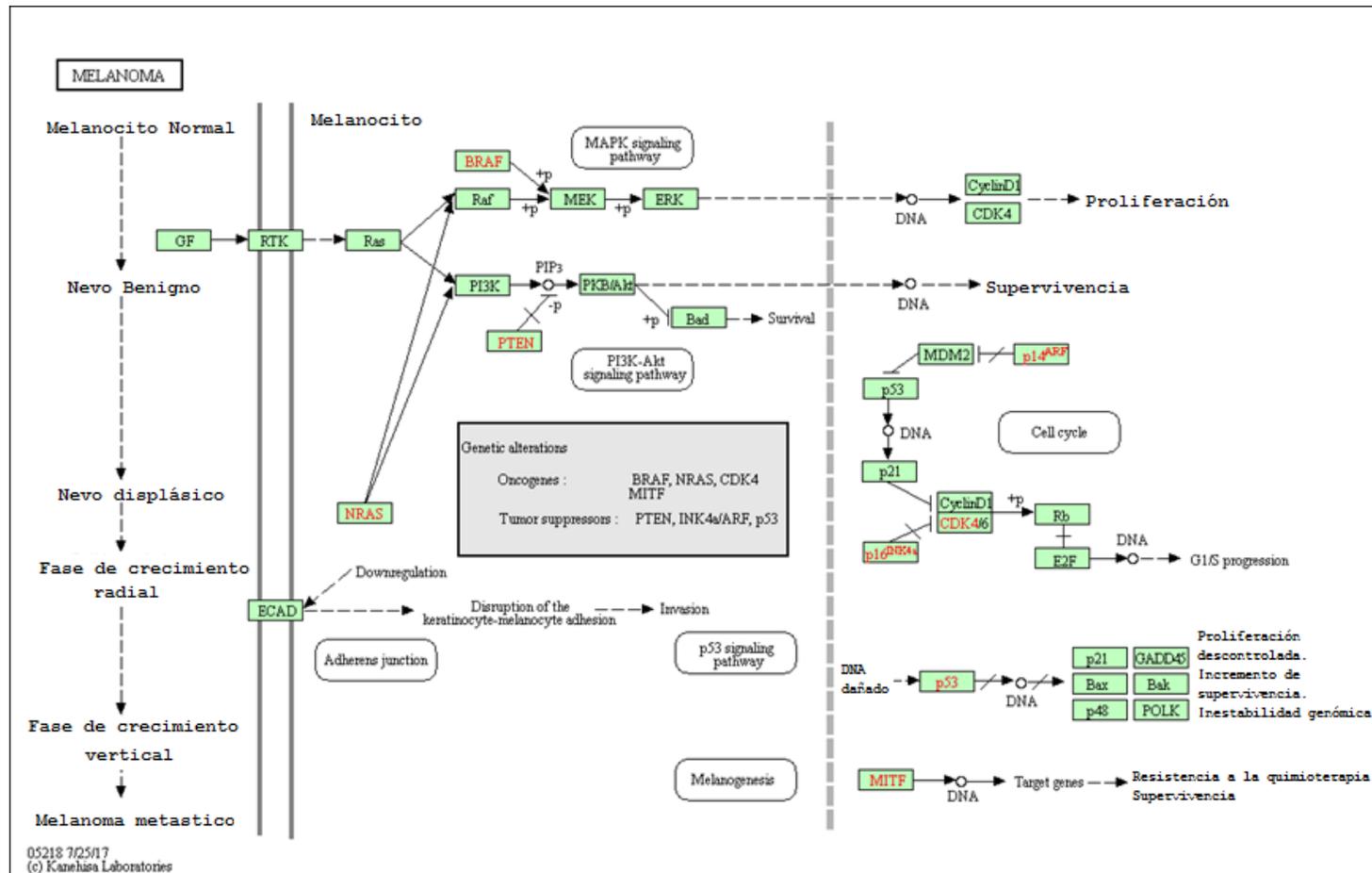


Figura 13. Genes implicados en el Melanoma Humano (6)

En la figura 13 se observa la vía de señalización y genes implicados en el Melanoma, El gen BRAF cuando muta puede causar la proliferación desmesurada de melanina en el melanocito, mientras que la mutación del gen MITF c puede causar la resistencia a tratamientos de quimioterapia.

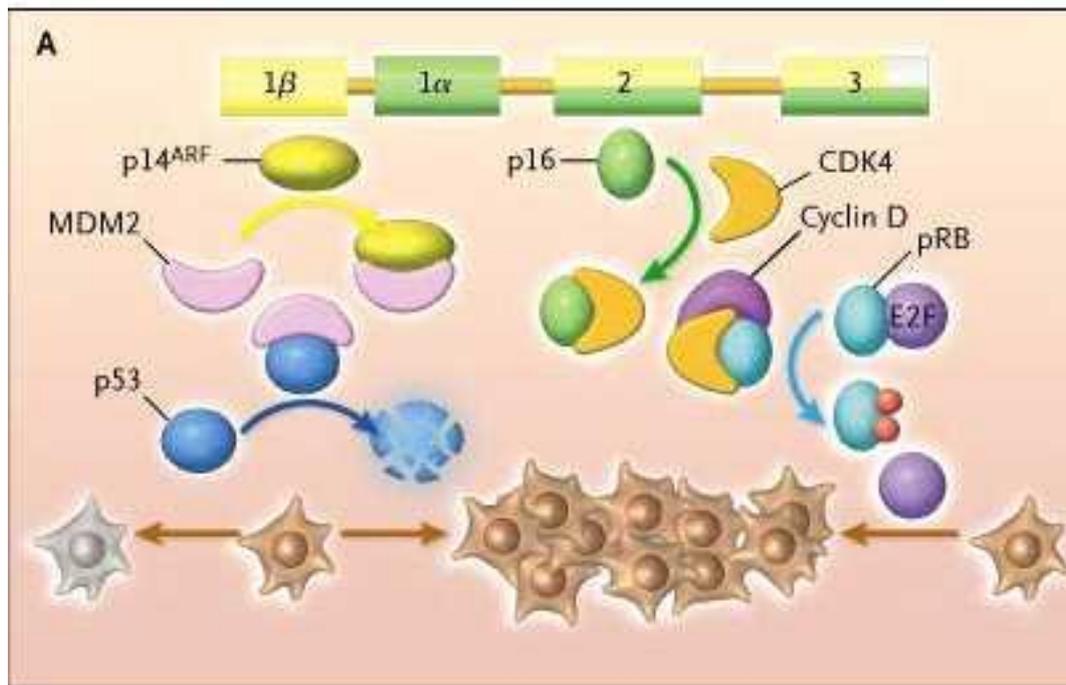


Figura 14. Alteración del gen *CDKN2A*. (43)

**b. CDK4**

Este gen está localizado en el brazo largo del cromosoma 12 (12q14), este gen codifica una subunidad catalítica del complejo de la proteína quinasa y está estrechamente relacionado con la regulación del *CDKN2A* e interviene en la progresión del ciclo celular en la fase G1. Su mutación se localiza en el sitio de unión con p16. (Figura 14) Sin embargo, existen muy pocos casos que presenten esta mutación (33) (23)

**c. BRAF**

Este oncogén está implicado en el desarrollo de hasta el 15 % de todas las neoplasias del ser humano, y codifica una de las tres cinasas reguladas por el también oncogén *ras*. Se han identificado mutaciones de *BRAF* en nevos melanocíticos adquiridos, melanomas primarios, metástasis de melanoma y cultivos celulares de melanoma en una proporción similar. Sin embargo, la presencia de estas mutaciones en melanomas en fase de crecimiento radial es muy inferior (10 %) (33) (23)

En la Figura 15, se puede observar que la mutación de este oncogén lleva a la proliferación de células cancerosas por la ruta de la MAPK.

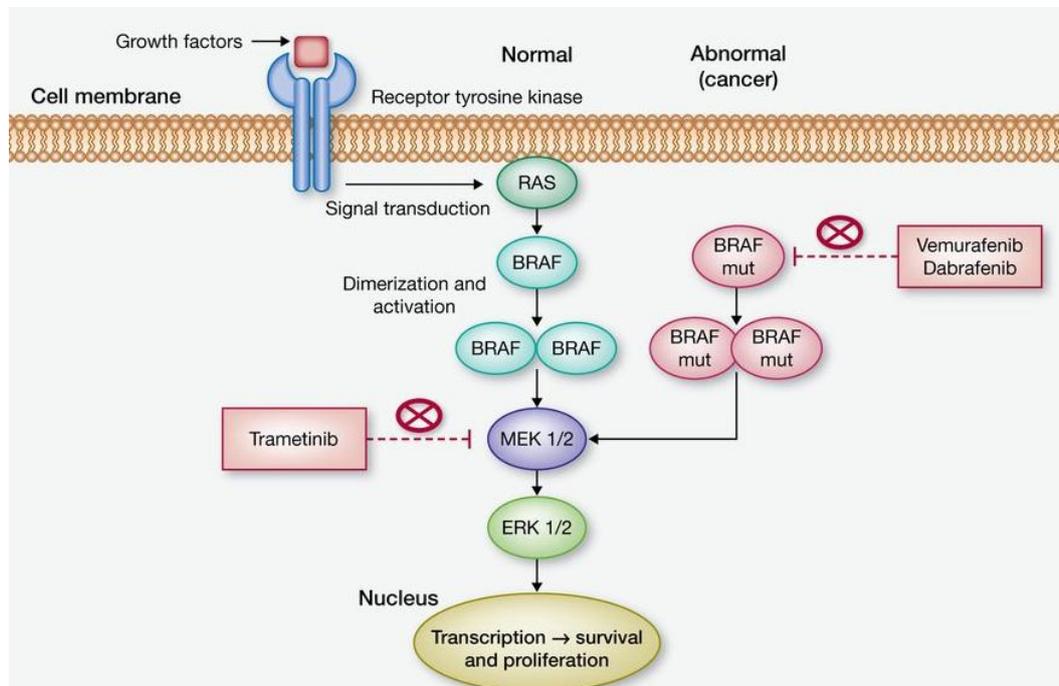


Figura 15. Vía de señalización del oncogén BRAF (44)

#### d. MC1R

En el ser humano, el fenotipo pelirrojo se asocia a ciertas variedades alélicas del receptor *MC1R* que implican una afinidad menor de este receptor por la *MSH- $\alpha$* . Estos hallazgos sugieren que la *MSH- $\alpha$*  participaría en la melanogénesis humana favoreciendo la síntesis preferente de eumelanina frente a feomelanina. (33) (23)

Es un gen de baja penetrancia a comparación de los anteriores, se localiza en el extremo telomérico del cromosoma 16q24.3, y codifica un receptor transmembrana acoplado a proteína G expresado por muchos tipos celulares, incluidos los melanocitos de la piel. *MC1R* es el receptor de péptidos sintetizados en la glándula pituitaria, derivados de la proopiomelanocortina, como la *MSH- $\alpha$*  y ACTH. Ambos se unen con la misma afinidad a *MC1R*, activando una

adenilciclase que incrementa la producción intracelular de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc). Éste favorece la transcripción y traducción de tirosinasa, y de esta manera, la síntesis foto protectora de eumelanina y la proliferación melanocítica. (23) (Figura 5)

**e. MITF (Microftalmia)**

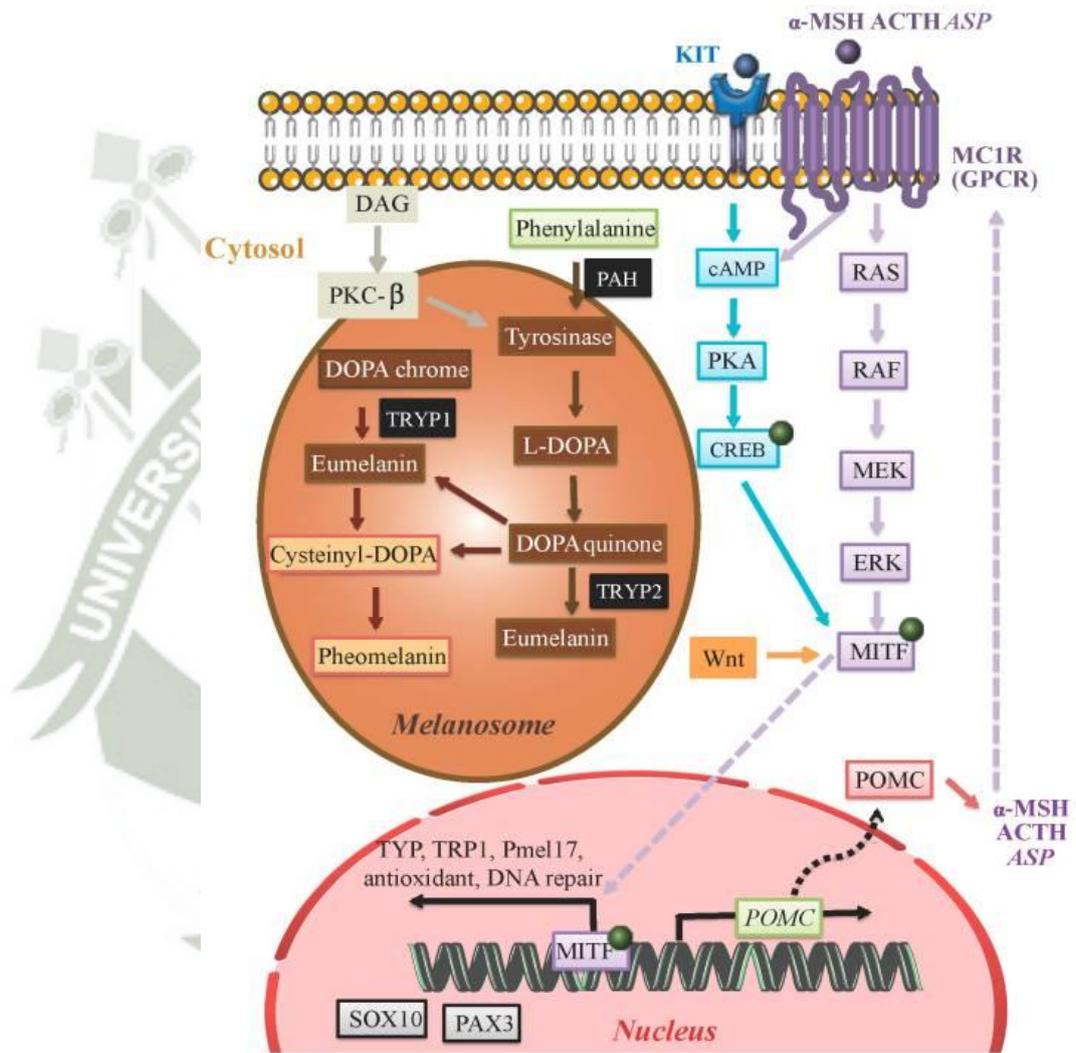


Figura 16. Mutación del Gen MITF

En cuanto al factor de transcripción asociado con microftalmia (MITF) se ha demostrado que cumple un papel fundamental en la diferenciación y proliferación, así como en la viabilidad post-natal (sobrevida) de los melanocitos porque regula la expresión de genes como p21, INK4a, CDK2, BCL2, TYR, DCT, entre otros, al ser activado principalmente a través de las

vías de señalización MAPK, cAMP/PKA/CREB y WNT- $\beta$  catenina.(Figura 16) (45) (46)

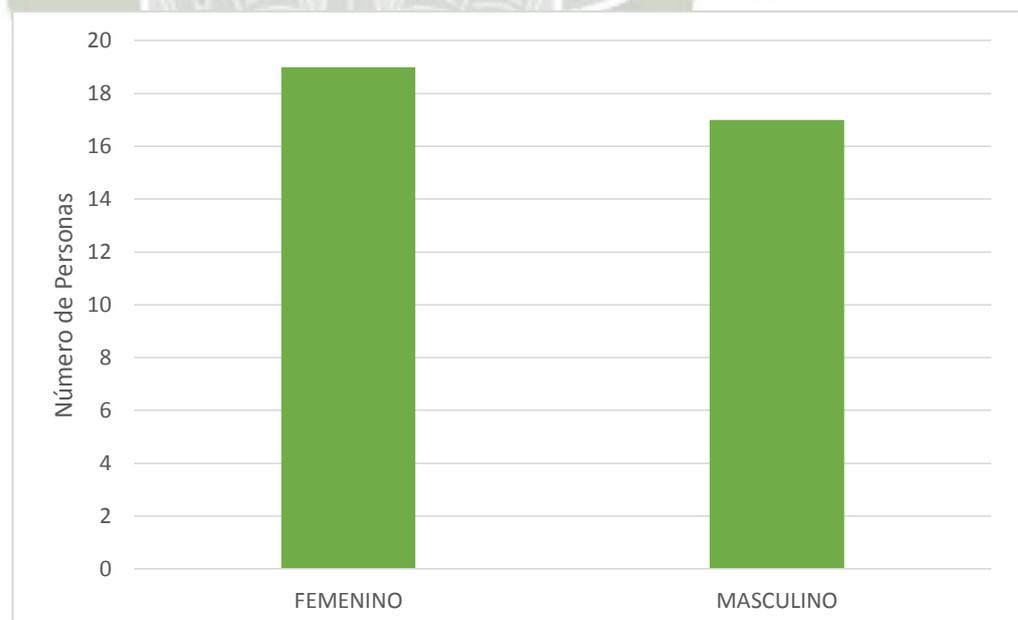
#### 1.3.1.4. INCIDENCIA

En la actualidad existe una gran número de casos que no son detectados a tiempo, el melanoma maligno en muchos casos puede requerir una cirugía cuando están en una fase muy avanzada, porque se corre riesgo de que este pueda llegar y comprometer otras regiones u órganos.

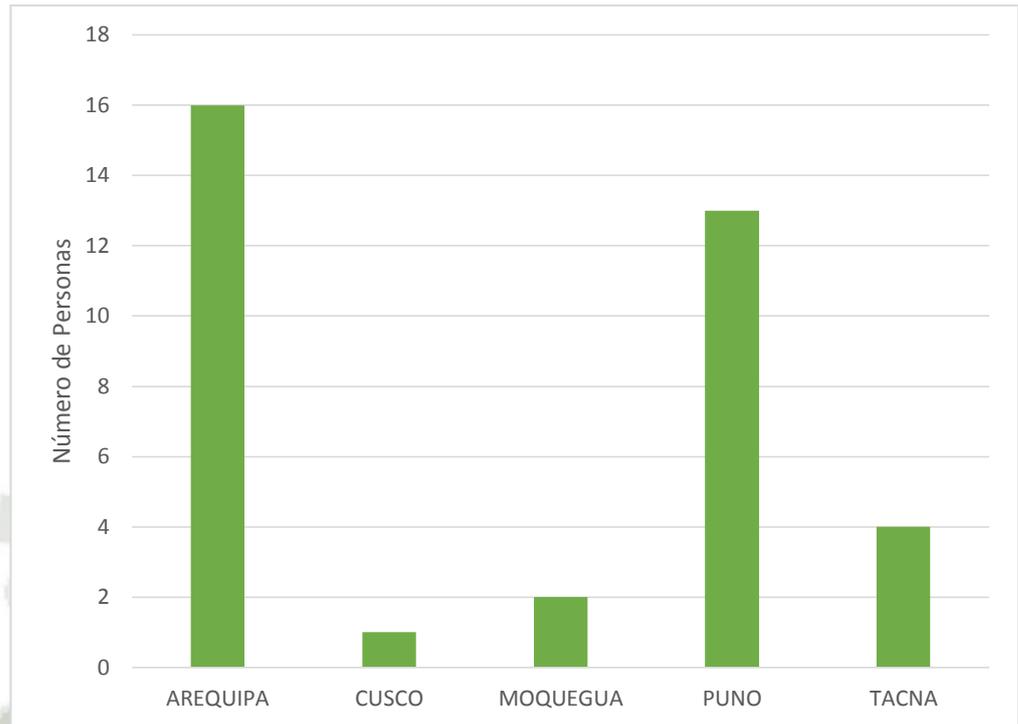
Los datos siguientes son proporcionados por el Instituto Regional de Enfermedades Neoplásicos del Sur (IREN SUR), en 36 pacientes diagnosticados con Melanoma Maligno durante el periodo de Enero 2016 hasta Agosto 2017

Tabla 2. Estadística de cirugías en el IREN SUR

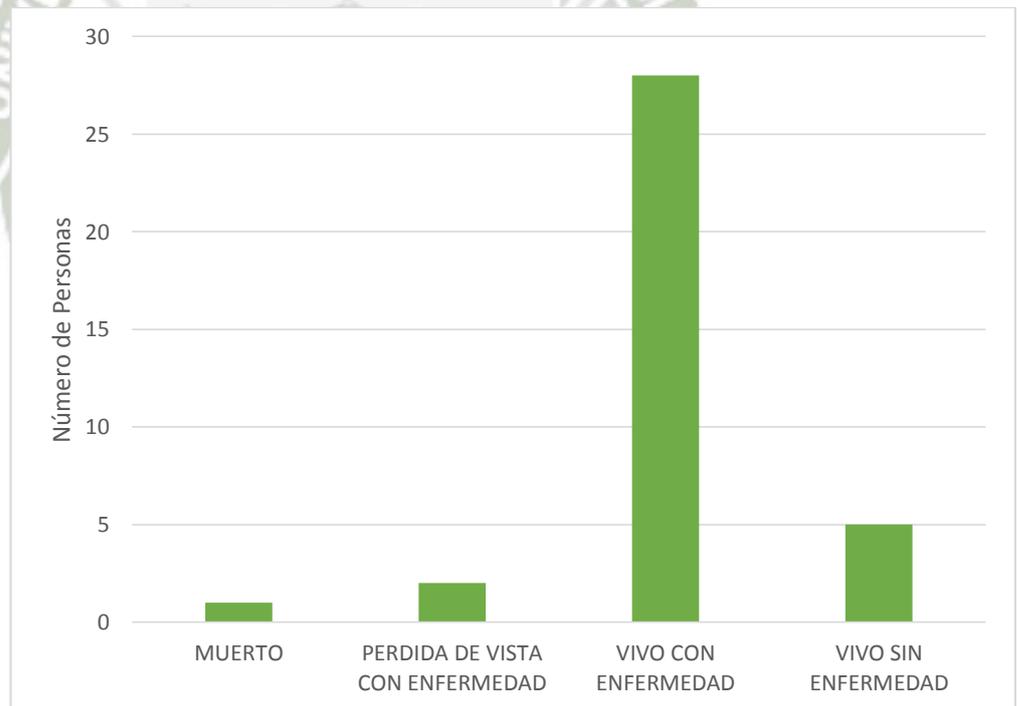
AÑO	CIRUGIA MAYOR	CIRUGIA MENOR	TOTAL
2016	22	55	77
2017	17	35	52
<b>TOTAL</b>	39	90	129



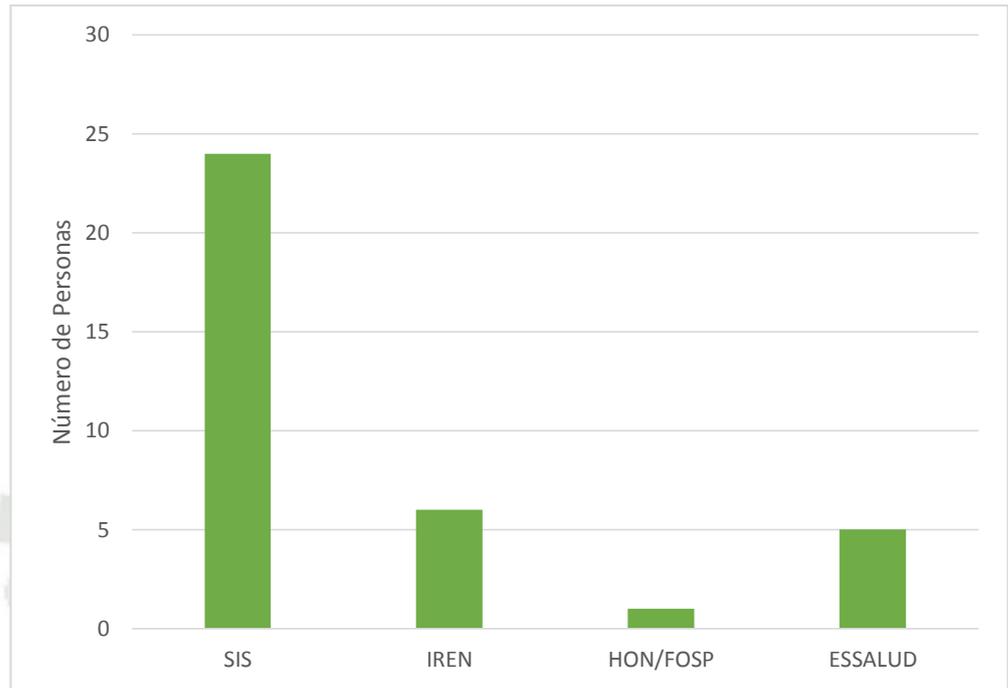
Gráfica 2. Melanoma maligno según género del paciente en IREN-SUR



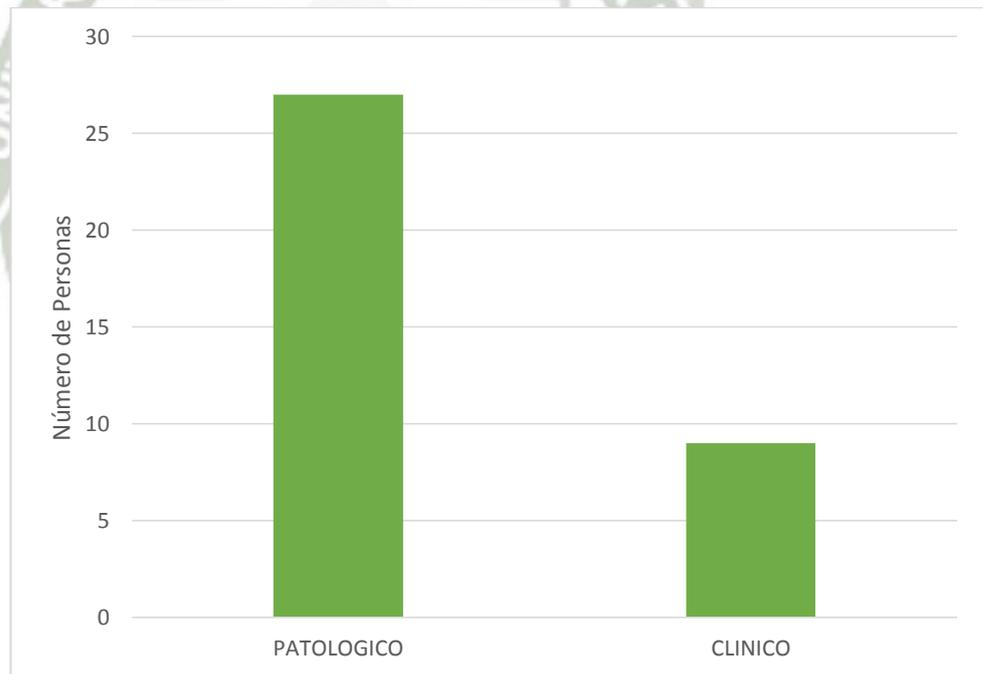
Gráfica 3. Melanoma maligno según lugar de procedencia del paciente en IREN-SUR



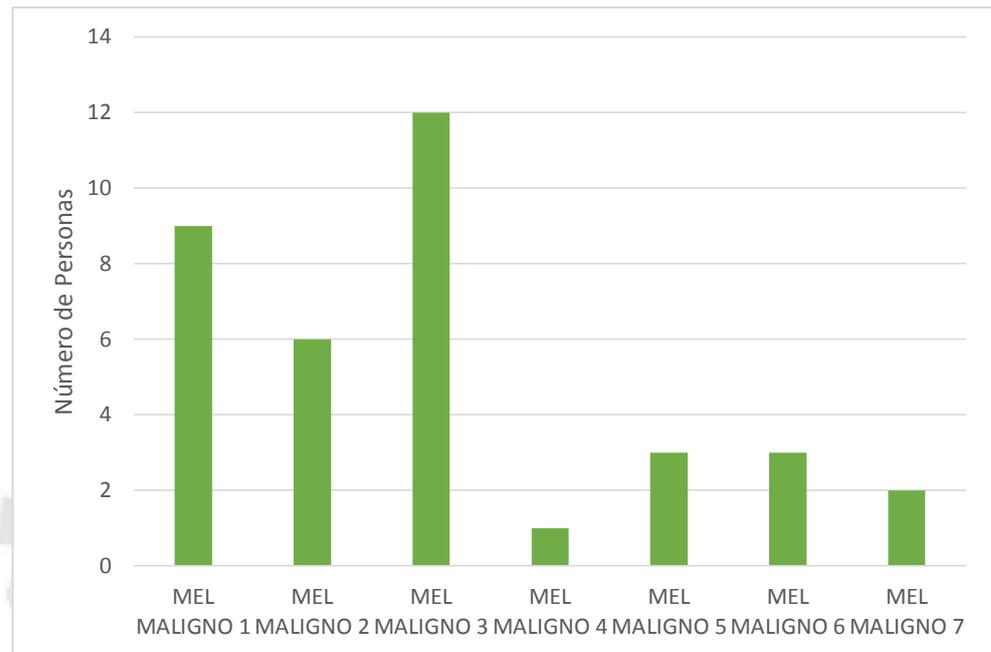
Gráfica 4. Melanoma maligno según estado del paciente en IREN-SUR



Gráfica 5. Melanoma maligno según tipo de seguro de paciente en IREN-SUR



Gráfica 6. Melanoma maligno según tipo de diagnóstico en pacientes en IREN-SUR



Gráfica 7. Melanoma maligno según diagnóstico clínico en pacientes en IREN-SUR

Dónde: Mel Maligno 1 es Melanoma maligno de la piel, Mel maligno 2 es Melanoma maligno de otras partes no especificadas, mel melanoma 3 es Melanoma maligno de piel con sitio no especificado, mel maligno 4 es Melanoma maligno de sitios contiguos a la piel, mel maligno 5 es Melanoma maligno de cuero cabelludo y del cuello, mel maligno 6 es Melanoma maligno del miembro superior y Mel maligno 7 es Melanoma maligno del parpado, incluida la comisura

#### 1.4. CEDRÓN (*Lippia citriodora*)

El cedrón es una planta que pertenece al género *Lippia*, es utilizada como planta medicinal.

##### 1.4.1. CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA

- Familia: Verbenaceae
- Género: *Lippia*
- Especie: *Citriodora*

Sinonimias: *Aloysia citriodora*

Nombres comunes: Cedrón, verbena de indias, maría luisa. (9)

#### 1.4.2. CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS

- Hojas: son simples, rugosas, reunidas en verticilos de tres, raro cuatro, su limbo, entero o un poco dentado, de color verde pálido, presenta una nervadura mediana, saliente en la cara inferior, de la cual se destaca una serie de nervaduras secundarias paralelas, que se reúnen para formar una especie de cordón paralelo al borde foliar, y despiden, al ser restregadas, un agradable olor a limón. (Figura 17) (9)
- Arbusto: caducifolio, de entre 3 a 7 m de altura, con tallos subleñosos o leñosos en la parte superior. (9)
- Flores: pequeñas blanquecinas o blanquecino-violáceas, agrupadas en espigas. También tiene flores de color rosa, florece en verano, formando inflorescencias en espigas laxas, de hasta 10 cm de largo, de color pálido o lila. (Figura 17) (9)
- Fruto: es una drupa que se divide en dos núculas monoseminadas. (9)



Figura 17. Cedrón (47)

#### 1.4.3. UBICACIÓN

Zonas tropicales en Sudamérica y también de forma silvestre en todo el occidente de Sudamérica. (48) (49) (50)

#### 1.4.4. USOS MEDICINALES

Suelen emplearse sus hojas en infusión, solas o mezcladas con otras plantas. El sabor y aroma de sus hojas recuerda al limón o la melisa. Ayuda a elevar el ánimo y combatir la depresión. Tónica, estomacal, digestiva, antiespasmódica, carminativa (favorece expulsión de gases), antiinflamatorios, antioxidantes, anti-bacterianos, antitumorales, anti fúngicos, fotoprotectores y quelantes. (48) (49) (50)

Efectos: Eupéptico y espasmolítico (aceite esencial), carminativo (aceite esencial), antiséptico (aceite esencial), antihistamínico (aceite esencial), ligeramente sedante (aceite esencial), analgésico local (aceite esencial), antipirético, corrector organoléptico. (51)

#### 1.4.5. COMPOSICIÓN QUÍMICA

Composición: Posee en su composición, aceites esenciales, entre los que se destacan el citral y el linalol. (52)

Tabla 3. Principios activos del cedrón (*Lippia citriodora*)

<b>Aceite esencial</b>	(0.1 – 0.3%)
<b>Monoterpenos: lilmoneno</b>	(6 %)
<b>Sesquiterpenos</b>	(18%)
<b>Alcoholes alifáticos</b>	(1 - 1.5%)
<b>Monoterpenoles</b>	(15 - 16%)
<b>Sesquiterpenoles</b>	(4 - 5%)
<b>Esteres terpenicos</b>	(6%)
<b>Aldehídos</b>	(39 - 40%)

## 1.5. METODOLOGÍA DE ESTUDIO

### 1.5.1. CULTIVO CELULAR

Actualmente se entiende por cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células 'in vitro', manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Se distinguen cuatro tipos de cultivo celular: cultivo de órganos, explantes primarios, cultivo celular primario y cultivos isotópicos y organotópicos. (53) (54)

#### 1.5.1.1. CULTIVO CELULAR PRIMARIO

Se puede obtener a partir de explantes primarios o de suspensiones de células disgregadas. La disgregación celular se realiza por métodos enzimáticos o mecánicos. En estos cultivos se pierden las interacciones célula-célula y las interacciones de la célula con la matriz extracelular. Sin embargo, las células son capaces de proliferar y la población celular crece notablemente. Cuando las células ocupan toda la superficie disponible se dice que han alcanzado la confluencia. En esta etapa, las células establecen contactos entre ellas que inhiben su proliferación y el crecimiento se detiene. Por eso, al cabo de un tiempo hay que trasplantar las células a un nuevo soporte. Esta operación se denomina subcultivo o pase. Existen dos tipos de cultivo celular primario: (53)

- Cultivos en monocapa: las células crecen adheridas sobre un soporte sólido (plástico o vidrio). El anclaje al sustrato es un prerequisite para la proliferación celular. Es el método utilizado para la mayoría de las células excepto para las hematopoyéticas.
- Cultivos en suspensión: las células se encuentran dispersas en el medio de cultivo. Su crecimiento no depende del anclaje. Este tipo de cultivo se restringe a las células hematopoyéticas, células madre, líneas celulares transformadas y células tumorales. Alcanzan la confluencia cuando el número de células es grande y los nutrientes son insuficientes. (53)

### 1.5.1.2.DENSIDAD CELULAR (VIABILIDAD Y CONTEO CELULAR)

En la mayoría de los laboratorios, la cámara de recuento que se utiliza es el hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad con reglilla de Neubauer, la cual consta de 9 cuadrados con lados de 1 mm (área total de recuento = 0.9 mm<sup>2</sup>), cada uno de los cuales corresponde a un volumen de 0.1 µL. Los cuatro extremos están subdivididos en 16 cuadros pequeños. El cuadro central contiene 25 cuadros, cada uno con un área de 0.04 mm<sup>2</sup> (0.2 mm x 0.2 mm), a su vez divididos en 16 cuadros más pequeños. (Figura 18) (55)

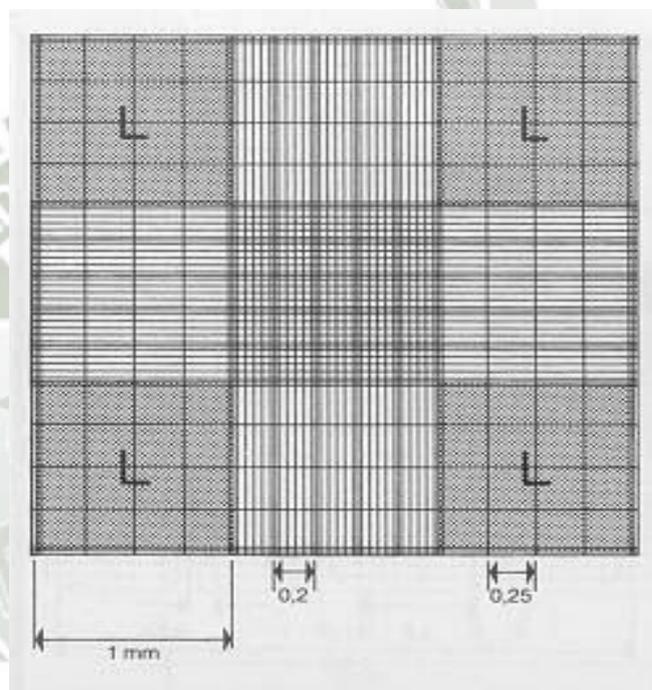


Figura 18. Cámara de Neubauer (56)

Si se contaron todas las células presentes en los 4 cuadrados de 1 mm<sup>2</sup> marcados como “L” en la Figura 14, la ecuación será: (57)

$$\text{Células}/_{mL.} = \frac{\# \text{ de Células vivas}}{4} \times F. \text{ Dilución} \times Vol.$$

Ecuación 2. Cálculo de células por mililitro

Para calcular el porcentaje de viabilidad celular la ecuación será: (57)

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\# \text{ de Células vivas}}{\# \text{ Total de Celulas}} \times 100$$

Ecuación 3. Cálculo de viabilidad celular.

### 1.5.2. EXTRACCIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS DE UNA PLANTA

Se puede obtener los principios activos de las plantas a través de procesos de extracción con solventes, por ejemplo agua, etanol, metanol entre otros, estos procesos pueden ser por diferentes métodos, pero todo depende del disolvente. La extracción Soxhlet es un método en caliente, sólido – líquido, que se desarrolla empleando solventes con puntos de ebullición bajo, para evitar la degradación de la muestra. Conveniente para obtener los extractos crudos de las plantas. (58) (59)

### 1.5.3. ENZIMA

Biomoléculas que catalizan reacciones químicas, es decir, aumentan notablemente la velocidad de una reacción. (Figura 19) (60) (61)



Figura 19. Acción general de una enzima (61)

La formación de producto o consumo de sustrato se obtiene generalmente una curva hiperbólica rectangular similar a la que se muestra en la Figura 20 (62)

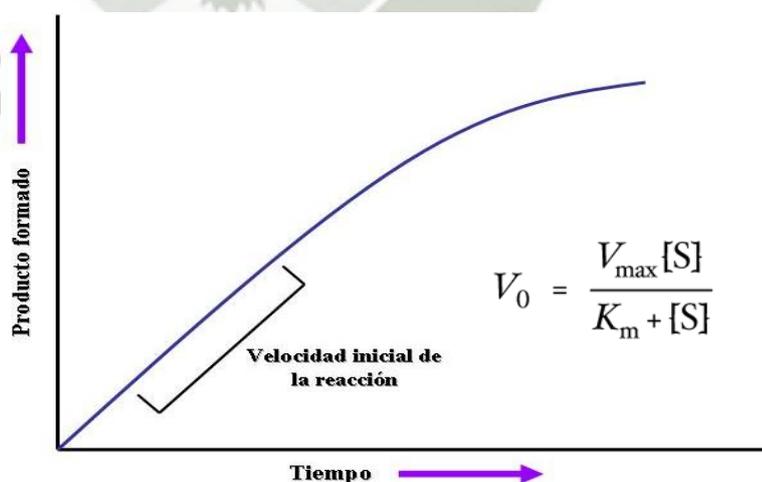


Figura 20. Curva de formación de producto con respecto al tiempo.

(63)

La cinética enzimática estudia la velocidad de las reacciones bioquímicas y las reacciones catalizadas por enzimas, en la medida de la formación de producto o la desaparición de sustrato por unidad de tiempo. Estos estudios proporcionan información directa acerca del mecanismo de la reacción catalítica y de la especificidad del enzima. (29)(60)

A bajas concentraciones de sustrato la velocidad cambia linealmente con respecto al sustrato, dando cinética de primer orden. (62)

A concentraciones altas de sustrato la velocidad es independiente del sustrato, dando una cinética de orden cero. (62)

A concentraciones intermedias de sustrato se halla una mezcla de cinéticas de cero y primer orden.. (62)

Las constantes cinéticas  $K_m$  y  $V_0$ , muestran las condiciones y el comportamiento del complejo enzima-sustrato.

$K_m$  grande = baja afinidad enzima-sustrato.

$K_m$  baja= alta afinidad enzima-sustrato. (62)

Los inhibidores enzimáticos son moléculas que reducen o anulan la actividad enzimática. Estos inhibidores pueden unirse a las enzimas de forma reversible (la desaparición del inhibidor restaura la actividad enzimática) o irreversible (el inhibidor inactiva permanentemente a la enzima). (Figura 21) (63)

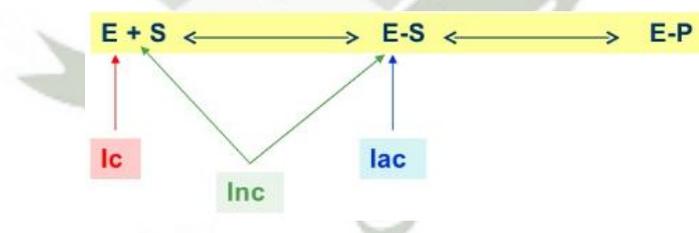


Figura 21. Actividad inhibitoria reversible de una enzima (64)

La velocidad de la reacción catalizada enzimáticamente, es directamente proporcional a la concentración de sustrato, hasta cierto punto, su medición se puede lograr de manera experimental en un laboratorio, estos cambios de producción o consumo se presencian por la cantidad de luz que se refracta en la sustancia (Medición con un espectrofotómetro o un radiómetro) en el rango que este se encuentre. (65)

#### 1.5.4. ESPECTROMETRÍA

La espectrometría es la técnica espectroscópica para tasar la concentración o la cantidad de especies determinadas. En estos casos, el instrumento que realiza tales medidas es un espectrofotómetro. (66)

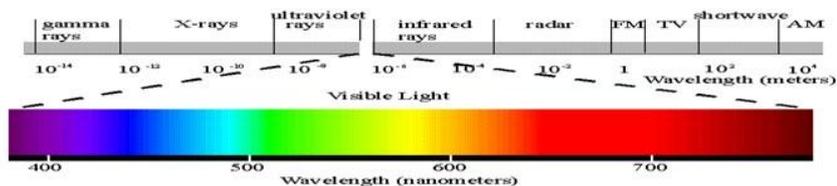


Figura 22. Rango de Espectrometría (67)

La espectroscopia UV-Visible, mide la absorción de luz en la región ultravioleta y visible del espectro.

La región UV-Visible se encuentra entre las regiones del infrarrojo cercano y los rayos X. Espectro UV: 190 nm a 380nm

Espectro Visible (Vis): 360 nm a 780 nm (Infrarrojo cercano hasta 1100 nm) (67)

##### 1.5.4.1. ENSAYO DE ABSORCIÓN UV

Entre una variedad de métodos para la cuantificación del aminoácido tirosina, existe el ensayo de absorción de UV, la cual se da a 280 nm, su mecanismo se basa en la absorción de tirosina y triptófano, la cual se atribuye al grupo fenólico de la tirosina y al grupo indólico del triptófano, tiene la ventaja de que no es necesario utilizar reactivos y la muestra no se daña o destruye durante la determinación. La tirosina se absorbe a una longitud de onda de 280 sobre todo cuando se produce la desprotonación del OH del anillo aromático. (68) (69) (70)

# CAPITULO II

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. MATERIALES

#### 2.1.1. INSUMOS

- Agua destilada.

#### 2.1.2. MATERIALES DE LABORATORIO

- Buffers de calibración para pH metro
- Cubeta para espectrofotómetro
- Estuche de disección.
- Gradilla para tubos eppendorf.
- Guantes de Nitrilo
- Hojas de bisturí.
- Jeringas de 10 ml.
- Mechero
- Micropipeta de rango variable de 20 a 100  $\mu$ l y de 100 a 1000  $\mu$ l.
- Papel filtro
- Piceta.

- Propipeta
- Puntas para micropipeta amarillos. (20 a 100  $\mu$ l)
- Puntas para micropipeta azul. (100 a 1000  $\mu$ l)
- Termómetro.
- Tubos eppendorf de 1500  $\mu$ l.
- Tubos Falcón

### 2.1.3. MATERIAL DE VIDRIO

- Bagueta.
- Beaker de 100 ml.
- Bureta de 25 ml.
- Hematocitometro (Neubauer)
- Frascos de vidrio color ámbar.
- Matraces de 100 ml y 250 ml.
- Pipetas de 2 ml, 5 ml y 10 ml.
- Pipeta Pasteur
- Placas Petri de vidrio de 100 x 15 mm.
- Probeta de 100 ml.

### 2.1.4. MATERIAL BIOLÓGICO

- Biopsia de melanoma humano
- Hojas secas de Cedrón (*Lippia citriodora*)
- Ratón (*Mus músculus*)

### 2.1.5. REACTIVOS QUÍMICOS

- Alcohol de 96°. (Diproquim)
- Alcohol isopropilico (Merck)
- Azul de tripano al 0.4% (Merck)

- Buffer Fosfato Salino. (Sigma)
- Dimetilsulfóxido. (Sigma)
- L-tirosina (Sigma)
- Metanol. (Merck)
- Mix de antibióticos.
- Suero Fetal Bovino
- Tirosinasa (Sigma)

#### **2.1.6. MEDIOS DE CULTIVO**

- Medio DMEM (Sigma)

#### **2.1.7. EQUIPOS DE LABORATORIO**

- Balanza Analítica. (Ohaus – Pionner)
- Cámara de Flujo Laminar. (Labculture – Esco Class II Type A2)
- Centrifuga de tubos eppendorf. (Stratagene – 10K)
- Cocina Eléctrica.
- Equipo de Extracción de Soxhlet.
- Espectrofotómetro UV-Visible (Shimadzu – UV-160A)
- Hot Plate (Agimatic - Ed)
- Incubadora (Thermo Scientific)
- Microscopio (Olympus – CX23)
- Microscopio invertido (Zeiss)
- pH metro (Hanna – pH210)
- Refrigerador
- Rota Vapor. (Buchi –RII)
- Triturador de hojas. (Oster)

### 2.1.8. OTROS MATERIALES

- Algodón.
- Bolsas Ziploc.
- Cooler
- Encendedor.
- Frascos esteriles.
- Gels Pack
- Marcador indeleble.
- Papel Aluminio
- Pinzas metálicas.

## 2.2. MÉTODOS

### 2.2.1. RECOLECCIÓN Y OBTENCIÓN DE EXTRACTO DE CEDRÓN (*Lippia citriodora*)

Se recolectaron hojas de cedrón (*Lippia citriodora*) en la ciudad de Arequipa. Perú, caracterizadas taxonómicamente por el herbario arequipense – HUSA (Anexo 4), las cuales se lavaron y se hicieron secar a temperatura ambiente. Luego se trituraron para obtener partículas pequeñas para la obtención del extracto. (Grafica 8) (71)

Se utilizó el método continuo de Soxhlet para la obtención del Extracto de Cedrón (*Lippia citriodora*), entonces se pesaron 10 g. de hojas trituradas de Cedrón (*Lippia citriodora*) (Gráfica 8) y se colocaron en un cartucho de papel filtro y como solvente se utilizaron 100 ml de Metanol, esto por duplicado. (1)

A continuación se realizó 5 ciclos completos a 60° C. para la concentración de la muestra, luego se concentró la muestra en un Rota Vapor a 60° C y se pesó el extracto obtenido como se muestra en la Gráfica 8.

Finalmente se diluyó el extracto en Dimetilsulfóxido para obtener las siguientes concentraciones: 2.5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml y 40 µg/ml, se guardó en frascos ámbar estéril y se refrigeró hasta su uso.



Gráfica 8. Obtención de extracto de Cedrón (*Lippia citriodora*).

A) Hojas secas de cedrón (*Lippia citriodora*), B) Hojas pulverizadas, C) Extracción por Soxhlet, D) Concentración del extracto.

### 2.2.2. OBTENCIÓN DE CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO

Para este trabajo se emplearon 2 muestras de biopsia de melanoma humano procedentes de dos pacientes diferentes diagnosticadas con esta patología.

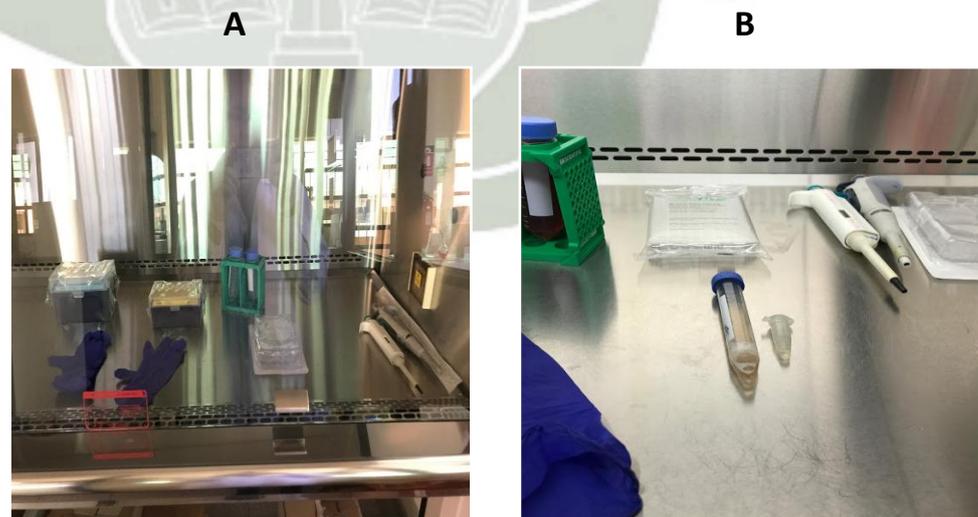
Las muestras fueron proporcionadas por el Instituto Regional de Enfermedades Neoplásicas del Sur (IREN-SUR), siguiendo sus protocolos.

Las muestras fueron transportadas en frascos estériles con Buffer Fosfato Salino y medio DMEM enriquecido hasta el lugar de estudio (Universidad Católica de Santa María)

### 2.2.3. PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO CELULAR

Se enriqueció 50 ml del medio DMEM para su utilización, con 10% de Suero fetal bovino, 1 ml de un complejo de antibióticos y antimicóticos que contenía penicilina, estreptomycinina y anfotericina. (1)

En la gráfica 9 se muestra la cámara de flujo laminar, la cual debe ser esterilizada con los materiales a trabajar con radiación UV durante 15 a 20 minutos aproximadamente.



Gráfica 9. Preparación de medio DMEM enriquecido.

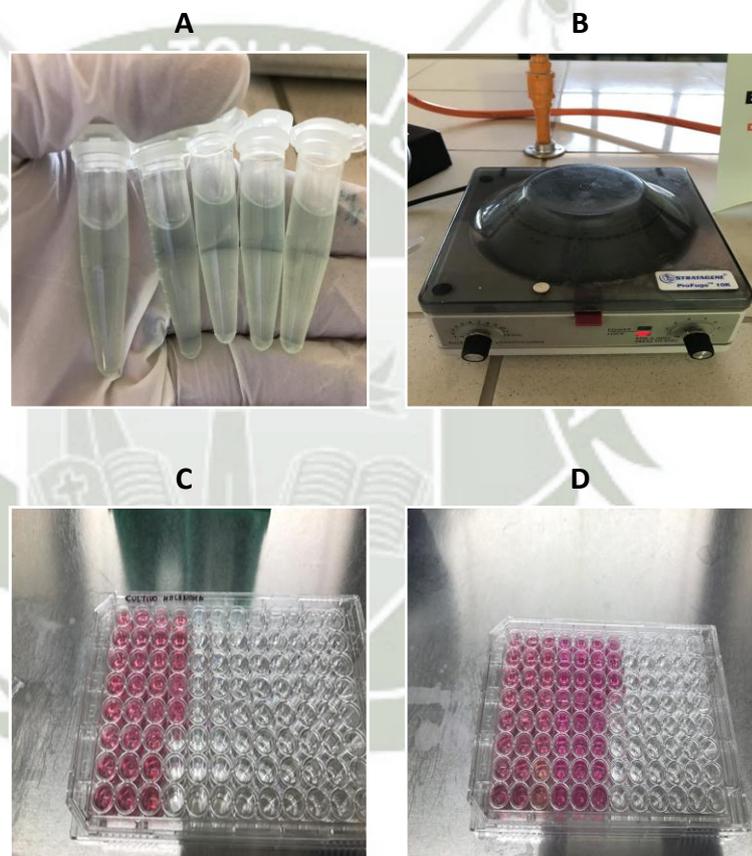
A) Cámara de Flujo Laminar, B) Suero fetal Bovino y complejo antibacteriano- anti fúngico.

#### 2.2.4. CULTIVO DE CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO

Se disgregó de forma mecánica en Buffer fosfato salino la muestra de melanoma humano proporcionado por el IREN-SUR, posteriormente se recuperó todo con una pipeta Pasteur en tubos eppendorf. (Gráfica 10)

A continuación se centrifugó a 2000 rpm durante 2 minutos, luego se eliminó el sobrenadante y se añadió 500  $\mu$ l de medio DMEM enriquecido.

Finalmente se colocó 200  $\mu$ l en cada pozo de la micro placa para cultivo celular y se dejó incubar durante 48 horas a 37°C y a 5% de CO<sub>2</sub>.



Gráfica 10. Cultivo de Células de Melanoma

A) Recuperación de muestra de melanoma humano disgregada en Buffer Fosfato Salino, B) Centrifuga de tubos eppendorf, C) Cultivo de Células de melanoma humano (Biopsia 1) en Microplaca, D) Cultivo de Melanoma humano (Biopsia 2) en microplaca.

### 2.2.5. CULTIVO DE CÉLULAS DE RATÓN (MACRÓFAGOS)

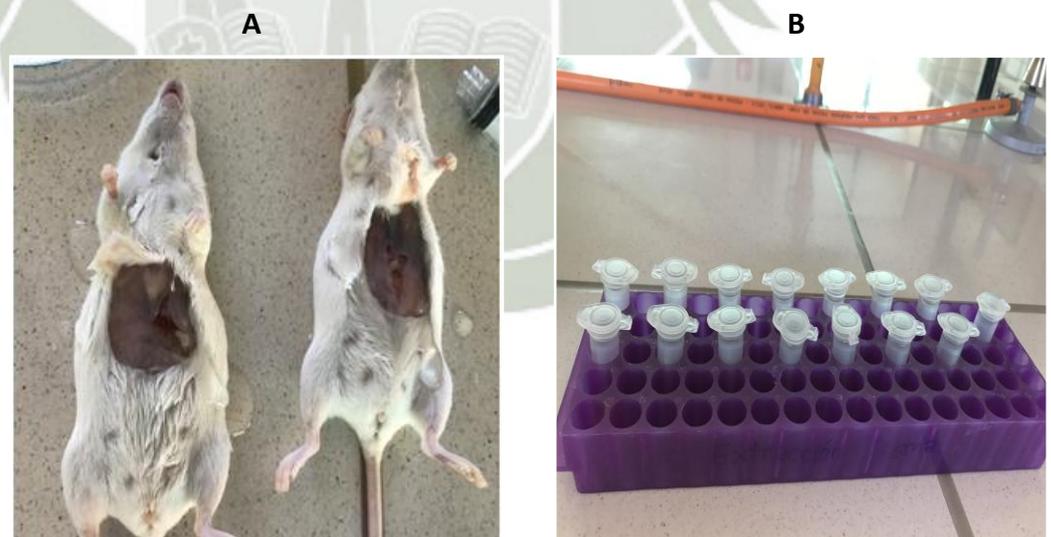
Se beneficiaron dos ratones (*Mus musculus*) proporcionados por el Beaterio de la Universidad Católica de Santa María, para la obtención de macrófagos peritoneales con Buffer Fosfato Salino, posteriormente se abrió el peritoneo haciendo un corte transversal. (Gráfica 11)

Luego se inoculo 3 ml de Buffer Fosfato Salino en condiciones asépticas, sin perforar vísceras al introducir y extraer la solución.

Posteriormente se lavó el peritoneo con ligeros masajes y se recuperó todo con mucho cuidado en tubos eppendorf. (72) (73)

A continuación se centrifugo a 2000 rpm durante 2 minutos, luego se eliminó el sobrenadante y se añadió 500  $\mu$ l de medio DMEM enriquecido. (Gráfica 12)

Finalmente se colocó 200  $\mu$ l en cada pozo de la micro placa para cultivo celular y se dejó incubar durante 24 horas a 37°C y a 5% de CO<sub>2</sub>. (Gráfica 12)



Gráfica 11. Cultivo de células de macrófagos peritoneales de Ratón (*Mus musculus*) (Parte I)

A) Diseción de ratones, B) Recuperación de células del peritoneo



Gráfica 12. Cultivo de células de macrófagos peritoneales de Ratón (*Mus musculus*) (Parte II)

C) Centrifugación de tubos eppendorf, E) Cultivo de macrófagos.

### 2.2.6. TRATAMIENTO DE CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO Y CÉLULAS DE MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN (*Mus Musculus*) CON EXTRACTO DE CEDRÓN (*Lippia citriodora*)

Para el tratamiento se retiró cuidadosamente el medio DMEM de la microplaca, inmediatamente después se añadió medio nuevo y el extracto en una relación de 10:1 respectivamente y se dejó incubar durante 48 horas a 37°C y a 5% de CO<sub>2</sub>. (1)

### 2.2.7. EVALUACIÓN DE VIABILIDAD DEL CULTIVO CELULAR

La citotoxicidad se evaluó con el método de exclusión con azul de tripano, para ello se preparó el azul de tripano al 0.4% (ANEXO 1)

A continuación mezclaron 50 µl de células en medio DMEM enriquecido con 50 µl de azul de tripano al 0.4%.

Finalmente se contaron las células viables al microscopio para cada replica de cada concentración y de los controles. (74)

### 2.2.8. EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA CON Y SIN EXTRACTO DE CEDRÓN (*Lippia citriodora*)

Primeramente se preparó 400 ml. sustrato (ANEXO 2) y 50 ml de la enzima (ANEXO 3), y se verificó que tengan un pH dentro del rango aceptable (6.5 a 7.5)

Luego se colocó 20 ml del sustrato (L-Tirosina) en un beaker de 100 ml, este a su vez en un hot-plate, y se controló una temperatura de 37°C

Seguidamente se añadió la solución enzimática (Tirosinasa) a razón de 0.2 ml por minuto aproximadamente y se tomó una alícuota cada minuto durante 15 minutos. Inmediatamente después se midió cada alícuota en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 280 nm, todo esto por triplicado para cada concentración y control. (1) (30)

Finalmente se realizaron los cálculos para la evaluación de la cinética para cada muestra.

### 2.2.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se realizó el análisis estadístico de los resultados obtenidos, expresados como media y error estándar, se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de ( $p < 0.05$ )

## CAPITULO III

### RESULTADOS

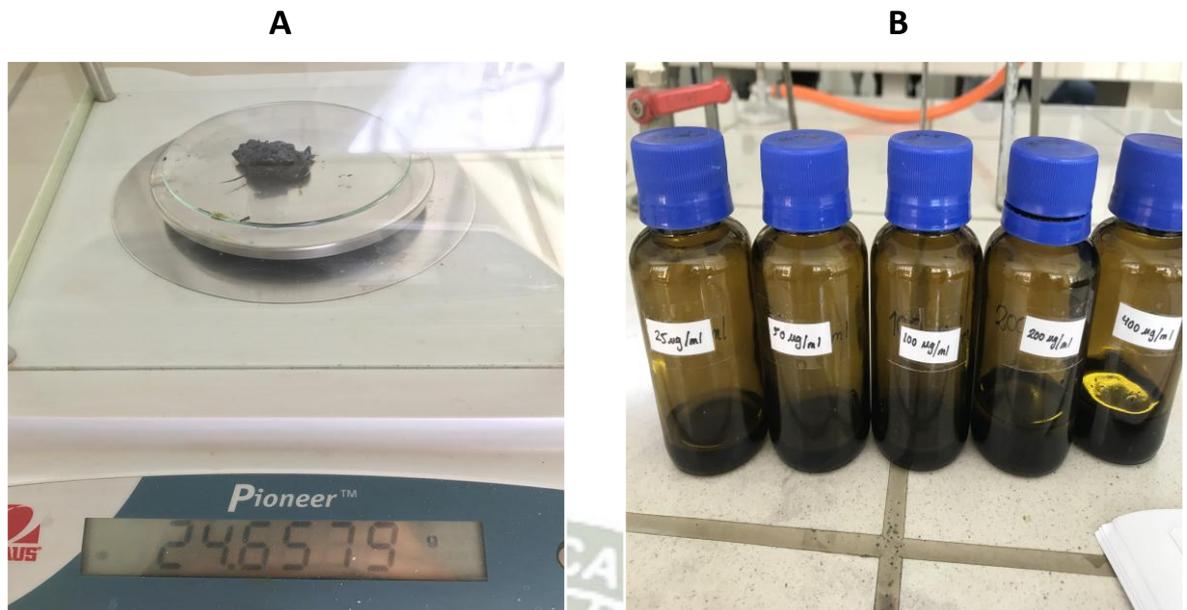
En términos generales el cultivo in vitro de melanoma humano tiene una gran ventaja sobre los ensayos in vivo, ya que ayuda a la determinación de efectividad de ensayos que mejoren esta patología sin la necesidad de desarrollarla en animales de experimentación.

La actividad de la tirosinasa está regulada por varios factores, químicos, físicos, genéticos, entre otros. La composición del extracto de cedrón (*Lippia citriodora*) ha logrado en este estudio tener una acción inhibitoria de la enzima tirosinasa y a su vez una actividad no citotóxica sobre células de ratón (*Mus musculus*).

En comparación con otros estudios que trabajaron con el género *Lippia*, Feng-Ling Et-al que trabajo *Lippia nodiflora* y García Et-al que trabajo con *Lippia graveolens*, el cedrón posee menor actividad inhibitoria, pero podría ser un potenciador en un consorcio de componentes activos con otras plantas.

#### **3.1 RECOLECCIÓN Y OBTENCIÓN DE EXTRACTO DE CEDRÓN (*Lippia citriodora*)**

Se realizó una extracción por el método continuo Soxhlet utilizando como solvente el metanol, obteniéndose así de 20 g. de hojas secas de Cedrón (*Lippia citriodora*), 2.5875g. de extracto concentrado como se muestra en la gráfica 9 y un rendimiento de 12.94% con respecto al material seco inicial.



Gráfica 13. Obtención de concentraciones del extracto de Cedrón (*Lippia citriodora*).

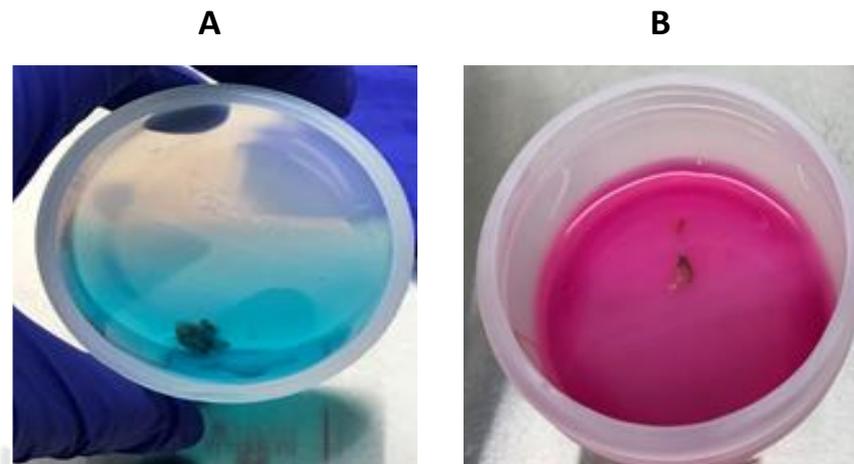
A) Extracto de cedrón (*Lippia citriodora*) y B) Concentraciones de extracto de cedrón (*Lippia citriodora*)

En la gráfica 13 se observa la preparación de concentraciones de extracto metanólico de cedrón y su rendimiento.

### 3.2 OBTENCIÓN DE CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO

Para este estudio se obtuvieron del Instituto Regional de Enfermedades Neoplásicas del Sur (IREN-SUR), dos muestras (Biopsia) de aproximadamente de  $0.4 \text{ mm}^3$  de diámetro de pacientes que presentaron melanoma humano en la planta del pie, los cuales presentaron el melanoma avanzado y se les practicó una intervención quirúrgica, no se recogieron mayores datos por la protección del paciente y confidencialidad con la institución (IREN-SUR).

En la gráfica 14 se muestra ambas muestras, la primera se transportó en PBS y la segunda muestra se transportó en Medio DMEM enriquecido, ambas muestras fueron llevadas para en un cooler manteniéndose a  $4^\circ\text{C}$  aproximadamente.



Gráfica 14. Muestras (Biopsias) de Melanoma Humano.

A) Biopsia en PBS (Biopsia 1), B) biopsia en medio DMEM enriquecido (Biopsia 2)

### 3.3 PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO CELULAR

Se realizó en la cámara de flujo laminar, con la mayor asepsia posible.

Se enriqueció el medio DMEM comercial con 10% de Suero fetal bovino y complejo antibacteriano – anti fúngico. Posteriormente se refrigeró para sus posteriores usos.

En la figura 22 se observa el medio DMEM enriquecido con el color característico del medio comercial, el cual si cambia de color con el progreso del trabajo nos indica que está contaminado.

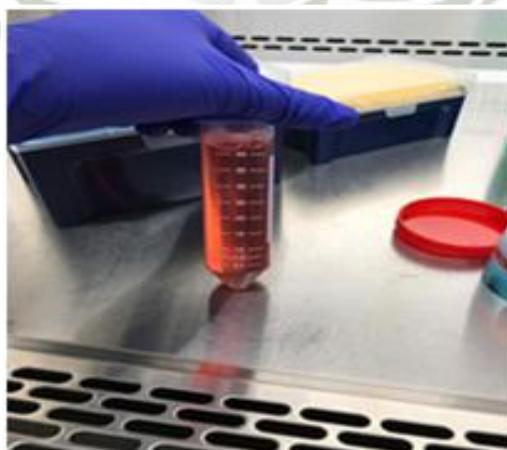
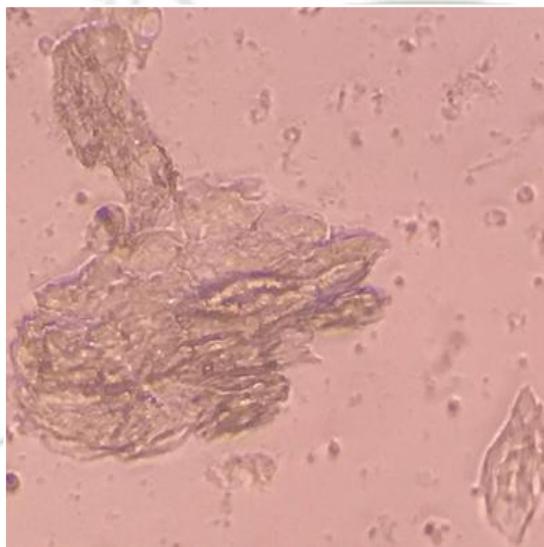


Figura 23. Medio DMEM enriquecido

### 3.4 CULTIVO DE CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO

Se cultivaron las células de melanoma humano en el Medio DMEM enriquecido y se dejó a condiciones de 37°C y a 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 horas y esperó a que proliferen, refrescando el medio de cultivo en intervalos de 72 y 96 horas hasta observar una confluencia y diferenciación adecuada, una vez determinado esto se realizó un conteo celular por el método de Azul de tripano obteniéndose  $2.4 \times 10^5$  células/ml de melanoma humano, para ello se utilizó la ecuación 2.

**Varias células de melanoma**



**Una sola célula de melanoma**



Gráfica 15. Células de Melanoma Humano a 18 días de cultivo

En la gráfica 15 se observa las células cultivadas del Melanoma Humano, creciendo juntas o aglomeradas en el medio por tratarse de un cultivo primario, se puede observar su núcleo ovoide y la forma de la célula es alargada como se muestra en la gráfica.

### 3.5 CULTIVO DE CÉLULAS DE RATÓN (MACROFAGOS)

Se cultivaron células de macrófagos peritoneales de ratón (*Mus Musculus*) (Figura 23) hembra en Medio DMEM enriquecido y se dejó a condiciones de 37°C y a 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 horas y esperó a que proliferen, refrescando el medio de cultivo en intervalos de 72 y 96 horas hasta observar una confluencia y diferenciación

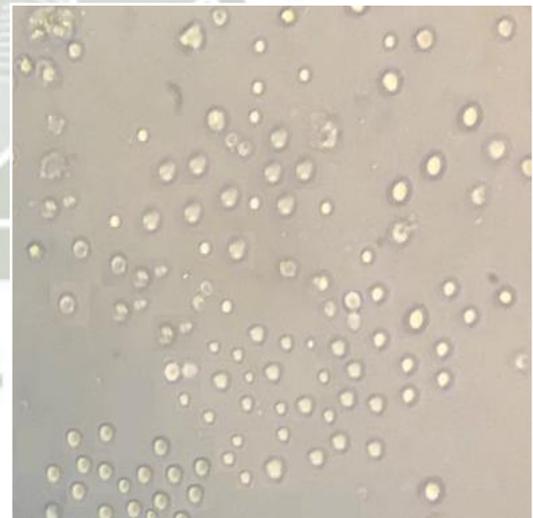
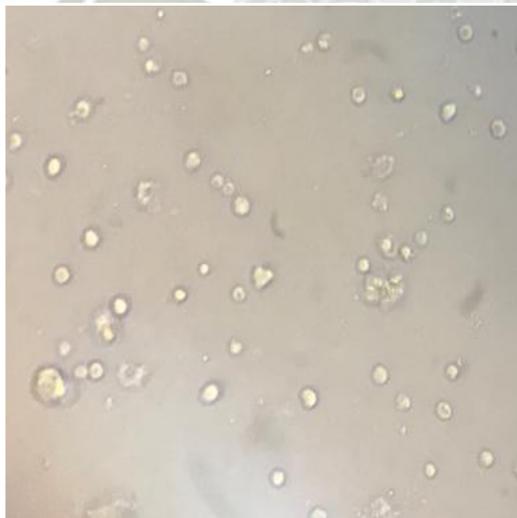
adecuada, una vez determinado esto se realizó un conteo celular por el método de Azul de tripano obteniéndose  $5.2 \times 10^5$  células/ml de macrófagos peritoneales de ratón, para ello se utilizó la ecuación 2.



Figura 24. Ratón (*Mus Musculus*)

A

B



Gráfica 16. Macrófagos peritoneales de ratón (*Mus musculus*)

A) Macrófagos peritoneales de ratón a 48 horas de cultivo y B) Macrófagos peritoneales de ratón a 8 días de cultivo

### 3.6 TRATAMIENTO DE CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO Y CÉLULAS DE MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN (*Mus Musculus*) CON EXTRACTO DE CEDRÓN (*Lippia citriodora*)

Las tres microplacas se trataron con los extractos, Donde control positivo es solo medio DMEM enriquecido, el control negativo esta tratado con Dimetilsulfóxido, V es el pocillo vacío, es decir no contiene nada y los números son los tratamientos a diferentes concentraciones, según corresponde en la descripción de cada tabla.

Se trataron de la siguiente manera:

Tabla 4. Esquema de tratamiento de Microplaca 1 de Biopsia 1

Donde (+): Control positivo, (-): Control negativo, (1): 2.5µg/ml de extracto, (2): 5 µg/ml de extracto, (3): 10 µg/ml de extracto, (4): 20 µg/ml de extracto, (5):40 µg/ml de extracto y (V): Pocillo Vacío.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+	1	3	5	V	V	V	V	V	V	V	V
B	+	1	3	5	V	V	V	V	V	V	V	V
C	+	1	3	5	V	V	V	V	V	V	V	V
D	+	1	3	5	V	V	V	V	V	V	V	V
E	-	2	4	V	V	V	V	V	V	V	V	V
F	-	2	4	V	V	V	V	V	V	V	V	V
G	-	2	4	V	V	V	V	V	V	V	V	V
H	-	2	4	V	V	V	V	V	V	V	V	V

En la tabla 4 se muestra la placa con 96 pocillos en los cuales solo se utilizaron 28 pocillos, colocando 4 muestras por cada tratamiento debido a que sólo se pudo recuperar esa cantidad de muestra.

Tabla 5. Esquema de tratamiento de Microplaca 2 de Biopsia 2

Donde (+): Control positivo, (-): Control negativo, (1): 2.5µg/ml de extracto, (2): 5 µg/ml de extracto, (3): 10 µg/ml de extracto, (4): 20 µg/ml de extracto, (5):40 µg/ml de extracto y (V): Pocillo Vacío.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	2	3	4	5	+	-	V	V	V	V	V
B	1	2	3	4	5	+	-	V	V	V	V	V
C	1	2	3	4	5	+	-	V	V	V	V	V
D	1	2	3	4	5	+	-	V	V	V	V	V
E	1	2	3	4	5	+	-	V	V	V	V	V
F	1	2	3	4	5	+	-	V	V	V	V	V
G	1	2	3	4	5	+	-	V	V	V	V	V
H	1	2	3	4	5	+	V	V	V	V	V	V

Tabla 6. Esquema de tratamiento de Microplaca 3 de cultivo de Macrófagos

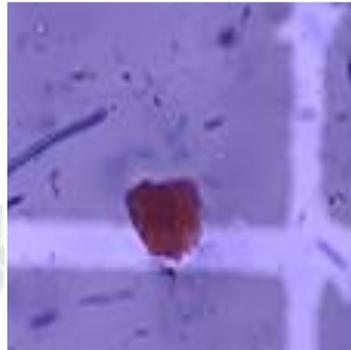
Donde (+): Control positivo, (-): Control negativo, (1): 2.5µg/ml de extracto, (2): 5 µg/ml de extracto, (3): 10 µg/ml de extracto, (4): 20 µg/ml de extracto, (5):40 µg/ml de extracto y (V): Pocillo Vacío.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	2	3	4	5	+	-	V	V	V	V	V
B	1	2	3	4	5	+	-	V	V	V	V	V
C	1	2	3	4	5	+	-	V	V	V	V	V
D	1	2	3	4	5	+	-	V	V	V	V	V
E	1	2	3	4	5	+	-	V	V	V	V	V
F	1	2	3	4	5	+	-	V	V	V	V	V
G	1	2	3	4	5	+	-	V	V	V	V	V
H	1	2	3	4	5	+	-	V	V	V	V	V

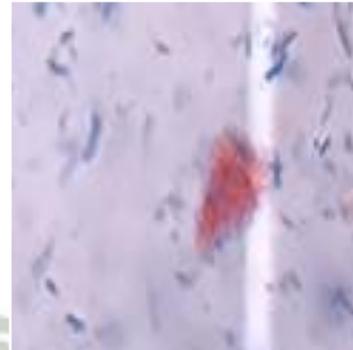
### 3.7 EVALUACIÓN DE VIABILIDAD DEL CULTIVO CELULAR

Se evaluó la viabilidad celular del cultivo de las células de melanoma humano y del cultivo de macrófagos peritoneales de ratón mediante el método de Azul de tripano.

**Biopsia 1**



**Biopsia 2**



Gráfica 17. Observación de células viables del cultivo de melanoma humano al microscopio.

**Viable**



**No viable**



Gráfica 18. Observación de macrófagos peritoneales de ratón al microscopio.

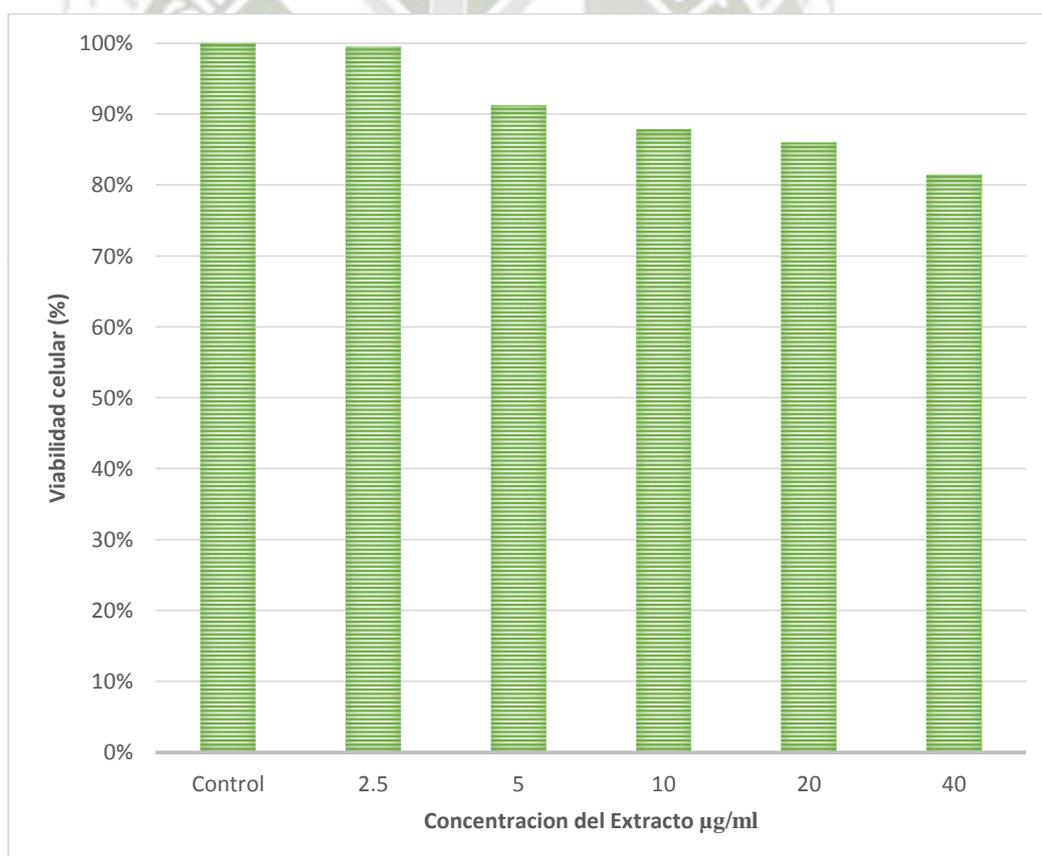
En la gráfica 17 se observa la viabilidad celular de las células de melanoma tratadas con las diferentes concentraciones del extracto metanólico de cedrón, mientras que la gráfica 18 muestra la viabilidad celular de macrófagos peritoneales de ratón tratadas con las diferentes concentraciones del extracto metanólico de cedrón.

Se evaluó la viabilidad celular de Melanoma Humano por triplicado de cada muestra por cada concentración y se realizó un análisis estadístico, basado en la media aritmética.

Tabla 7. Análisis de varianza de un factor (ANOVA) – Melanoma humano

<b>Grupos</b>	<b>Cuenta</b>	<b>Suma</b>	<b>Promedio</b>	<b>Varianza</b>
Control	12	1012.781	84.398	0.164
2.5	12	1007.448	83.954	0.004
5	12	924.426	77.036	6.394
10	12	890.159	74.180	0.022
20	12	871.195	72.600	1.295
40	12	825.020	68.752	0.316

Obteniendo una probabilidad de 5.3255 E-05, lo que significa que si existe una significancia entre los tratamientos con las diferentes concentraciones del extracto de cedrón sobre las células de melanoma humano, además esto también se puede comparar por el valor crítico F, ya que es menor al resultado del factor de Fisher.



Gráfica 19. Viabilidad celular de células de melanoma tratadas con extracto metanólico de Cedrón (*Lippia Citriodora*)

En la Gráfica 19 se muestra la viabilidad celular después del tratamiento con las concentraciones del extracto, lo cual muestra que el extracto tiene mayor eficacia a una mayor concentración, en el estudio del control negativo no se obtuvo una diferencia significativa con la viabilidad positiva, lo cual muestra que el Dimetilsulfóxido no ocasiona ninguna reacción significativa sobre el estudio de la viabilidad con tratamiento a las células. Se obtuvo una densidad celular de  $2.4 \times 10^5$  células/ml de melanoma humano.

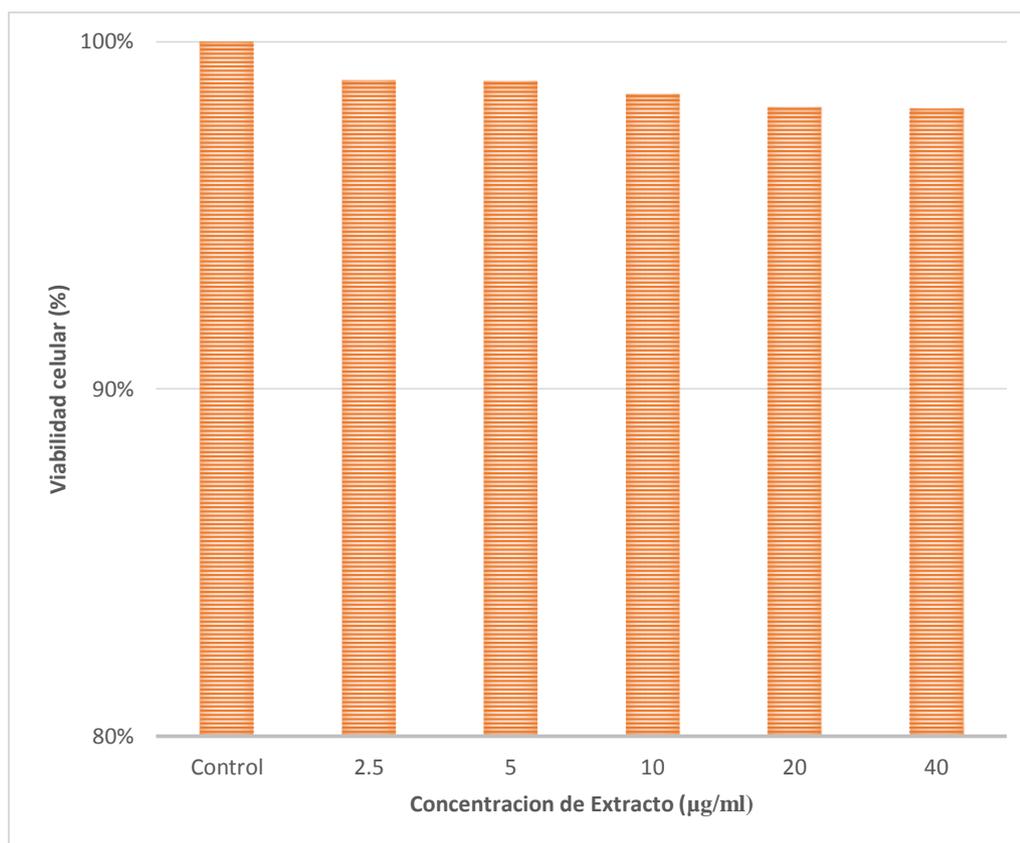
Al mismo tiempo se evaluó la viabilidad celular de macrófagos peritoneales de ratón (*Mus músculos*) para cada concentración y se realizó un análisis estadístico, basado en la media aritmética.

Tabla 8. Análisis de varianza de un factor (ANOVA) – macrófagos peritoneales

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Control	8	769.957	96.245	0.211
2.5	8	761.421	95.178	0.282
5	8	761.108	95.139	0.365
10	8	758.359	94.795	1.022
20	8	755.409	94.426	0.344
40	8	755.144	94.393	1.371

Obteniendo una probabilidad de 0.1058, lo que significa que no existe una significancia entre los tratamientos con las diferentes concentraciones del extracto de cedrón sobre los macrófagos peritoneales, además esto también se puede corroborar por el valor crítico F, ya que es mayor al resultado del factor de Fisher.

En la Gráfica 20 se muestra la viabilidad celular después del tratamiento con las concentraciones del extracto, lo cual muestra que no hubo variación significativa ya que se obtuvieron datos cercanos, esto nos quiere decir que el extracto no es citotóxico para este estudio (Hasta 40  $\mu\text{g/ml}$  de extracto metanólico).



Gráfica 20. Viabilidad celular de macrófagos peritoneales de ratón (*Mus mûsculos*) tratado con extracto metanólico de Cedrón (*Lippia Citriodora*)

Además también se realizó el estudio del control negativo y no se obtuvo una diferencia significativa con la viabilidad positiva, lo cual muestra que el Dimetilsulfóxido no ocasiona ninguna reacción significativa sobre el estudio de la viabilidad con tratamiento a las células. Se obtuvo una densidad celular de  $5.2 \times 10^5$  células/ml macrófagos peritoneales.

### 3.8 EVALUACIÓN DE LA DE LA CINÉTICA CON Y SIN EXTRACTO DE CEDRÓN (*Lippia citriodora*)

Tabla 9. Parámetros de trabajo óptimo.

Parámetro	Rango óptimo
Temperatura	De 25° a 37° C
pH	De 6.5 a 7.5



Gráfica 21. Medición de pH

A) pH inicial del sustrato, B) pH final de la reacción enzima - sustrato y C) pH final de la reacción enzima – inhibidor – sustrato

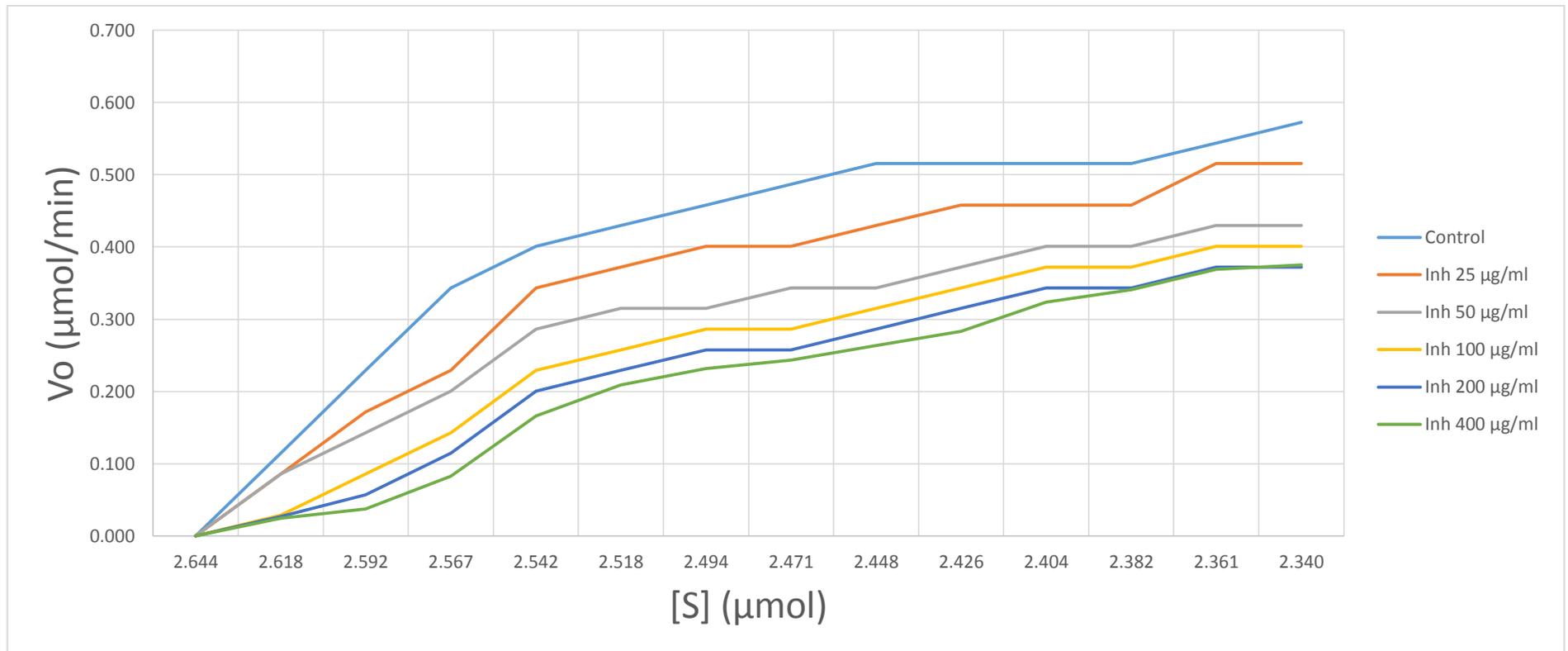
En la gráfica 21 se observa la medición del pH de la reacción enzimática, y comparando con los datos de la Tabla 7 donde tenemos el rango óptimo de trabajo del pH concuerda.

Se evaluó la enzima (Tirosinasa) frente al sustrato (L-Tirosina) por triplicado para obtener una cinética inicial que se utilizó como control sobre los ensayos con extracto a la temperatura y pH indicado en la Tabla 9, posterior a esto se evaluó las diferentes concentraciones del extracto metanólico de cedrón como inhibidor de la enzima (Tirosinasa) frente al sustrato (L-Tirosina) por triplicado bajo los parámetros de la Tabla 9 y se realizó un análisis estadístico.

Tabla 10. Análisis de varianza de dos factores (ANOVA)

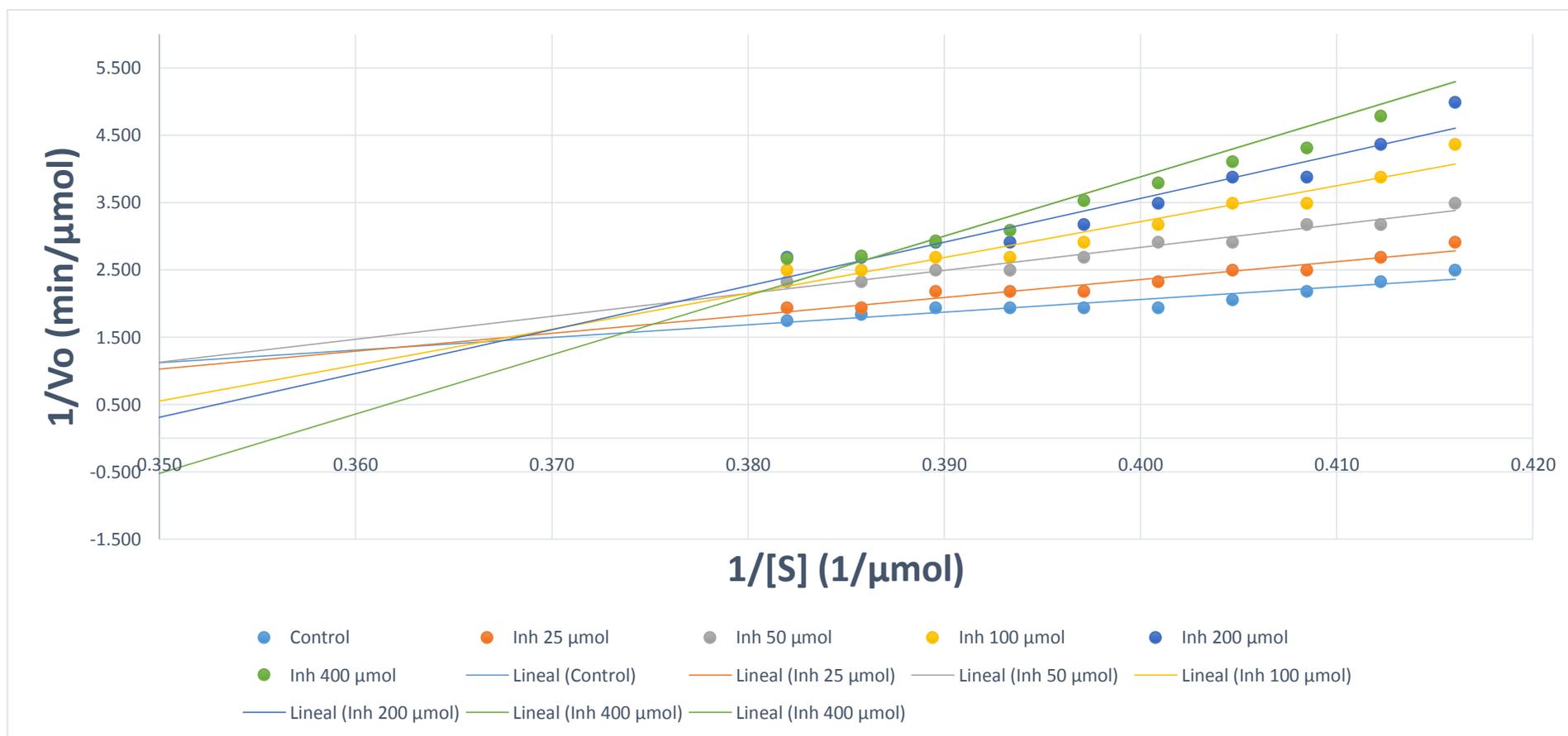
<i>RESUMEN</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Control	14	5.640	0.403	0.030
2.5	14	4.838	0.346	0.026
5	14	4.065	0.290	0.018
10	14	3.521	0.252	0.019
20	14	3.176	0.227	0.017
40	14	2.950	0.211	0.017
2.6440	6	0.000	0.000	0.000
2.6178	6	0.366	0.061	0.002
2.5922	6	0.724	0.120	0.005
2.5670	6	1.114	0.186	0.009
2.5423	6	1.626	0.271	0.008
2.5181	6	1.812	0.302	0.008
2.4943	6	1.950	0.325	0.008
2.4710	6	2.018	0.336	0.009
2.4481	6	2.153	0.359	0.009
2.4257	6	2.287	0.381	0.008
2.4036	6	2.413	0.402	0.005
2.3820	6	2.430	0.405	0.005
2.3607	6	2.631	0.439	0.005
2.3398	6	2.665	0.444	0.007

Obteniéndose una probabilidad de  $7.1998 \times 10^{-44}$ , lo que significa que si existe una significancia en el comportamiento de la enzima tirosinasa con las diferentes concentraciones del extracto de cedrón sobre el sustrato L-tirosina, además esto también se puede comparar por el valor crítico F, ya que es menor al resultado del factor de Fisher.



Gráfica 22. Comparación de la Velocidad de reacción (Vo Vs [S])

Utilizando L-Tirosina como Sustrato, Tirosinasa como Enzima y Extracto metanólico de cedrón (*Lippia citriodora*) a 40 μg/ml como Inhibidor



Gráfica 23. Comparación del mecanismo de acción de la enzima con Inhibidores y Control ( $1/V_o$  vs  $1/[S]$ )

Utilizando L-Tirosina como Sustrato, Tirosinasa como Enzima y Extracto metanólico de cedrón (*Lippia citriodora*) como Inhibidor.

Tabla 11. Resultados de KM y Vmax

Concentración de extracto metanólico de cedrón ( $\mu\text{g/ml}$ )						
	0	2.5	5	10	20	40
V Max	0.018	0.020	0.018	0.009	0.006	0.004
KM	2.371	2.347	2.339	2.392	2.414	2.431

En la gráfica 22 se puede observar la disminución de la actividad de la enzima en relación a la concentración del extracto y se ve que existe además disminución de la absorbancia con respecto a cada concentración, pero la formación de producto es directamente proporcional a la concentración de sustrato lo que lo convierte en una reacción de primer grado.

Además se puede observar que concuerda el incremento rápido de formación del complejo Enzima –Sustrato y que después de una fase inicial empieza a estabilizarse la curva, como se muestra en la teoría.

En la gráfica 23, se puede observar el mecanismo de acción de la enzima con el inhibidor (Extracto metanólico de cedrón) a diferentes concentraciones, representado por la gráfica de Lineweaver-Burk (Inversos de la  $V_o$ , gráfica de Michaelis Menten), en donde podemos observar el comportamiento del inhibidor con la enzima, además de parámetros básicos de la cinética de la enzima.

Y como resultado obtenemos que si existe una acción inhibitoria a cada concentración, pero no, se precisa el comportamiento exacto del inhibidor, ya que el extracto metanólico de cedrón es un complejo de principios activos, además obteniendo la  $K_m$  de cada reacción, podemos determinar que a una concentración de  $5 \mu\text{g/ml}$  existe una mayor afinidad de la enzima por el sustrato, el tipo de inhibición podría determinarse también por el comportamiento de la enzima, en este caso una enzima alostérica, que según Rye et-al no compite por el sitio activo con el inhibidor, pero de igual manera sería recomendable realizar muestras “blanco” de sustrato con el extracto para obtener resultados más precisos. (75)

## DISCUSIONES

En la búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento del Melanoma humano (Cáncer a la piel), los extractos de partes vegetales aparecen de forma prometedora, en este estudio se demuestra la acción inhibitoria del extracto metanólico de cedrón en la melanogénesis. Según Feng-Ling et-al muestra que el extracto de tiquil tiquil (*Lippia nodiflora*) posee esta actividad inhibitoria sobre la melanogénesis a una concentración de 10 µg/ml de extracto metanólico de tiquil tiquil, otros estudios como los que muestra Martínez et-al con el extracto de orégano (*Lippia graveolens*) también muestra efectos positivos sobre el cáncer. (1) (76)

Por otro lado del extracto metanólico de cedrón mediante el método de Soxhlet arrojó 2.5875g de extracto concentrado a partir de 20g de hojas de cedrón, lo cual muestra una extracción eficaz, esto se confirma con el estudio de Feng-Ling et-al, quienes obtuvieron 28,2g de extracto metanólico a partir de 20g de material biológico de *Lippia nodiflora*. (1)

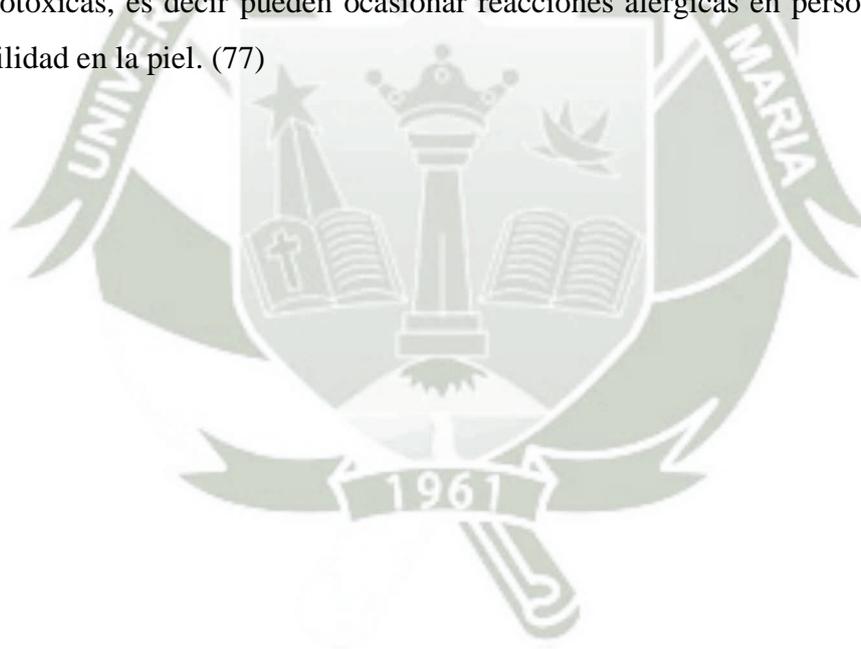
La seguridad es la principal consideración mientras se desarrolla nuevas alternativas de tratamientos, agentes terapéuticos o cosméticos utilizando ingredientes activos obtenidos de plantas. Por lo que para este estudio se evaluó la citotoxicidad del extracto sobre células sanas de macrófagos peritoneales de ratón sin ningún tratamiento previo, por lo general algunos extractos con Metanol podrían resultar citotóxicos para las células, pero para este estudio se demostró que no existe citotoxicidad hasta 40 µg/ml de extracto metanólico de Cedrón (*Lippia citriodora*), esto se confirma con el estudio de Feng-Ling et-al, quienes también mencionan que su estudio con extracto metanólico sobre una línea celular de melanoma no genera citotoxicidad. (1)

Las proteínas relacionadas a la tirosinasa (TRP) son enzimas limitantes de la velocidad en el proceso de melanogénesis que incrementan la conversión de la tirosina en dopaquinona. En este estudio se redujo la actividad de la enzima tirosinasa y por ende el contenido de melanina en células primarias cultivadas a partir de biopsia de melanoma humano, tratadas con extracto metanólico de Cedrón (*Lippia citriodora*), obteniendo un mejor resultado con 40µg/ml del extracto, según Feng-Ling et-al muestran que a una dosis de 10µg/ml de extracto metanólico de tiquil tiquil (*Lippia nodiflora*) redujo el contenido de melanina en células B16F10 (línea celular de melanoma humano) e inhibió la actividad

de la tirosinasa celular. Lo cual tiene una variación con respecto a nuestro estudio pero también es debido a que no se utiliza la misma materia prima (planta), pero se podría llegar a la conclusión de que el género *Lippia* podría ser un gran potencial en tratamientos sobre células cancerosas. (1)

En conclusión con los estudios realizados se logró observar que el extracto metanólico de Cedrón (*Lippia citriodora*) es un inhibidor de la melanogénesis in vitro con poca efectividad a comparación de otros estudios del genero *Lippia.*, como se menciona anteriormente, pero no descarta la posibilidad de ser utilizado como alternativa en tratamientos de melanoma humano o como inhibidor de la tirosinasa en la melanogénesis con fines estéticos.

Finalmente se debe tener un cuidado como en cualquier otro consumo de plantas, ya que todo consumo en exceso es dañino, aunque aún no se han descrito efectos citotóxicos por un consumo adecuado de cedrón, es mejor prevenir, además que dentro de la composición del cedrón se encuentran unas sustancias llamadas furanocumarinas, las cuales resultan ser fototóxicas, es decir pueden ocasionar reacciones alérgicas en personas con mayor sensibilidad en la piel. (77)



## CONCLUSIONES

1. Se logró obtener un extracto metanólico de cedrón (*Lippia citriodora*) con el método continuo Soxhlet, con un rendimiento de 12.9% con respecto al material seco y en base a esto se obtuvo diferentes concentraciones (2.5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml).
2. Se logró cultivar y acondicionar células primarias de melanoma humano hasta observar que alcancen confluencias y diferenciación, el cual permitió el estudio de inhibición de melanogénesis in vitro.
3. Se evaluó la viabilidad celular del cultivo de células primarias de melanoma humano, obteniéndose una densidad celular de  $2.4 \times 10^5$  de células/ml de melanoma humano
4. Se evaluó la viabilidad celular del cultivo de células primarias de melanoma humano tratados con los diferentes extractos obteniéndose una densidad celular de  $1.55 \times 10^5$  de células/ml de melanoma humano para el mejor tratamiento que se obtuvo (40 µg/ml), existiendo un 35% de disminución en relación a la densidad celular de células primarias de melanoma sin tratamiento.
5. Se logró cultivar y acondicionar células de macrófagos peritoneales de ratón hasta observar que alcancen confluencias y diferenciación, obteniéndose una densidad celular de  $5.2 \times 10^5$  células/ml de macrófagos peritoneales, el cual permitió el estudio de citotoxicidad de las diferentes concentraciones del extracto.
6. Se evaluó el efecto citotóxico del extracto Metanólico de cedrón sobre las células de macrófagos peritoneales, el cual no mostro significancia alguna.

7. El establecimiento de la cinética de la enzima – sustrato, nos ayuda entender mejor el mecanismo que existe en una fase in vivo (melanosoma) y como actúa el extracto en la reacción.
8. La determinación de inhibición de melanogénesis in vitro con el extracto se realizó en dos rutas (con cultivo celular y con inhibición de la enzima) para una ratificación de la efectividad del extracto mostrando que a mayor concentración se obtiene una mejor reacción, para este estudio fue mejor a una concentración de 40  $\mu\text{g/ml}$  de extracto metanólico de Cedrón (*Lippia citriodora*)



## RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar posteriores investigaciones, identificando que principio activo tendría esta actividad inhibitoria sobre la melanogénesis
2. Se sugiere investigar sobre nuevas aplicaciones o efectos que el cedrón (*Lippia citriodora*) pueda ocasionar sobre la enzima tirosinasa, ya que no solo se encuentra en la melanogénesis sino que también está en la formación de materia gris en el cerebro.
3. Realizar más estudios in vitro con una mayor concentración antes de realizar pruebas in vivo, a su vez ver que esta concentraciones mayores no tengan un efecto citotóxico u otros problemas adversos.
4. Realizar muestras “Blanco” (Sustrato más Extracto) en el ensayo de cinética enzimática, para obtener datos un poco más precisos.
5. Se recomienda evaluar los genes implicados que mutan en relación a la melanogénesis, como los genes CDKN2A, CDK4, BRAF, MC1R y MITF con métodos como el Western Blot, entre otros. En relación a este último punto se podría evaluar si todos los pacientes que padecen esta patología (Melanoma humano) en la región tienen mutaciones genéticas u el origen de su patología es otra, lo cual ayudaría a realizar estudios más específicos para obtener tratamientos más personalizados.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Feng-Lin Y, Moo-Chin W, Chan-Jung L, Horng-Huey K, Chiang-Wen L. Melanogenesis Inhibitor(s) from Phyla nodiflora Extract. Evid Based Complement Alternat Med. 2012 Noviembre; 2012(867494).
2. Paredes Ruiz f, Serrano Maldonado MJ, Ponce Alquicira E, Soriano Santos J. Contenido de polifenoles y actividad inhibitoria de tirosinasa de extractos de muérdago (Cladocolea Ioniceroides). Avances de las mujeres en las ciencias, las humanidades y todas las disciplinas. 2015; II(7).
3. El melasma y el cáncer de piel o melanoma. [Online]. [cited 2017 Septiembre 12]. Available from: <http://todosobrecancer.com/el-melasma-y-el-cancer-de-piel-o-melanoma>.
4. Zurbano B, Gojanovich A, Thomas A, Dántola L. Alteraciones estructurales y funcionales de Tirosinasa fotoinducidas por pterina. Procesos Foinducidos en proteínas. 2013 Octubre; I(3).
5. Zuñiga. Melanoma. [Online].; 2012 [cited 2017 Octubre 20. Available from: <https://es.slideshare.net/juan1212/04-melanoma>.
6. Melanoma (Homo Sapiens). [Online]. [cited 2017 Septiembre 9. Available from: [http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?org\\_name=hsa&mapno=05218&mapscale=&show\\_description=hide](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?org_name=hsa&mapno=05218&mapscale=&show_description=hide).
7. Prota G. Melanins and Melanogenesis Nueva York: Academic; 1992.

8. Nuevos inhibidores de la melanogénesis: ¿Adiós a las manchas? [Online].; 2013 [cited 2017 Septiembre 12. Available from: <http://dermocosmetica.net/index.php/notas-de-prensa/50-nuevos-inhibidores-de-la-melanogenesis-adios-a-las-manchas>.
9. Vargas Corrales V. Elaboración de té aromático a base de plantas cedrón (aloysiacitrodora) y toronjil (mellisaofficinalis) procesado con stevia (steviarebaudiana bertonii) endulzante natural, utilizando el método de deshidratación. Tesis de Grado. Latacunga: Universidad Técnica de Cotopaxi, Ingeniería Agroindustrial; 2012.
10. Gerhard Thews , Ernst Mutschler. Piel. In Anatomía, fisiología y pato-fisiología del hombre. Barcelona: Editorial reverté, s.a.; 1983. p. 730-740.
11. Dreamstime. [Online]. [cited 2017 Septiembre 4. Available from: <https://fr.dreamstime.com/image-libre-droits-couches-de-peau-humaine-melanocyte-et-m%C3%A9lanine-image37423406>.
12. Epidermis. [Online].; 2017 [cited 2017 Septiembre 4. Available from: <https://es.wikipedia.org/wiki/Epidermis>.
13. Gomez Saldaña AJ. Anatomía y Fisiología de la Piel. [Online]. [cited 2017 Septiembre 4. Available from: <https://es.slideshare.net/Joseallbert/anatomia-y-fisiologia-de-la-piel-28251567>.
14. Martinez J. Melanogenesis: fabricación de melanina y pigmentación cutánea. [Online].; 2012 [cited 2017 Septiembre 4. Available from: <http://elmodernoprometeo.blogspot.pe/2012/01/melanogenesis-fabricacion-de-melanina-y.html>.
15. Zequn J, Shasha L, Yunyi , Pengyi D, Jianguo H, Guangyuan H. Sesamin induces melanogenesis by microphthalmia-associated transcription factor and tyrosinase up-regulation via cAMP signaling pathway. Acta Biochimica et Biophysica Sinica. 2011 Octubre; 43(10).

16. Hernández López de Rodas EdC. Melanoma cutáneo en Guatemala: estudio morfológico inmunohistoquímico y detección de la mutación del gen BRAF. Tesis Doctoral. Madrid: UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, Anatomía Patológica; 2013.
17. La melanogénesis. [Online]. [cited 2017 Septiembre 4. Available from: <http://www.rapidbronz.com/es/introduzione/la-melanogenesi.html>.
18. Slominski A, Desmond T, Shibahara S, Worstman J. Melanin Pigmentation in Mammalian Skin and Its Hormonal Regulation. *Physiological Reviews*. 2004 Octubre; 84(4).
19. ES. E. Azul. [Online].; 2013 [cited 2017 Septiembre 5. Available from: <https://vidauniversoydemas.wordpress.com/2013/12/24/azul/>.
20. Biosíntesis de melanina. [Online]. [cited 2017 Octubre 21. Available from: <http://www.dfarmacia.com/ficheros/images/4/4v26n02/grande/4v26n02-13099411fig02.jpg>.
21. Melanina. [Online].; 2015 [cited 2017 Septiembre 5. Available from: <https://es.wikipedia.org/wiki/Melanina>.
22. Sanchez M. Café de Ciencia. [Online].; 2014 [cited 2017 Septiembre 5. Available from: <https://cafedeciencia.wordpress.com/2014/07/13/morenos-y-pelirrojos/>.
23. Áviles J, Lázaro P. Predisposición genética en el melanoma cutáneo. *Actas Dermosifiliogr*. 2006 Mayo; 97(4).
24. Nordlund J, Boissy R, Hearing V, King R, Ortonne J. *The Pigmentary System. In Physiology and Pathophysiology*. Nueva York; 1998.
25. Celulas de la Epidermis. [Online]. [cited 2017 Septiembre 5. Available from: <https://clasestetica.wordpress.com/2015/03/03/las-celulas-de-la-epidermis/>.

26. ¿Qué son los melanocitos? [Online].; 2017 [cited 2017 Septiembre 5. Available from: <https://curiosoando.com/que-son-los-melanocitos>.
27. Tirosinasa. [Online]. [cited 2017 Septiembre 7. Available from: <http://www.uaz.edu.mx/histo/Biologia/Wiki/Tirosinasa.pdf>.
28. Wilkinson JB, Moore RJ. Bioquímica de la melanogénesis. In Wilkinson JB, Moore RJ. Cosmetología de Harry. Madrid: Ediciones Diaz de Santos S.A.
29. Cinética enzimática. [Online]. [cited 2017 Noviembre 13. Available from: <http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/quimicabiologica1/wp-content/uploads/2016/02/11-2016-Teor%C3%ADa-Unidad-9-Cin%C3%A9tica-enzim%C3%A1tica.pdf>.
30. Cjuno J, Arroyo J. INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA tirosinasa con EDTA, QUITOSANO Y PAPAÍNA. Rev. Per. Quím. Ing. Quím.. 2009; 12(2).
31. Rojano BA. INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA POLIFENOL OXIDASA EXTRAÍDA DEL BANANO (Cavendish valery) MEDIANTE SISTEMAS BIFÁSICOS ACUOSOS CON ISOESPINTANOL Y ÁCIDO ASCÓRBICO. Tesis magisterial. Medellín: UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA, SEDE MEDELLÍN, Ciencias Agropecuarias; 2009.
32. Tirosina. [Online]. [cited 2017 Septiembre 8. Available from: <https://es.wikipedia.org/wiki/Tirosina>.
33. IVAMI. Melanoma cutáneo maligno - Genes CDKN2A, CDK4, MC1R. BRAF y TRRAP. [Online]. [cited 2017 Septiembre 8. Available from: <http://www.ivami.com/es/pruebas-geneticas-mutaciones-de-genes-humanos-enfermedades-neoplasias-y-farmacogenetica/1661-melanoma-cutaneo-maligno-genes-i-cdkn2a-i-y-i-cdk4>.
34. GPS TLDSF. Melanoma: acral-lentiginous melanoma (including subungual melanoma). [Online]. Available from: <http://www.pcds.org.uk/clinical->

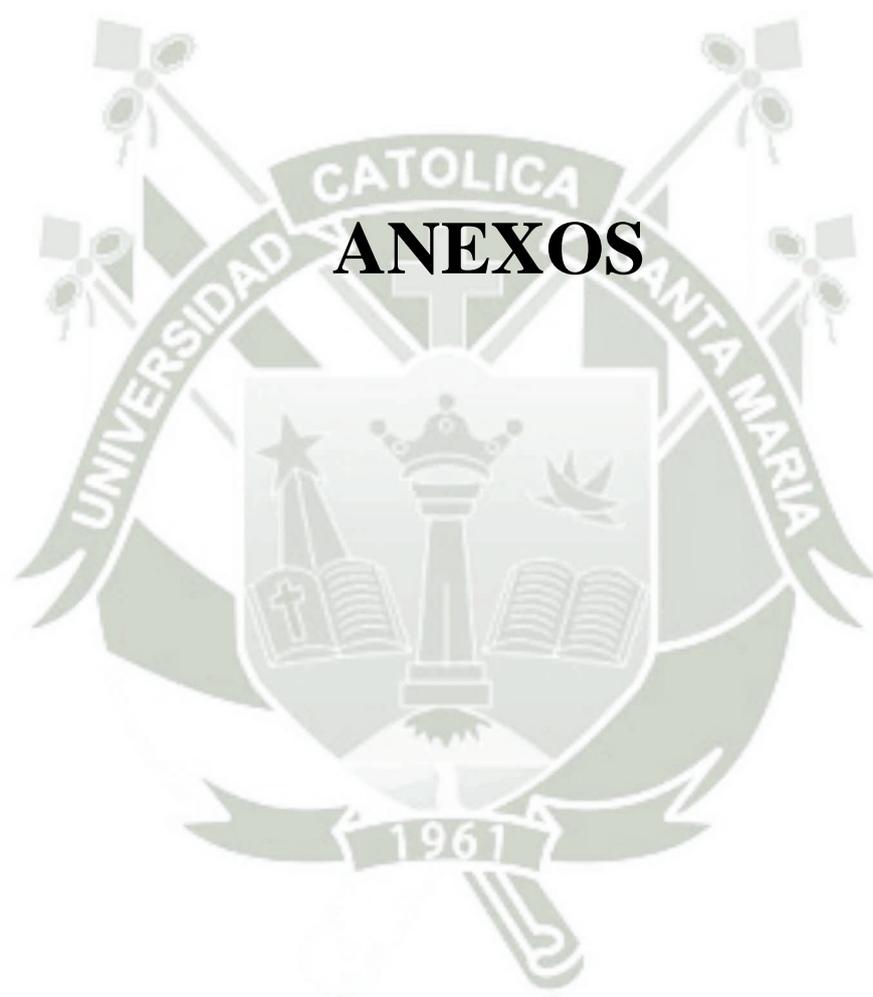
- [guidance/acral-lentiginous-melanoma-including-subungual-melanoma?\\_escaped\\_fragment\\_=\\_pp%255Bg1%255D/10/.](#)
35. American Cancer Society. ¿Qué es el cáncer de piel tipo melanoma? [Online]. [cited 2017 Septiembre 8. Available from: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-piel-tipo-melanoma/acerca/que-es-melanoma.html>.
  36. Martínez Gonzales. Melanoma maligno cutáneo. Estudio de características morfológicas e inmunohistoquímicas del tumor primario predictivas de metástasis en ganglio centinela. Tesis doctoral. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona, Ciencias Morfológicas; 2007.
  37. Plata Paniagua S. Melanoma cutáneo maligno: Actualización y avances en terapéutica de la enfermedad metastásica. [Online].; 2013 [cited 2017 Septiembre 9. Available from: <https://es.slideshare.net/farmaser/melanoma-cutneo-maligno-actualizacion-y-avances-en-terapeutica-de-la-enfermedad-metastastica>.
  38. Casariego Z, Baudo J. Trabajo de revisión: melanoma. Scientific Electronic Library Online (SCIELO). 2004; 16(3).
  39. Clínica Hoffner. Cáncer de Piel. [Online].; 2016 [cited 2017 Septiembre 8. Available from: <http://www.clinicahoffner.com/2016/12/27/cancer-de-piel/>.
  40. Gabrielloni S. Las radiaciones solares y sus efectos sobre la piel. [Online]. [cited 2017 Septiembre 8. Available from: <http://www.cosmetologas.com/noticias/val/912/las-radiaciones-solares-y-sus-efectos-sobre-la-piel.html>.
  41. Chiquete E. Inmunología del melanoma. [Online].; 2011 [cited 2017 Octubre 20. Available from: <https://es.slideshare.net/erwinchiquete/erwin-inmunologa-del-melanoma>.
  42. Rosales Ledezna C. Inmunidad y Cáncer. [Online].; 2012 [cited 2017 Octubre 20. Available from: <https://es.slideshare.net/brisaaco/cancer-6985981>.

43. Melanoma familiar. [Online]. [cited 2017 Noviembre 13. Available from: <https://www.uv.es/derma/CLindex/CLmelanoma/CLmmfam.htm>.
44. Ilieva K, Et-al. Effects of BRAF Mutations and BRAF Inhibition on Immune Responses to Melanoma. AACR Journals. 2014 Octubre; 13(12).
45. Rangel N, Rondon M, Ramirez S. Evaluación de la expresión del factor de transcripción asociado con microftalmia (MITF) en sangre periférica de individuos con y sin melanoma maligno y en líneas celulares. Colombia Medica. 2009 Marzo; 40(1).
46. Intra Med. Descubierta una mutación genética asociada a una mayor gravedad del melanoma maligno. [Online].; 2005 [cited 2017 Septiembre 8. Available from: <http://www.intramed.net/contenido.asp?contenidoID=35938>.
47. Cedron: un aromática que vale la pena tener. [Online].; 2012 [cited 2017 Septiembre 9. Available from: <http://www.eneljardin.com/2012/01/cedron-un-aromatica-que-vale-la-pena.html>.
48. Aloysia citriodora. [Online].; 2017 [cited 2017 Septiembre 9. Available from: [https://es.wikipedia.org/wiki/Aloysia\\_citriodora](https://es.wikipedia.org/wiki/Aloysia_citriodora).
49. Mar P.. Lippia citriodora. [Online].; 2010 [cited 2017 Septiembre 9. Available from: <http://missaromatica.blogspot.pe/2010/01/hierba-luisa-lippia-citriodora.html>.
50. Vivero Chaclacayo. cedrón, hierba luisa (lippia citriodora). [Online]. [cited 2017 Septiembre 9. Available from: <http://www.viverochaclacayo.com.pe/cedron-hierba-luisa-lippia-citriodora-348-general.html>.
51. Cedron, Maria Luisa. [Online]. [cited 2017 Septiembre 9. Available from: <http://www.hierbitas.com/nombrecomun/Cedron.htm>.
52. Olguin S. Composicion del Cedrón. [Online]. [cited 2017 Septiembre 9. Available from: <http://www.plantasparacurar.com/composicion-del-cedron/>.

53. INTRODUCCIÓN AL CULTIVO CELULAR. [Online]. [cited 2017 Septiembre 11. Available from: [http://www.ehu.eus/biofisica/pdf/cultivo\\_celular.pdf](http://www.ehu.eus/biofisica/pdf/cultivo_celular.pdf).
54. Prats G. Microbiología clínica Buenos Aires: Panamericana; 2005.
55. Arredondo Vega BO, Voltolina D. CONCENTRACIÓN, RECUENTO CELULAR Y TASA DE CRECIMIENTO. [Online]. [cited 2017 Septiembre 11. Available from:  
[https://www.researchgate.net/profile/Domenico\\_Voltolina/publication/253237563\\_CONCENTRACION\\_RECUENTO\\_CELULAR\\_Y\\_TASA\\_DE\\_CRECIMIENTO/O/links/00b4953c92711ed8fb000000/CONCENTRACION-RECUENTO-CELULAR-Y-TASA-DE-CRECIMIENTO.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Domenico_Voltolina/publication/253237563_CONCENTRACION_RECUENTO_CELULAR_Y_TASA_DE_CRECIMIENTO/O/links/00b4953c92711ed8fb000000/CONCENTRACION-RECUENTO-CELULAR-Y-TASA-DE-CRECIMIENTO.pdf).
56. Cámara de Neubauer. [Online].; 2009 [cited 2017 Septiembre 11. Available from: <http://amarolopez.blogspot.pe/2009/03/camara-neubauer.html>.
57. Conteo celular y evaluación de viabilidad. Laboratorio de Genómica Viral y Humana. Standard Operating Procedures (SOPs), Medicina UASLP; 2013.
58. Técnicas avanzadas en química. [Online].; 2004 [cited 2017 Septiembre 11. Available from: [https://www.upo.es/depa/webdex/quimfis/docencia/TAQ/curso0405/TAQP5\\_0405.pdf](https://www.upo.es/depa/webdex/quimfis/docencia/TAQ/curso0405/TAQP5_0405.pdf).
59. Nuñez C. Extracciones con Equipo Soxhlet. [Online].; 2008 [cited 2017 Septiembre 11. Available from: <http://www.cenunez.com.ar/archivos/39-extraccinconequiposoxhlet.pdf>.
60. Biomoléculas - Enzimas. [Online]. [cited 2017 Septiembre 11. Available from: <http://www.ehu.eus/biomoleculas/enzimas/tema11.htm>.
61. Porto A. Enzimas. [Online]. [cited 2017 Septiembre 11. Available from: <http://www.bionova.org.es/biocast/tema14.htm>.

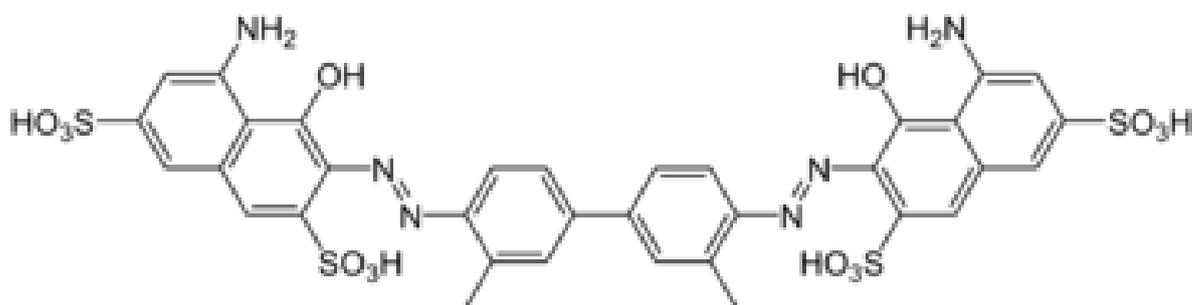
62. 9. Enzimas. [Online]. [cited 2017 12 14. Available from: <http://www.bioquimica.dogsleep.net/Laboratorio/Plummer/Chp09.pdf>.
63. Cinetica enzimatica. [Online]. [cited 2017 Septiembre 11. Available from: [https://es.wikipedia.org/wiki/Cin%C3%A9tica\\_enzim%C3%A1tica](https://es.wikipedia.org/wiki/Cin%C3%A9tica_enzim%C3%A1tica).
64. Medina J. Enzimas. [Online].; 2008 [cited 2017 Septiembre 12. Available from: <https://es.slideshare.net/fmedin1/enzimas-presentation-733557>.
65. guia L. Cinética enzimática. [Online].; 2010 [cited 2017 Noviembre 13. Available from: <https://quimica.laguia2000.com/conceptos-basicos/cinetica-enzimatica>.
66. Espectrometría. [Online]. [cited 2017 12 15. Available from: <https://www.espectrometria.com/>.
67. Marín S. Espectrofotometría. [Online]. [cited 2017 12 15. Available from: <http://slideplayer.es/slide/8988093/>.
68. Johnson M. Cuantificación de proteínas. [Online].; 2012 [cited 2017 12 28. Available from: <http://www.labome.es/method/Protein-Quantitation.html>.
69. Puerto Md. Determinacion de Proteínas. [Online].; 2013 [cited 2017 12 28. Available from: <http://www.fagro.edu.uy/~nutrical/ensenanza/AVI%20WEB/cursoema/detdePC.pdf>.
70. Determinacion de proteínas. [Online]. [cited 2017 12 28.
71. Rojas J, Palacios O, Ronceros S. Efecto del aceite esencial de *Aloysia triphylla* britton (cedrón) sobre el *Trypanosoma cruzi* en ratones. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*. 2012 Marzo; 29(1).
72. Drago Serrano ME, Flores Romo L, Oliver aguillon G, Jarillo Luna RA, Reina Garfinas H, Barbosa Cabrera E, et al. La lactoferrina como modulador de la respuesta inmunitaria. *Medigraphic Artmisa*. 2008 Junio; 33(2).

73. Macrófagos y Recuento de Globulos Blancos. [Online]. [cited 2017 Septiembre 14. Available from: [http://www.academia.edu/25136392/MACR%C3%93FAGOS\\_Y\\_RECUESTO\\_DE\\_GL%C3%93BULOS\\_BLANCOS](http://www.academia.edu/25136392/MACR%C3%93FAGOS_Y_RECUESTO_DE_GL%C3%93BULOS_BLANCOS) .
74. Martínez A, Reyes I, Reyes N. Citotoxicidad del glifosato en células mononucleares de sangre periférica humana. *Biomedica*. 2007 Diciembre; 27(4).
75. Rye CEa. Metabolismo. In Rye CEa. *Biology*. Houston: OpenStax; 2017. p. 180-186.
76. Martínez A, Puga R, Hernández L, Loarca G, Mendoza S. Antioxidant and Antimutagenic Activities of Mexican Oregano (*Lippia graveolens* Kunth). *Plant Foods for Human Nutrition*. ; 63(1).
77. Toxicidad del cedron. [Online]. [cited 2017 Octubre 23. Available from: <http://www.plantasparacurar.com/toxicidad-del-cedron/>.
78. X.Lai , M.Soler-Lopez , H.J.Wichers , B.W.Dijkstra. Jpred 4 Structure Prediction Server. [Online].; 2016 [cited 2017 Septiembre 8. Available from: <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/pdbsum/GetPage.pl?pdbcode=5m8p>.
79. Direct Industry. [Online]. [cited 2017 Septiembre 20. Available from: <http://www.directindustry.com/prod/eppendorf/product-22548-1606915.html>.
80. Cabanas J, Garcías F, Garcia C. F, Lozano J. Discusion y mejora del metodo espectrofotométrico de medidas de la oxidación de L-tirosina por tirosinasa. *Revista UM*. 2012.
81. Sanchez S. [Online].; 2013 [cited 2017 12 18. Available from: [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/MATERIALAPOYOANTECEDENTES\\_22427.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/MATERIALAPOYOANTECEDENTES_22427.pdf).

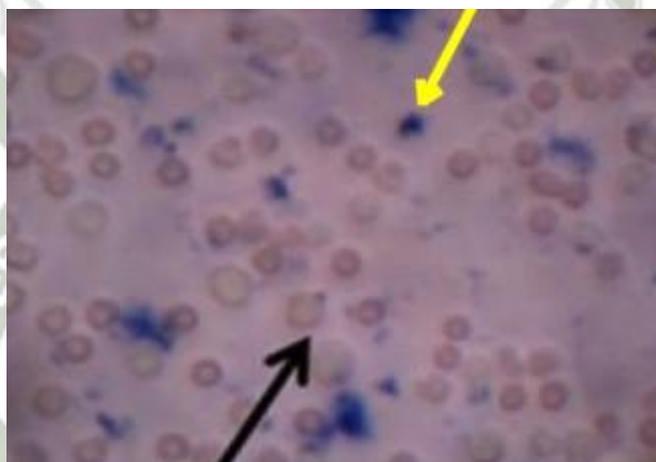


## ANEXO 1

### AZUL DE TRIPANO



#### FUNDAMENTO:



Preparación de células teñidas con azul tripano. Las células que no captan el colorante (flecha negra) son las que tienen intacta su membrana (*vivas*); las que se tiñen de azul (flecha amarilla) son las que tienen la membrana dañada (*muertas*).

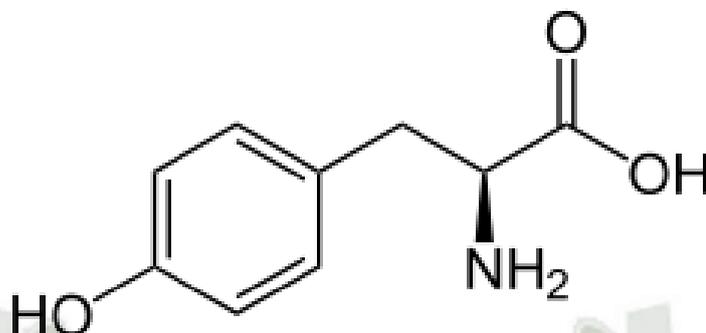
Se mezcla un volumen de suspensión celular con uno igual de disolución de azul, se aplica la mezcla al hemocitómetro y se examina al microscopio.

#### INSTRUCCIONES:

Suspender 0.04 g en 10 ml de Buffer Fosfato Salino (PBS) para obtener Azul de tripano al 0.4%

## ANEXO 2

### L-Tirosina



La tirosina es uno de los 20 aminoácidos que forman las proteínas. Se clasifica como un aminoácido no esencial en los mamíferos ya que su síntesis se produce a partir de la hidroxilación de otro aminoácido: la fenilalanina.

Peso molecular: 181.19 g/mol

#### **INSTRUCCIONES:**

Diluir 0.479 g/L en Buffer Fosfato Salino (PBS).

**SIGMA-ALDRICH**

[sigma-aldrich.com](http://sigma-aldrich.com)

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)

Email USA: [techserv@sial.com](mailto:techserv@sial.com)

Outside USA: [eurtechserv@sial.com](mailto:eurtechserv@sial.com)

## Product Specification

**Product Name:**

L-Tyrosine - reagent grade, ≥98% (HPLC)

**Product Number:**

T3754

**CAS Number:**

60-18-4

**MDL:**

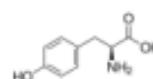
MFCD00002606

**Formula:**

C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>

**Formula Weight:**

181.19 g/mol



**TEST**

**Specification**

Appearance (Color)

White to Off-White

Appearance (Form)

Powder

Infrared spectrum

Conforms to Structure

Optical Rotation

-11.2 - -9.8 deg

c = 5%; 1M HCl @ 25 deg Celsius

Carbon

58.5 - 60.8 %

Nitrogen

7.4 - 8.0 %

Purity (HPLC)

> 98 %

Solubility (Turbidity)

Clear

c = 50mg/ml; 1M HCl

Solubility (Color)

Colorless to Light Yellow

Recommended Retest Period

6 Years

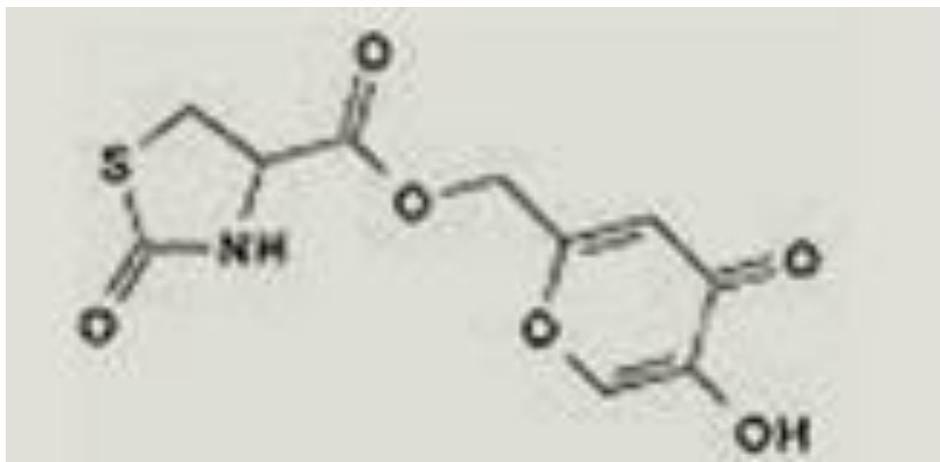
Specification: PRD.2.ZQ5.10000029801

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at [Sigma-Aldrich.com](http://Sigma-Aldrich.com). For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

1 of 1

## ANEXO 3

### Tirosinasa



La tirosinasa (monofenol monooxigenasa) (EC 1.10.3.1 número CAS: 9002-10-2) es una enzima que cataliza la oxidación de fenoles (como la tirosina) y está extendida en plantas y animales. La tirosinasa es una enzima cuprífera presente en tejidos de plantas y animales que cataliza la producción de melanina y otros pigmentos de la tirosina por oxidación, como el ennegrecimiento de una patata pelada o cortada expuesta al aire.

Versión Comercial: Tyrosinase from mushroom 1000 U

#### **INSTRUCCIONES:**

Diluir todo (aproximadamente 1 mg) en 50 ml en Buffer Fosfato Salino (PBS). Para obtener una concentración de 20U/ml

**SIGMA-ALDRICH®**

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA  
Tel: (800) 521-8956 (314) 771-5765 Fax: (800) 325-5052 (314) 771-5757  
email: techservice@sal.com sigma-aldrich.com

## Product Information

### Tyrosinase from mushroom

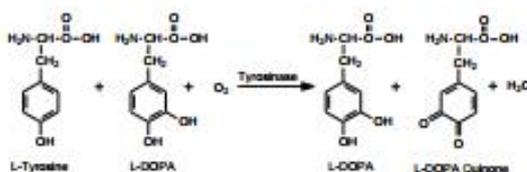
Catalog Number **T3824**  
Storage Temperature  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

CAS RN 9002-10-2  
EC 1.14.18.1  
Synonyms: Monophenol monooxygenase;  
Polyphenol oxidase; Catechol oxidase; Monophenol,  
dihydroxyphenylalanine:oxygen oxidoreductase

#### Product Description

Tyrosinase is a copper-containing oxidase which has activity on both catechols and cresol. It is responsible for browning reactions. Tyrosinase is reported to have two binding sites for aromatic substrates and a different binding site for oxygen, the copper-containing site.<sup>1</sup>

#### Overall Reaction:



$K_M$  for L-Tyrosine:<sup>2</sup> 0.5 mM  
 $K_M$  for L-DOPA:<sup>2</sup> 1.5 mM

Catechol acts as a suicide substrate for tyrosinase, causing irreversible inactivation during catechol oxidation.<sup>3</sup> Tyrosinase is also inhibited by compounds that complex with copper, such as benzoic acid and cyanide. Benzoic acid inhibition is competitive with catechol. Cyanide inhibition is competitive with oxygen and noncompetitive with catechol.<sup>1</sup>

Molecular mass:<sup>4</sup> 119.5 kDa (electrophoresis)

Isoelectric point (pI):<sup>5</sup> 4.7–5

pH optimum: 6–7

This product is isolated from the mushroom species *Agaricus bisporus*.<sup>6</sup> The product was dialyzed against deionized water prior to lyophilization. This enzyme is also assayed for polyphenol oxidase and catechol oxidase activities.

Activity:  $\geq 1,000$  units/mg solid

Unit Definition: One unit will cause an increase in  $A_{290}$  of 0.001 per minute at pH 6.5 at  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , in a 3 ml reaction mix containing L-tyrosine.

#### Precautions and Disclaimer

This product is for R&D use only, not for drug, household, or other uses. Please consult the Safety Data Sheet for information regarding hazards and safe handling practices.

#### Preparation Instructions

Tyrosinase is soluble (2 mg/ml) in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 6.5, yielding a clear brown solution.

#### Storage/Stability

When stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , the product loses <5% activity per year. If stored at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 40–60% activity is lost in 7 days.<sup>7</sup>

Solutions retain activity for several days at  $4\text{--}8\text{ }^{\circ}\text{C}$  and for several weeks frozen at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .<sup>8</sup>

The enzyme is rapidly denatured in 1% SDS solution.<sup>4</sup> It dissociates into subunits in saturated urea and is completely inactivated. While the dissociation is reversible, the inactivation is not.<sup>6</sup>

**SIGMA-ALDRICH**

[sigma-aldrich.com](http://sigma-aldrich.com)

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)

Email USA: [techserv@sial.com](mailto:techserv@sial.com)

Outside USA: [eurtechserv@sial.com](mailto:eurtechserv@sial.com)

## Product Specification

**Product Name:**

Tyrosinase from mushroom – lyophilized powder,  $\geq 1000$  unit/mg solid

**Product Number:**

**T3824**

**CAS Number:**

9002-10-2

**MDL:**

MFCD00082118

**Storage Temperature:**

-20 °C

**TEST**

**Specification**

units/mg solid

$\geq 1000$

Tyrosinase Activity

Unit Definition: One unit will cause an increase in A280 of 0.001 per minute at pH 6.5 at 25 deg C in a 3 mL reaction mix containing L-tyrosine

units/mg solid

$\geq 30000$

Polyphenol Oxidase Activity

Unit Definition: One unit will cause a decrease in A265 of 0.001 per minute at pH 6.5 at 25 deg C. In a 3 mL reaction mixture containing L-Beta-3,4-dihydroxyphenyl-alanine (L-DOPA)

units/mg solid

$\geq 200000$

Catechol Oxidase Activity

Unit Definition: One unit will cause a decrease in A265 of 0.001 per minute at pH 6.5 at 25 deg C in a 3 mL reaction mixture containing catechol and ascorbic acid

Recommended Retest Period

3 Years

Specification Date : 04/08/2011

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at [Sigma-Aldrich.com](http://Sigma-Aldrich.com). For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

1 of 1

## ANEXO 4



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA**  
**HERBARIUM AREQVIPENSE (HUSA)**



### CONSTANCIA Nro. 31 -2017-HUSA

El Director del *Herbarium Arequipense* (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

HACE CONSTAR:

Que la muestra proporcionada por la egresada Cruz Mamani Xiomara Elizabeth de la Universidad Católica de Santa María, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímica y Biotecnológica Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica, para la investigación: "Determinación de la acción in vitro del extracto metanólico de cedrón (*Lippia citrodora*) sobre células de melanoma inhibiendo la melanogénesis y sobre la actividad in vitro de la enzima tirosinasa sobre el sustrato L-tirosina". Los resultados de dicha identificación y tipificación corresponde a:

DIVISION: Magnoliophyta  
CLASE: Magnoliopsida  
SUBCLASE: Asteridae  
ORDEN: Lamiales  
FAMILIA: Verbenaceae  
GENERO: *Aloysia*  
ESPECIE: *Aloysia citrodora* Palau

Se expide la presente constancia a solicitud de las interesadas para los fines que se estime conveniente.

Arequipa 06 de Diciembre del 2017

  
Blgo. Leoncio Marín Herrera  
DIRECTOR  
*Herbarium Arequipense* (HUSA)

Avenida Daniel Alcides Carrión s/n cercado  
Teléfono: (054) 237755 / 993659045  
Apartado Postal: 0028  
AREQUIPA – PERÚ

## ANEXO 5

### DMEM

El DMEM tiene casi el doble de concentración de aminoácidos y cuatro veces la cantidad de vitaminas que el EMEM, así como nitrato férrico, piruvato de sodio y algunos aminoácidos suplementarios. La formulación original contenía 1,000 mg/L de glucosa y en un principio fue reportado para cultivar células embrionales de ratón. Una variación extra de 4500 mg/L de glucosa ha sido probada óptima para el cultivo de una variedad de células. El DMEM es un medio basal y no contiene proteínas o agentes que promocionen el crecimiento. Comúnmente es suplementado con 5 a 10 % de suero fetal bovino. El DMEM utiliza un sistema búfer de bicarbonato de sodio (3.7 g/L) y por lo tanto requiere de niveles artificiales de CO<sub>2</sub> para mantener el pH requerido. Los medios en polvo son formulados sin bicarbonato de sodio porque este tiende a eliminarse por gasificación en el estado gaseoso. Los medios en polvo requieren de la adición de 3.7 g/L de bicarbonato de sodio al momento de disolverlos en agua. El DMEM fue utilizado en un principio para el cultivo de células madre de embrión de ratón. Se lo ha encontrado ampliamente aplicable en estudios de células primarias de ratón y de pollo, de formación de placa viral y de inhibición por contacto.

## Specification Sheet

**SIGMA-ALDRICH**

<b>Product Name</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium - low glucose, With 1000 mg/L glucose, and sodium bicarbonate, without L- glutamine and phenol red, liquid, sterile-filtered, suitable for cell culture
<b>Product Number</b>	D5921
<b>Product Brand</b>	SIGMA
<b>TEST</b>	<b>SPECIFICATION</b>
<b>Appearance (Turbidity)</b>	Clear
<b>Appearance (Form)</b>	Solution
<b>pH</b>	7.0 - 7.6
<b>Osmolality</b>	289 - 320 mOs/kg
<b>Cell Culture Testing - MTT</b>	Pass
<b>Cell Line</b>	Cell Line - Cell Types
<b>Sterility</b>	Pass
<b>Endotoxin Level</b>	<= 1 EU/ml
<b>Glucose Concentration</b>	0.9 - 1.1 g/l

## ANEXO 6

### SUERO FETAL BOVINO

# Specification Sheet

SIGMA-ALDRICH

<b>Product Name</b>	Fetal Bovine Serum, USA origin, sterile-filtered, suitable for cell culture, suitable for hybridoma
<b>Product Number</b>	F2442
<b>Product Brand</b>	SIGMA
<b>TEST</b>	<b>SPECIFICATION</b>
<b>Endotoxin</b>	<= 10 EU/mL
<b>Sterility per current USP</b>	Negative
<b>Mycoplasma</b>	None detected (Broth Culture)
<b>Osmolality</b>	260 - 340 mOsm/kg H <sub>2</sub> O
<b>AVA (9CFR113.53)</b>	Bovine Adenovirus (type 3 and 5) -,None detected Bovine Parvovirus - None detected Blue Tongue Virus - None detected BVDV by FA - Tested Cytopathic Effect - None detected Hemadsorption - None detected Infectious Bovine Rhinotracheitis - None,detected Parainfluenza 3 - None detected Rabies Virus - None detected Reovirus - None detected Bovine Respiratory Syncytial Virus -,None detected Vesicular Stomatitis Virus -,None detected
<b>Bacteriophage Testing</b>	Record (PFU/mL)
<b>Total Protein</b>	3.0 - 4.5 g%
<b>Chemical Analysis</b>	Cholesterol - Report result
<b>Hormone Level</b>	Estradiol - Report result
<b>Chemical Analysis</b>	Iron - Report result
	Glucose - Report result
<b>Hormone Level</b>	Insulin - Report result
<b>Chemical Analysis</b>	Sodium - Report result
<b>Hormone Level</b>	Progesterone - Report result Testosterone - Report result
<b>Tetracycline</b>	Report Result
<b>Chemical Analysis</b>	Triglyceride - Report result
<b>Serum Antibody Titer - BRSV</b>	Report result
<b>Serum Antibody Titer - BVDV</b>	Report result
<b>Serum Antibody Titer - IBR</b>	Report result
<b>Serum Antibody Titer - PI3</b>	Report result
<b>Cloning Assay</b>	Pass
<b>Mycoplasma</b>	None detected (DNA Fluorochrome Stain)
<b>Insect Cell Culture Test</b>	Min CD 1.2X10E6, Max DT 33.5 hr
<b>Cell Lines</b>	Record cell lines used
<b>pH</b>	6.7 - 8.0
<b>Bovine IgG</b>	<= 1 mg/mL
<b>Serum Performance Test</b>	Pass
<b>Cell Lines</b>	Record Cell Lines Used FIO
<b>Hemoglobin</b>	<= 20 mg%
<b>Electrophoric Profile</b>	Albumin - Report Result

	Alpha 1 Globulin - Report result Alpha 2 Globulin - Report result Beta Globulin - Report result Gamma Globulin - Report result Record Clear straw to amber colored liquid
<b>Country of Origin Appearance</b>	
<b>COMMENTS</b>	_____
<b>Intended Use</b>	For R&D use only. Not for drug, household, or other uses.
<b>Storage</b>	Store at -20 C
<b>Extended Item Desc.</b>	Fetal Bovine Serum Mammalian and Insect Cell Culture Tested Sourced in USA
<b>Origin</b>	The material used in this product was collected in the United States. Animals used for collection of serum were USDA inspected and acceptable for slaughter.
<b>C of A comments</b>	Country of final product processing: United States
<b>Label Requirements</b>	DOM: N EXP: Y Format MM/YY
<b>Expiration Notes for FG</b>	Expiration Date: 60 months from date of manufacture Stop Lot Date: 58 months from date of manufacture
<b>Label Requirements</b>	Expiration date on the Sigma label is in MM/YY format. As an example: if material expires 31AUG12 the expiration date on the label will be listed as 08/12. Use Sigma label stock. Reference F2442 master approved labels.
<b>Misc.</b>	Expiration date for SAFC/BPCS purposes is the last day of the month. As an example: 31AUG12 Create both a BPCS generated COA and a SAP generated COA. If the insect cell culture test (C402A) does not pass advise Serum Product Manager.
<b>Specification</b>	F2442.000000004
<b>Approval Date</b>	9/28/2016

