



---

---

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**

**ÁREA DE LA SALUD HUMANA**

**CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO**

**EFECTO CITOTÓXICO DEL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE  
*Annona cherimola* EN UNA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE COLON  
HUMANO EN MEDIO DE CULTIVO CON pH NEUTRO**

*Tesis previa a la obtención del Título  
de Licenciada en Laboratorio Clínico*

**AUTORA**

Jéssica Yajaira Peralta Armijos

**DIRECTORA**

Dra. Paola Mercedes Benítez Castrillón, Mg. Sc.

LOJA – ECUADOR

2016

## CERTIFICACIÓN

Loja, 21 de Enero de 2016

Dra. Paola Mercedes Benítez Castrillón, Mg. Sc.

DIRECTORA DE TESIS

CERTIFICA:

Que el presente trabajo previo a la obtención del título de Licenciado/a en Laboratorio Clínico titulado: “EFECTO CITOTÓXICO DEL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE *Annona cherimola* EN UNA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE COLON HUMANO EN MEDIO DE CULTIVO CON pH NEUTRO” de autoría del estudiante Jéssica Yajaira Peralta Armijos, ha sido realizado bajo mi dirección, por lo que se aprueba el mismo, pudiendo ser sometido a presentación pública y evaluación por parte del jurado calificador que se designe.



**Dra. Paola Mercedes Benítez Castrillón, Mg. Sc**

## AUTORÍA

Yo, Jéssica Yajaira Peralta Armijos declaro ser el autor del presente trabajo de tesis y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos de posibles reclamos o acciones legales por el contenido de la misma.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja la publicación de mi tesis en el repositorio Institucional.

**Autora:** Jessica Yajaira Peralta Armijos.

**Firma:**



**Cédula:** 1105226623

**Fecha:** Loja, 21 de Enero de 2016

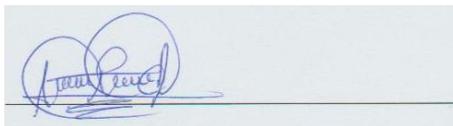
## CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS

Yo, Jéssica Yajaira Peralta Armijos, declaro ser autor de la tesis titulada EFECTO CITOTÓXICO DEL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE *Annona cherimola* EN UNA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE COLON HUMANO EN MEDIO DE CULTIVO CON pH NEUTRO, como requisito para optar al grado de Licenciado/a en Laboratorio Clínico: autorizo al sistema bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos muestre al mundo la producción intelectual de la universidad, a través del Repositorio Digital Institucional (RDI).

Los usuarios pueden consultar su contenido de este trabajo en el RDI, en las redes de información del país y del exterior.

La Universidad Nacional de Loja no se responsabiliza por el plagio o copia de la tesis que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, el 21 de Enero de 2016 firma:



- Firma:
- Autora: Jéssica Yajaira Peralta Armijos
- Cédula: 1105226623
- Correo electrónico: jes\_y29@hotmail.es
- Dirección: Loja – Loja Ecuador
- Teléfono: 072545424
- Directora: Dra. Paola Mercedes Benítez Castrillón, Mg. Sc.
- Tribunal de Tesis:

Lcda. Glenda Alfarita Rodríguez León.

Lcda. María del Cisne Loján González.

Dra. Diana Alexandra Montaña Peralta.

## **DEDICATORIA**

Esta tesis se la dedico a Dios quién supo guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

Para mi familia por su apoyo, consejos, comprensión, amor, ayuda en los momentos difíciles, y por ayudarme con los recursos necesarios para estudiar. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi empeño, mi perseverancia, mi coraje para conseguir mis objetivos.

Jéssica Peralta

## **AGRADECIMIENTO**

Le agradezco a Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.

Le doy gracias a mis padres por apoyarme en todo momento, por los valores que me han inculcado, y por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida. Sobre todo por un excelente ejemplo de vida a seguir.

A mis hermanas por ser parte de mi vida y representar la unidad familiar.

Dejo constancia de mi gratitud a la Universidad Nacional de Loja y de manera especial a la Dra. Paola Benítez Mg. Sc., quien con su ética profesional dirigió la presente tesis haciendo posible su culminación. A los docentes de la carrera de Laboratorio Clínico, que han contribuido con sus valiosos conocimientos para concluir con éxitos mis estudios universitarios.

Jéssica Peralta

**1. TÍTULO:**

EFFECTO CITOTÓXICO DEL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE *Annona cherimola*  
EN UNA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE COLON HUMANO EN MEDIO DE  
CULTIVO CON pH NEUTRO.

## 2. RESUMEN

El cáncer es una patología que puede aparecer en cualquier parte del cuerpo, se define como un proceso de crecimiento y diseminación incontrolada de células. El tumor suele invadir el tejido circundante y puede provocar metástasis en puntos distantes del organismo. Uno de los tipos de cáncer diagnosticados con mayor frecuencia es el cáncer de colon, que es una condición del intestino grueso que amenaza la vida de la persona que lo padece. El objetivo de esta investigación fue verificar la actividad citotóxica del extracto acuoso de hojas de *Annona cherimola* en una línea celular de cáncer de colon humano (RKO) en medio de cultivo con pH neutro. El presente estudio es de diseño Experimental – Prospectivo el cual se realizó en la ciudad de Loja, en los Laboratorios de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja, se cultivó células de cáncer de colon humano con el extracto acuoso de la hoja de *Annona cherimola* en un medio de cultivo con pH neutro, en este estudio se utilizó técnicas para evaluar la proliferación celular a través del conteo de células en cámara de Neubauer y determinar la viabilidad celular realizando los conteos respectivos de células vivas y células muertas en determinados lapsos de tiempo. Mediante este estudio se determinó que el extracto acuoso de la hoja de *Annona cherimola* producía un 60.9 % de muerte celular en 72 horas de incubación en el concentrado y un 55.5 % de muerte celular a una dilución 1:10 en 72 horas de incubación y una proliferación de 83.2% a las 36 horas y 36.7% a las 72 horas de incubación en el concentrado.

**PALABRAS CLAVE:** cáncer, colon, *Annona cherimola*, extracto acuoso, proliferación celular, viabilidad celular.

## SUMMARY

Cancer is a disease that can appear anywhere on the body, is defined as a process of uncontrolled growth and spread of cells. The growths often invade surrounding tissue and can metastasize to distant sites. One type of cancer is most often diagnosed with colon cancer, which is a condition of the large intestine that threatens the life of the person who has it. The aim of this investigation was to verify the cytotoxic activity of the aqueous extract of leaves *Annona cherimola* in a cell line of human colon cancer (RKO) in culture medium with neutral pH. This study is experimental design - Prospective which took place in the city of Loja, in the laboratories of Biotechnology of the National University of Loja, cells of human colon cancer was grown with the aqueous leaf extract of *Annona cherimola* in a culture medium with neutral pH, in this study techniques are used to assess cell proliferation through cell count in a Neubauer chamber and cell viability determined by performing the respective counts of live cells and dead cells at certain time periods. Through this study it was determined that aqueous leaf extract of *Annona cherimola* produced 60.9% cell death at 72 hours incubation in the concentrate and 55.5% cell death at 1:10 dilution in 72 hours of incubation and proliferation of 83.2% at 36 hours and 36.7% after 72 hours incubation in the concentrate.

**KEY WORDS:** cancer, colon, *Annona cherimola*, aqueous extract, cell proliferation, cell viability.

### 3. INTRODUCCIÓN

El cáncer se origina cuando existe una proliferación excesiva y descontrolada de células en el organismo produciendo un tumor, poniendo en peligro la vida de la persona que lo padece (OMS. 2014).

El cáncer de colon ocupa el tercer lugar en incidencia de cánceres más frecuentemente diagnosticados a nivel mundial siendo el cáncer de pulmón el primero seguido del cáncer de mama (OMS. 2014), tiene una tasa de 46/100000 habitantes y una media de edad de aparición a los 69 años (Acuña, M. 2013). Es la cuarta causa de mortalidad por cáncer con 694000 defunciones en el año 2012 (OMS. 2014).

En América Latina se encuentra entre las tres primeras patologías cancerígenas que causan muerte en mujeres y es el segundo más diagnosticado, (Bandi, P. 2011) en Ecuador se ha ido incrementando su incidencia convirtiéndose en un problema de salud registrando alrededor de 1240 casos y 700 muertes anuales (Diario Centinela. 2013).

Según datos obtenidos de Solca – Loja durante el año 2013 – 2014 se han presentado 79 casos de los cuales 40 eran hombres y 39 mujeres (Solca. 2014).

Estudios realizados en extractos vegetales han demostrado que la planta *Annona cherimola* contiene compuestos como acetogeninas y alcaloides con actividad citotóxica frente a células tumorales como en el caso del cáncer de cervix, mama y leucemia mieloide. (Quispe A. 2009) El estudio tiene como finalidad evaluar la actividad citotóxica del extracto acuoso de hojas de *Annona cherimola* en una línea celular de cáncer de colon humano en medio de cultivo con pH neutro basándose en la proliferación y viabilidad celular.

En el presente estudio se realizó un cultivo de una línea celular de cáncer de colon con el extracto acuoso de hojas de *Annona cherimola* y Fluorouracilo. La proliferación celular se evaluó mediante el conteo de las células confluentes; por otro lado se determinó la viabilidad celular con la ayuda de una técnica de coloración con un tinte denominado azul de tripano y se procedió al conteo de células vivas y muertas evaluando la citotoxicidad del extracto acuoso de hojas de *Annona cherimola*.

Se obtuvo un 60.9 % de muerte celular luego de 72 horas de incubación en el cultivo de células tumorales con el extracto acuoso de hojas de *Annona cherimola* y con el Fluorouracilo un 66.1 %.

Como conclusión podemos determinar que la citotoxicidad tanto del extracto acuoso de hojas de *Annona cherimola* como del Fluorouracilo es muy similar, lo cual podría contribuir en futuras investigaciones que busquen un tratamiento alternativo para personas que padezcan cáncer de colon.

## **4. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **4.1 Medicina Tradicional**

La utilización de la llamada medicina tradicional en países de América Latina ha entrado en una nueva etapa. Con el impresionante incremento de la demanda de alternativas terapéuticas ajenas en conceptos y prácticas al modelo científico biomédico, la medicina tradicional se encuentra enmarcada hoy día en un contexto que hace algunos años no existía (Nigenda G. 2010).

Prueba de ello es el notable crecimiento de algunos de sus recursos en países industrializados, mismo que ha venido acompañado por cambios en la composición de la oferta de servicios terapéuticos, formas distintas de entender la salud y la enfermedad, así como la utilización combinada de muchas de estas formas terapéuticas. Actualmente, la medicina tradicional representa una opción importante de repuesta ante las necesidades de atención a la salud en diferentes países de América Latina y el Caribe a pesar de su presencia subordinada en los sistemas oficiales de salud y de la situación de ilegalidad que comúnmente guardan (Nigenda G. 2010).

### **4.2 Plantas medicinales**

#### **4.2.1 Importancia de las plantas medicinales**

Las plantas medicinales son importantes para la investigación farmacológica y el desarrollo de medicamentos, no solo cuando los constituyentes de plantas se usan directamente como agentes terapéuticos sino también como materiales de base para la síntesis de los medicamentos o como modelos para compuestos farmacológicamente activos (López M. 2012).

## 4.2.2 Fitofármacos

Son medicamentos que contienen como principio activo exclusivamente plantas, partes de plantas, ingredientes vegetales o bien, preparaciones obtenidas a partir de ellas. Los fitofármacos, en sentido estricto, son fármacos: Que contienen como principio activo preparaciones vegetales, sobre todo extractos estandarizados, a diferencia de los “fármacos químicos” (Salazar I. 2014).

Una definición práctica se desprende de las dos raíces de la palabra “fitofármaco”: “fito” procede del griego y significa planta, “fármaco” es el medicamento (Salazar I. 2014).

## 4.3 Conceptualización de *Annona cherimola*

### 4.3.1 Taxonomía y morfología

La familia *Annonaceae* comprende cerca de 2 500 especies agrupadas entre 130 y 140 géneros; constituidos por árboles y arbustos, distribuidos en las regiones tropicales de América, Asia, y Madagascar. En la familia *Annonaceae* hay géneros que se caracterizan por el interés económico de sus frutos, tal es el caso del género *Annona* spp. que consta de aproximadamente 120 especies, de las que unas 20 se cultivan por dicho interés. Dentro de las especies más cultivadas se encuentran la *Annona cherimola* Miller, *Annona squamosa*, *Annona muricata* y *Annona reticulata*; originarias de Sur o Meso-América. Desde 1982 se ha intensificado la investigación de las especies de este género, debido fundamentalmente al descubrimiento del gran potencial de los productos naturales que contienen, con amplia variedad de actividades biológicas, que las mismas poseen (Gonzales M. 2013).

### **4.3.2 Origen**

El origen de esta especie está en la vertiente interandina cuyos ríos desembocan en el Marañón a una altura comprendida entre los 2200 y los 1500 m. Debajo de los 1500 m., las condiciones climáticas se hacen sumamente precarias para mantener la vida de las plantas que no tienen adaptaciones xerofíticas, desaparece prácticamente todo vestigio de chirimoya (Morales A. 2004).

Se pueden encontrar chirimoyos en estado silvestre y cultivado hacia el norte de su zona de origen, en algunas partes del sur de México, Centroamérica y parte norte de Sudamérica. Hacia el sur alcanza Bolivia y Argentina (Morales A. 2004).

Actualmente, el chirimoyo está presente en sitios naturales o en huertos semidomesticados en los valles interandinos del Ecuador, Perú y Bolivia. Sin embargo, con una superficie de alrededor 3000 ha, España es el mayor productor de chirimoyo del mundo (Morales A. 2004).

### **4.3.3 Usos y beneficios**

A nivel internacional existe interés en promover el desarrollo de tecnologías in vitro que permitan la propagación y el mejoramiento de especies de plantas con valores comerciales, dentro de ellas, leñosas, semileñosas, ornamentales, alimenticias, para fines industriales y con propiedades medicinales (Gonzales M. 2013).

En especies foráneas de *A. cherimola* se ha identificado la presencia de numerosas sustancias bioactivas de diversa naturaleza química, en hojas, raíz, frutas y semillas. Esta especie es también conocida como planta medicinal, se plantea que el té elaborado a partir de sus hojas es relajante, así como que sus

frutos poseen efecto laxante y garantizan beneficios a la digestión (Gonzales M. 2013).

Los frutos de chirimoya han sido caracterizados, encontrándose que producen una amplia gama de compuestos volátiles. Se han reportado alcaloides, terpenoides, flavonoides, acetogeninas y aceites saponificables. La bioactividad de este tipo de metabolitos de plantas pertenecientes a las Anonáceas está asociada a su efecto como insecticidas, actividad citotóxica, antitumoral, antibacterial, pesticida, antimalarial, antileishmaniasis y propiedades antihelmínticas (Gonzales M. 2013).

Estas plantas de la familia *Annonaceae*, contienen en la semilla triglicéridos basados en ácidos grasos saturados e insaturados. Los más característicos son: ácido linoleico, ácido oleico, ácido esteárico, entre otros. Los aceites y otros extractos de la planta contienen trazas de acetogeninas de reconocida citotoxicidad, que le confieren importantes propiedades e interés a esta familia botánica (Gonzales M. 2013).

#### **4.3.4 Composición química de las hojas de *Annona cherimola***

Por ser una de las anonaceas ampliamente estudiadas, se han aislado metabolitos como alcaloides, ácidos grasos, amidas y acetogeninas, tanto de la corteza, como de las semillas, el tallo y las hojas (Florez Y, Martínez E. 2010).

##### **4.3.4.1 Metabolitos**

El conjunto de reacciones químicas que tienen lugar en un organismo constituye el metabolismo. La mayor parte del carbono, del nitrógeno y de la energía termina en moléculas comunes a todas las células, necesarias para su funcionamiento y el de los organismos. Se trata de aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos, presentes en todas las plantas y desempeñando las mismas

funciones que se denominan metabolitos primarios. Pero a diferencia de otros organismos, las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, y que se denominan metabolitos secundarios (también denominados productos secundarios, productos naturales) (Ávalos A, Pérez-Urria E. 2010).

#### **4.3.4.1.1 Metabolitos secundarios**

Los metabolitos secundarios de las plantas son compuestos químicos sintetizados por las plantas que son productos del metabolismo secundario y que cumplen funciones no esenciales en ellas, de forma que su ausencia no es fatal para la planta, ya que no intervienen en el metabolismo primario de las plantas (Soto M. 2013).

Es importante destacar que también reciben la denominación de productos naturales y tienen un importante y significativo valor medicinal y económico, derivado éste último de su uso en la industria cosmética, alimentaria, farmacéutica. Un gran número de estos productos naturales, que ya se usaban en la medicina antigua como remedios para combatir enfermedades, se utilizan en la actualidad como medicamentos, resinas, gomas, potenciadores de sabor, aromas, colorantes, etc. (Ávalos A, Pérez-Urria E. 2010).

Se agrupan en cuatro clases principales.

- **Terpenos.** Entre los que se encuentran hormonas, pigmentos o aceites esenciales (Ávalos A, Pérez-Urria E. 2010).

- **Compuestos fenólicos.** Cumarinas, flavonoides, lignina y taninos. Glicósidos. Saponinas, glicósidos cardiacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos (Ávalos A, Pérez-Urria E. 2010).
- **Alcaloides.** Los alcaloides son moléculas de origen vegetal, aunque existen proto-alcaloide de origen animal. Se caracterizan por su estructura molecular compleja a base de átomos de carbón, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno. Hay aproximadamente 5000 alcaloides diferentes, y todos son de naturaleza alcalina (tienen un sabor amargo), de ahí su nombre (Ávalos A, Pérez-Urria E. 2010).
- **Acetogeninas.** Los compuestos de interés, por su comprobada actividad biológica presentes en las *Annonaceae*, son un grupo de metabolitos secundarios bioactivos conocidos como acetogeninas. Estas acetogeninas poseen un grupo  $\gamma$ -lactónico  $\alpha,\beta$ -insaturado o saturado y uno, dos, o tres anillos tetrahidrofuránicos sobre una larga cadena alquílica; las cuales presentan diferentes bioactividades como antitumoral inmunosupresiva, pesticida, antiprotozoal y antimicrobiana, Usualmente las posiciones  $\alpha$  a los anillos son hidroxiladas. Son compuestos de 35 o 37 carbonos de origen policétido, con una cadena alifática que se presenta, según el caso, hidroxilada, cetonzada y/o acetoxilada (Flores Y, 2010).

Las acetogeninas de *Annonaceae* pueden inhibir selectivamente el crecimiento de las células cancerígenas y también inhibir el crecimiento de células resistentes. Las acetogeninas son potentes inhibidores de la NADH ubiquinona oxidoreductasa, que es una

enzima esencial en el Complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (Flores Y, 2010).

Las acetogeninas derivados de la larga cadena de ácidos grasos tienen acción directa sobre las mitocondrias, el ATP, el Aparato Reticular de Golgi y las membranas y plasma celular de las células cancerosas destruyéndolas selectivamente sin dañar las células y tejidos sanos (Ruiz, J. 2010).

La modulación de la producción de ATP afecta la viabilidad de células específicas y el crecimiento de vasos sanguíneos que los nutren (Ruiz, J. 2010).

#### **4.4 Definición de extractos**

Mezcla compleja, con multitud de compuestos químicos, obtenible por procesos físicos, químicos, y microbiológicos a partir de una fuente natural y utilizable en cualquier campo de la tecnología. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) el 25% de los fármacos comercializados actualmente son de origen vegetal y un 25% contiene principios vegetales modificados químicamente (Castaño M, Zapata J. 2012).

##### **4.4.1 Definición de extracto Acuoso**

Preparación en agua de la sustancia de una determinada planta que contiene la fracción biológica sin el residuo celular (ONSALUS, 2015).

##### **4.4.2 Método de obtención de extracto Acuoso**

- Método de Infusión.- La droga se extrae con agua caliente, pero sin someterla a ebullición o con agua fría (Barahona. V. 2013).

###### **4.4.2.1 Procedimiento**

- Pesar 10 gramos de hojas de guanábana.

- Hervir en 400 ml agua corriente o destilada por 15 minutos
- Centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos
- Dejar unos segundos tapar y apagar la llama
- Enfriar, filtrar y envasar en un frasco ámbar (Barahona. V. 2013).

#### **4.5 Definición de cultivo Celular**

Los cultivos de células *in vitro* consisten en un sistema formado por células provenientes de un órgano o un tejido, normal o tumoral, mantenidas en medios de cultivo de composición química definida y en condiciones de temperatura, pH, aireación y humedad controladas. De esta forma se aseguran su supervivencia y multiplicación, manteniendo todas sus funciones metabólicas de una manera semejante a las que tenían en el huésped (Cárdenas C, Rodríguez A, 2011)

##### **4.5.1 Tipos de cultivo celular**

###### **4.5.1.1 Cultivos primarios**

Cultivo establecido a partir de un tejido u órgano. Las células mantienen la viabilidad un periodo de tiempo limitado y no se reproducen en cultivo. En general en cultivo presentan una reducción en el número total de células vivas a lo largo del tiempo. Ejemplos: hepatocitos obtenidos de hígado adulto, neuronas (Pietrasanta L, 2011).

###### **4.5.1.2 Cultivos secundarios**

En estas condiciones las células suelen multiplicar se hasta cubrir la superficie del recipiente de cultivo, formando una monocapa (capa de una célula de espesor). Como consecuencia del contacto entre las células se detiene temporalmente su proliferación, hasta que se las subcultiva a un recipiente con medio fresco. Así, podrán subcultivarse durante semanas o meses. En este

estadío, las células frecuentemente mostrarán distintas propiedades según su origen (Pietrasanta L, 2011).

#### **4.5.1.3 Líneas celulares**

Cuando el cultivo proviene de células que han sido disgregadas de un tejido original recién extraído, recibe el nombre de Cultivo Primario. Cuando este cultivo primario es sometido a procesos de transformación que le confieren capacidad ilimitada de multiplicación, recibe el nombre de Línea Celular (Cárdenas C, Rodríguez A, 2011).

Las líneas celulares son muy útiles en la investigación celular, como fuente de un gran número de células uniformes, que pueden ser conservadas y almacenadas en nitrógeno líquido (a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) por un período muy largo de tiempo, reteniendo su viabilidad y siendo un buen modelo experimental para las primeras etapas de una investigación (Pietrasanta L, 2011).

#### **4.5.2 Tipos de crecimiento celular**

Durante el establecimiento de un cultivo, dependiendo del tipo de células, se pueden obtener dos tipos de crecimiento:

##### **4.5.2.1 Células adherentes o cultivos fijos**

Requieren unirse a una superficie para su multiplicación donde se formará una monocapa (Castaño M, Zapata J. 2012).

##### **4.5.2.2 Células no adherentes o cultivos en suspensión**

Se multiplican suspendidas en medio líquido, donde se sedimentan pero no se adhieren a la superficie del recipiente (Castaño M, Zapata J. 2012).

#### **4.6 Factores Básicos para la supervivencia celular**

- Presión osmótica
- Concentración de hidrogeniones

- Gases (oxígeno)
- Dióxido de carbono
- Iones orgánicos
- Agua
- Carbohidratos
- Aminoácidos
- L- Glutamina
- Vitaminas
- Suero
- Antibióticos y antimicóticos (Castaño M, Zapata J. 2012).

#### **4.7 Viabilidad celular**

Se basa en la evaluación del número de células vivas y muertas mediante la marcación con sustancias que evalúan dos parámetros: 1) la actividad de esterasa intracelular con el reactivo de calceína AM y 2) la integridad de la membrana celular con el reactivo de etidio H-1 (Eynard A. 2008).

La calceína AM, que no es fluorescente, penetra en células vivas y es convertida por la actividad de la esterasa mitocondrial, en el colorante polianiónico calceína, que es retenido por las células vivas y fluorescente intensamente en color verde. Por su parte el etidio H-1 no penetra la membrana plasmática de células vivas, pero penetra la membrana dañada de las células muertas y aumenta 40 veces su fluorescencia al unirse con los ácidos nucleicos, con una señal fluorescente de color rojo (Eynard A. 2008).

#### **4.8 Proliferación celular**

La proliferación celular es el incremento del número de células por división celular. La proliferación celular es más activa durante la embriogénesis y el

desarrollo de un organismo y es fundamental para la regeneración de tejidos dañados o viejos. Es característica de cada tipo celular por lo que está controlada de forma muy específica. El genoma codifica un conjunto complejo de proteínas que regulan la división celular y por tanto la proliferación de las células. Asimismo cada tipo celular presenta una serie de receptores de factores de crecimiento característicos que también regulan la proliferación celular al controlar la respuesta a tales factores (Proliferación celular. 2010).

El proceso de diferenciación hace que cada tipo celular exprese un perfil de genes característico. Este perfil de expresión marca la capacidad proliferativa de cada tipo celular y su forma de responder a cada tipo de estímulo. Hay células, como las epiteliales o las hematopoyéticas, con una alta capacidad proliferativa que están en constante renovación y otras, como las neuronas, que tienen una capacidad proliferativa muy baja (Proliferación celular. 2010).

El control de la proliferación celular es esencial para el correcto funcionamiento del organismo. La pérdida de esta regulación es la causa de enfermedades como el cáncer donde una célula forma una línea celular con capacidad de proliferación celular ilimitada e incontrolada debido a mutaciones genéticas. Por el contrario una pérdida de la capacidad de proliferación celular es uno de los factores que originan el envejecimiento (Proliferación celular. 2010).

#### **4.9 Terapia farmacológica para el cáncer**

El objetivo último de la terapéutica anticancerosa es la eliminación completa de toda célula cancerosa, mediante métodos quirúrgicos, radioterápicos y farmacológicos. Los distintos fármacos pueden clasificarse en función de su mecanismo de acción o del momento de actuación en el ciclo celular (Rodilla F. 2015).

#### **4.9.1 Fármacos antimetabolitos**

Actúan en la fase de síntesis del ciclo celular porque interfieren en la síntesis de ADN y ARN (Rodilla F. 2015).

##### **4.9.1.1 Análogos de las bases pirimidínicas**

Como análogo del uracilo destaca el 5-fluorouracilo (5-FU) que incorpora un átomo de fluor en posición 5 en lugar de hidrógeno (Rodilla F. 2015).

Lesiona las células por dos mecanismos: inhibe la timidilato-sintetasa y se incorpora al ARN (Rodilla F. 2015).

Como análogo de la citosina destaca el arabinósido decitosina, citarabina o ara-C (arabinósido de citosina). Inhibe competitivamente la ADN-polimerasa; puede inhibir débilmente la actividad de la ADN-polimerasa, responsable de los procesos de reparación (Rodilla F. 2015).

Otros análogo de la citosina de más reciente utilización es la gemcitabina (Gemzar), que inhibe la síntesis de ADN (Rodilla F. 2015).

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### **Tipo de estudio:**

La presente investigación es de diseño Experimental – Prospectivo.

### **Área de Estudio:**

La presente investigación se realizó en la ciudad de Loja, en los Laboratorios de cultivo celular del Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.

### **Técnicas y procedimientos**

#### **Fase pre-analítica**

- Oficio que permita ser parte del presente proyecto de Investigación. (Anexo 1)
- Adquisición de líneas celulares ATCC. (Anexo 2)
- Mantenimiento celular:
  - ✓ Medio de congelación. (Anexo 3)
  - ✓ Criocongelación. (Anexo 4)
  - ✓ Descongelación celular. (Anexo 5)
- Preparación de extracto acuoso de las hojas de *Annona cherimola* en diferentes concentraciones en el Laboratorio de cultivos celulares de la Universidad Nacional de Loja. (Anexo 6)

#### **Fase analítica**

Se desarrollaron los siguientes protocolos:

- Preparación de medios de cultivo RPMI. (Anexo 7)

- Preparación de controles positivos con el fármaco Fluorouracilo en diferentes concentraciones. (Anexo 8)
- Ensayos en el laboratorio de Cultivo de células de la Universidad Nacional de Loja.
- Tripsinización de células RKO. (Anexo 9)
- Colocación de células en los respectivos pocillos. (Anexo 10)
- Viabilidad celular: se utilizó el método de exclusión del colorante de azul de tripano, en donde primero se realizó una suspensión que permitió diferenciar las células vivas de las células muertas; primeramente se mezcló la suspensión de células y el colorante, posteriormente se colocó la mezcla en la cámara de Neubauer para observar en el microscopio. Se contó el número de células presentes en cada campo visual basado en la muerte celular. (Anexo 11)
- Determinación de la proliferación celular: se realizó mediante la visualización y el conteo de células confluentes en la cámara de Neubauer a las 6, 36 y 72 horas de incubación. (Anexo 12)

#### **CONTROL POSITIVO:**

- Cultivo de células RKO más fármaco utilizado en la actualidad (Fluo-uracilo) en medio RPMI en pH neutro

#### **CONTROL NEGATIVO:**

- Cultivo de células RKO sin extracto en medio RPMI en pH neutro.

#### **Fase post-analítica**

- Cálculos para la determinación de proliferación celular basado en la confluencia. (Anexo 13)
- Cálculos de muerte celular (Anexo 14)

- Para el análisis estadístico se utilizó el programa SAS con las siguientes pruebas (Anexo 15):
  - Adeva: Para evaluar la significancia entre las medias y se obtiene mediante la determinación del F calculado.
  - Duncan: Clasifica los tratamientos por grupo y de estos determina cuales tienen mayor significancia.
  - T-student: Utiliza los dos grupos más significativos determinando la media entre los dos.

## 6. RESULTADOS

### PROLIFERACIÓN CELULAR

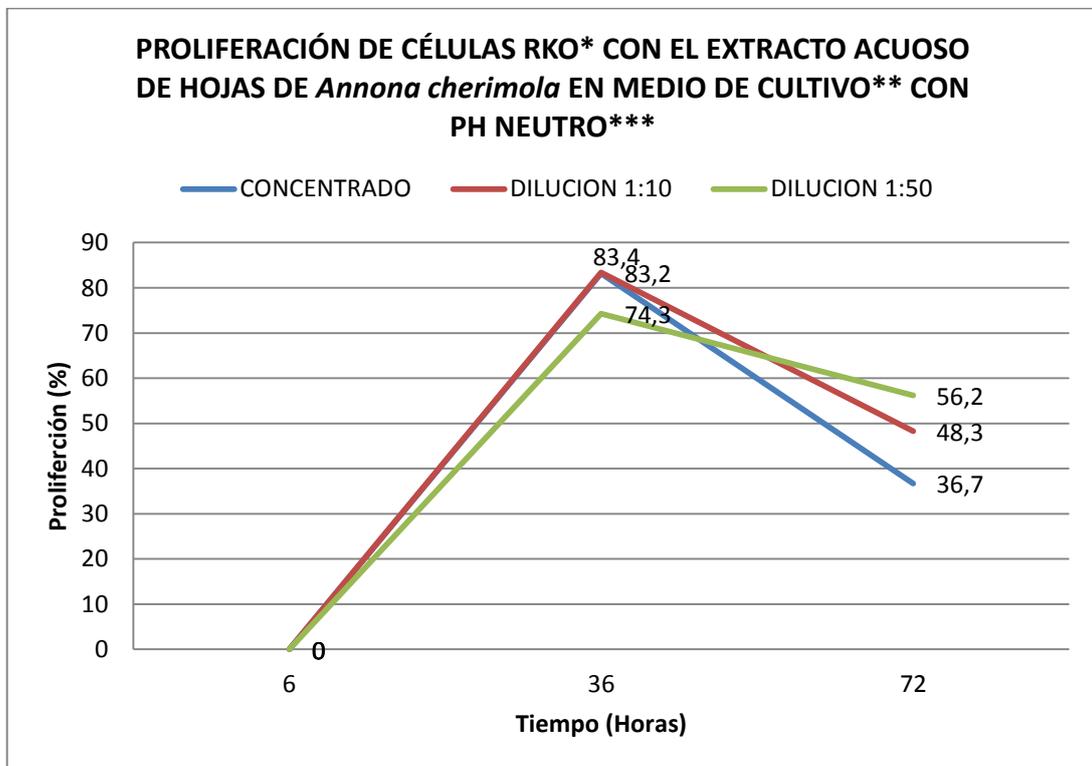
TABLA 1

PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS RKO\* CON EL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE *Annona cherimola* EN MEDIO DE CULTIVO\*\* CON PH NEUTRO\*\*\*

HORAS	6	36	72
CONCENTRADO	0%	83,2%	36,7%
DILUCIÓN 1:10	0%	83,4%	48,3%
DILUCIÓN 1:50	0%	74,3%	56,2%

Fuente: Registros de la investigación  
Autora: Jéssica Yajaira Peralta Armijos  
\* Línea celular de cáncer de colon humano  
\*\* Medio RPMI 1640  
\*\*\* pH: Neutro

GRÁFICO 1



Fuente: Registros de la investigación  
Autora: Jéssica Yajaira Peralta Armijos  
\* Línea celular de cáncer de colon humano  
\*\* Medio RPMI 1640  
\*\*\* pH: Neutro

### INTERPRETACIÓN:

En el gráfico 1, se determinó una proliferación celular de 0 % a las 6 horas, 83.2 % a las 36 horas y 36.7 % a las 72 horas en el cultivo del extracto concentrado; 0 % a las 6 horas, 83.4 % a las 36 horas y 48.3 % a las 72 horas de incubación en el cultivo diluido 1:10; 0 % a las 6 horas, 74.3 % a las 36 horas y 56.2 % a las 72 horas de incubación en el cultivo diluido 1:50. Demostrando que existe una proliferación celular mayor a las 36 horas y disminuyendo a las 72 horas.

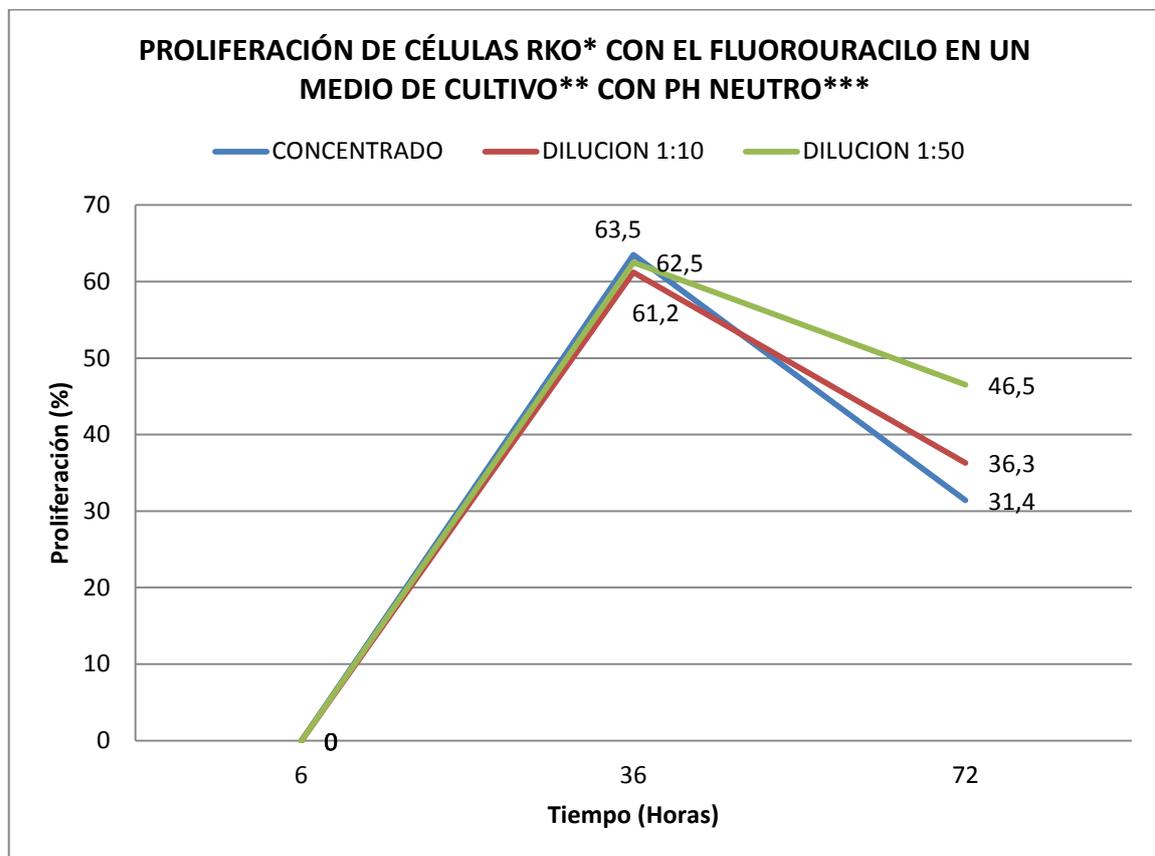
TABLA 2

**PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS RKO\* CON EL FLUOROURACILO EN UN MEDIO DE CULTIVO\*\* CON PH NEUTRO\*\*\***

HORAS	6	36	72
CONCENTRADO	0%	63.5%	31.4%
DILUCIÓN 1:10	0%	61.2%	36.3%
DILUCIÓN 1:50	0%	62.5%	46.5%

Fuente: Registros de la investigación  
 Autor: Jéssica Yajaira Peralta Armijos  
 \* Línea celular de cáncer de colon humano  
 \*\* Medio RPMI 1640  
 \*\*\* pH: Neutro

GRÁFICO 2



Fuente: Registros de la investigación  
 Autor: Jéssica Yajaira Peralta Armijos  
 \* Línea celular de cáncer de colon humano  
 \*\* Medio RPMI 1640  
 \*\*\* pH: Neutro

**INTERPRETACIÓN**

En el gráfico 2, se observa una proliferación celular de 0 % a las 6 horas de incubación, 63.5 % a las 36 horas y 31.4 % a las 72 horas de incubación en el cultivo con el Fluorouracilo concentrado; en el cultivo con la dilución 1:10 la proliferación celular fue de 0%, 61.2 % y de 36.3 % a las 0, 36 y 72 horas de incubación; de la misma forma en el cultivo con la dilución 1:50 fue de 0 %, 62.5 % y 46.5 % de proliferación celular a 6,36 y 72 horas de incubación.

## VIABILIDAD CELULAR

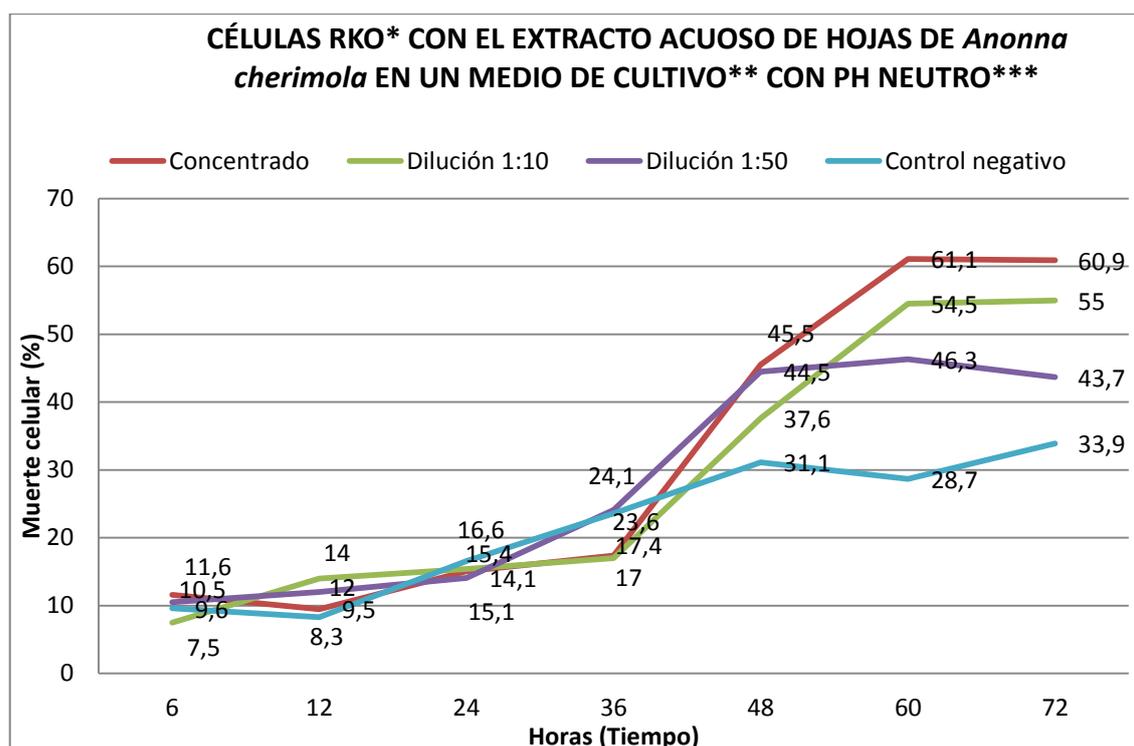
TABLA 3

CÉLULAS RKO\* CON EL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE *Annona cherimola* EN UN MEDIO DE CULTIVO\*\* CON PH NEUTRO\*\*\*

Horas	Concentrado	Dilución 1:10	Dilución 1:50	Control negativo
6	11.6%	7.5%	10.5%	9.6%
12	9.5%	14.0%	12.0%	8.3%
24	15.1%	15.4%	14.1%	16.6%
36	17.4%	17.0%	24.1%	23.6%
48	45.5%	37.6%	44.5%	31.1%
60	61.1%	54.5%	46.3%	28.7%
72	60.9%	55.0%	43.7%	33.9%

Fuente: Registros de la investigación  
 Autor: Jéssica Yajaira Peralta Armijos  
 \* Línea celular de cáncer de colon humano  
 \*\* Medio RPMI 1640  
 \*\*\* pH: Neutro

GRÁFICO 3



Fuente; Registros de la investigación  
 Autora: Jéssica Yajaira Peralta Armijos  
 \* Línea celular de cáncer de colon humano  
 \*\* Medio RPMI 1640  
 \*\*\* pH: Neutro

## INTERPRETACIÓN

En el gráfico 3 podemos observar que el extracto acuoso de hojas de *Annona cherimola* concentrado produce una muerte celular de 60.9%, en el extracto diluido 1:10 un 55% y en la dilución 1:50 un 43.7% luego de 72 horas de incubación determinando que el extracto acuoso de hojas de *Annona cherimola* concentrado tiene mayor efecto citotóxico frente a células tumorales.

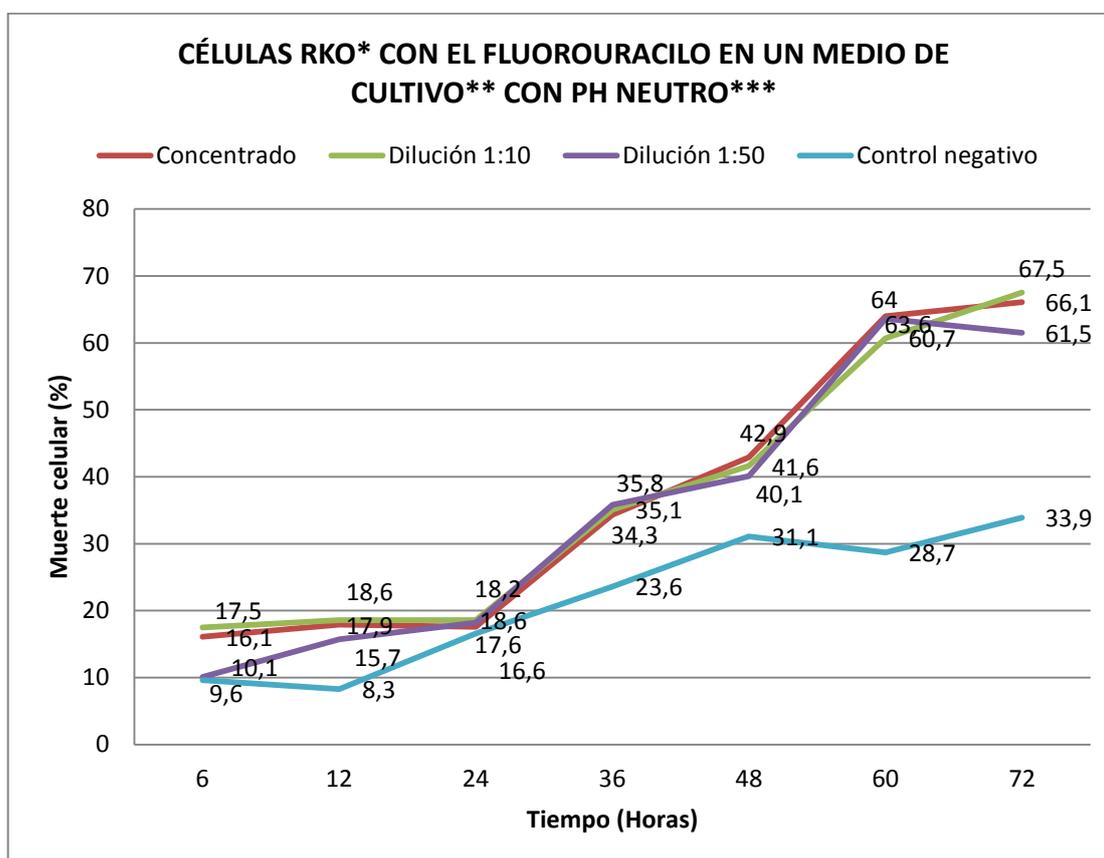
TABLA 4

**CÉLULAS RKO\* CON EL FLUOROURACILO EN UN MEDIO DE CULTIVO\*\* CON PH NEUTRO\*\*\***

Horas	Concentrado	Dilución 1:10	Dilución 1:50	Control negativo
6	16.1%	17.5%	10.1%	9.6%
12	17.9%	18.6%	15.7%	8.3%
24	17.6%	18.6%	18.2%	16.6%
36	34.3%	35.1%	35.8%	23.6%
48	42.9%	41.6%	40.1%	31.1%
60	64.0%	60.7%	63.6%	28.7%
72	66.1%	67.5%	61.5%	33.9%

Fuente: Registros de la investigación  
 Autora: Jéssica Yajaira Peralta Armijos  
 \* Línea celular de cáncer de colon humano  
 \*\* Medio RPMI 1640  
 \*\*\* pH: Neutro

GRÁFICO 4



Fuente: Registros de la investigación  
 Autora: Jéssica Yajaira Peralta Armijos  
 \* Línea celular de cáncer de colon humano  
 \*\* Medio RPMI 1640  
 \*\*\* pH: Neutro

**INTERPRETACIÓN**

El gráfico 4 demuestra que el Fluorouracilo concentrado con células RKO produce una muerte celular de 66.1 %, seguido del cultivo diluido 1:10 con un 67.5 % después de 72 horas de incubación siendo el cultivo concentrado más citotóxico hacia células tumorales.

## 7. DISCUSIÓN

La utilización de las plantas como agentes terapéuticos en la atención primaria de la salud, se ha mantenido a lo largo del tiempo y puede afirmarse que aproximadamente el 60-80% de la población mundial todavía depende en gran parte de los tratamientos tradicionales que implican el uso de extractos de plantas o de sus principios activos (Carrillo T, Moreno G. 2010). Las plantas medicinales son importantes para la investigación farmacológica y el desarrollo de medicamentos, no solo cuando los constituyentes de plantas se usan directamente como agentes terapéuticos sino también como materiales de base para la síntesis de los medicamentos o como modelos para compuestos farmacológicamente activos (López M. 2012).

Los resultados obtenidos en el presente estudio fueron de 83.2% y 36.7% de proliferación celular a las 36 y 72 horas de incubación respectivamente con el extracto acuoso de las hojas de *Annona cherimola*; en el caso del Fluorouracilo fueron de 63.5% y 31.4% de proliferación celular a las 36 y 72 horas de incubación. En lo que respecta a la viabilidad celular los resultados fueron de 45.5% y 60.9% de muerte celular a las 48 y 72 horas de incubación respectivamente con el extracto acuoso de hojas de *Annona cherimola*; con Fluorouracilo fueron de 42.9% y 66.1% de muerte celular a las 48 y 72 horas de incubación.

Al no disponer de estudios con características similares se han tomado en cuenta los siguientes:

De acuerdo a un estudio realizado en Lima – Perú en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos en el año 2009 acerca del “Efecto citotóxico de las semillas de *Annona cherimola* en cultivos de cáncer de cérvix, mama y leucemia mieloide crónica” el mismo que se llevó a cabo mediante bioensayos de citotoxicidad con sulforodamina B (SRB) en la

línea celular de Adenocarcinoma de mama (MCF - 7) el porcentaje de crecimiento obtenido fue de - 45.5% hasta 67.3% en el lapso de 48 horas en donde el porcentaje negativo representa la citotoxicidad y el valor positivo el crecimiento o proliferación celular, lo cual se relaciona con nuestro estudio en donde se evidenció el mismo comportamiento, a mayor concentración menor fue la proliferación celular y mayor la muerte celular con la línea celular de cáncer de colon humano (RKO), con un valor de 45.5% en lo referente a citotoxicidad en 48 horas y 83.2% respecto a proliferación celular en 36 horas (Quispe A. 2009).

En un estudio realizado en Lima - Perú en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM) en el año 2006 sobre el “Efecto citotóxico selectivo in vitro de muricin H (acetogenina de *Annona muricata*) en cultivos celulares de cáncer de pulmón” utilizando bioensayo de citotoxicidad con sulforodamina B (SRB), se realizó el conteo de células a las 48 horas dando como resultados un porcentaje de crecimiento de las células tumorales de cáncer de pulmón (H460) de 45% aproximadamente en la concentración más baja utilizando muricin H en relación con la dosis igual de Fluorouracilo (5-FU) que fue mayor a 75%, por otro lado en la concentración más alta no existe crecimiento celular utilizando muricin H, no así en el caso del Fluorouracilo que tuvo una proliferación celular del 5% aproximadamente; frente a nuestro estudio, el cual se llevó a cabo mediante la observación y conteo de las células confluentes en el hemocitómetro a las 36 horas, dando como resultado una proliferación celular del 74.3% con el extracto acuoso de hojas de *Annona cherimola* y un 62.5% con el Fluorouracilo en la dosis más baja; en cambio en la dosis alta se obtuvo un 83.2% con el extracto acuoso de hojas de *Annona cherimola* y un 63.5% con el Fluorouracilo; en lo que se diferencia con el presente estudio al mostrar una menor proliferación celular utilizando un principio activo específico (Muricin H) de la *Annona*

*muricata* mientras que en nuestro estudio existió una mayor proliferación celular utilizando el extracto acuoso de hojas de *Annona cherimola* (Quispe A. 2006).

Según un estudio realizado en Lima – Perú en la Universidad Mayor de San Marcos en el año 2007 acerca del “Efecto citotóxico de *Annona muricata* (guanabana) en cultivo de líneas celulares de adenocarcinoma gástrico (C - 678) y pulmonar humano (H 460)”, el cual se llevó a cabo mediante el uso de líneas celulares tumorales, extracto etanólico de las hojas de *Annona muricata* y el fármaco Fluorouracilo; empleando el método de bioensayo de citotoxicidad con sulforodamina B y espectrofotometría, consiguiendo los siguientes resultados: un crecimiento celular de - 2.5% con Fluorouracilo y - 6.7% con extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* en la línea celular H 460; - 12.4% con Fluorouracilo y - 19.8% con extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* en la línea celular C - 678 en contraste con nuestro estudio en el cual se realizó el conteo de células confluentes en un hemocitómetro dando lugar a los siguientes resultados: una proliferación celular de 63.5% con Fluorouracilo y 83.2% con el extracto acuoso de la hoja de *Annona cherimola* (Quispe A. 2007).

## 8. CONCLUSIONES

- Se determinó que el extracto acuoso de la hoja de *Annona cherimola* tiene un efecto en la proliferación de células de cáncer de colon humano, disminuyéndo entre las 36 y 72 horas de incubación; la inhibición de la proliferación celular fue mayor en el concentrado en comparación con la dilución 1/10; comparando con el medicamento (Fluorouracilo) se obtuvo una proliferación celular menor que la del extracto acuoso de hojas de *Annona cherimola*.
- La viabilidad celular se determinó basándose en la muerte celular en donde el extracto acuoso de hojas de *Annona cherimola* demostró un efecto citotóxico hacia células de cáncer de colon humano aumentando proporcionalmente hasta 60.9% a las 72 horas de incubación, la citotoxicidad fue mayor en el concentrado y menor en la dilución 1/10; el Fluorouracilo tuvo un efecto similar al del extracto acuoso de hojas de *Annona cherimola* llegando a un 66.1% de muerte celular a las 72 horas de incubación.

## 9. RECOMENDACIONES

- Realizar futuros estudios en donde se evalúen las propiedades y los efectos citotóxicos de los compuestos presentes en las hojas de la *Annona cherimola* frente a células tumorales.
- Es recomendable también que al seguir con los estudios se utilicen técnicas más específicas y sensibles como es el caso de la citometría de flujo.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Acuña M. (2013). *Cáncer de Colon*. Enero 13, 2015, de Oncología, guías diagnósticas Sitio web: [http://www.hgm.salud.gob.mx/descargas/pdf/area\\_medica/onco/guias/cancer\\_Colon.pdf](http://www.hgm.salud.gob.mx/descargas/pdf/area_medica/onco/guias/cancer_Colon.pdf)
- American Cancer Society. (2014). *Cáncer colorrectal*. Enero 13, 2015, de American Cancer Society Sitio web: <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002290-pdf.pdf>
- Arce G. (2013). *El cáncer de colon, mal que va en aumento*. Enero 13, 2015, de Diario El telégrafo Sitio web: <http://www.ppelverdadero.com.ec/nota-del-dia/item/el-cancer-de-colon-mal-que-va-en-aumento.html>
- Asociación Española contra el Cáncer. (2014). *Cáncer de colon*. Febrero 8, 2015, de AECC Sitio web: <https://www.aecc.es/SobreElCancer/CancerPorLocalizacion/cancerdecolon/Paginas/seguimientoyrevisiones.aspx>
- Bandi P. (2011). *Datos y Estadísticas sobre el Cáncer entre los Hispanos/Latinos 2009-2011*. Enero 13, 2015, de Sociedad Americana del Cáncer Sitio web: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-027826.pdf>
- Ávalos A, Pérez-Urria E. (2010). Metabolismo secundario. *Reduca*, Vol. 1, pp. 119-122.
- Barahona V. (2013). *Evaluación de la Actividad Antioxidante y valor Nutracéutico de las Hojas y frutos de la Guanábana*. Febrero 9, 2015, de Escuela Superior Politécnica de Chimborazo Sitio web: <http://dspace.esoch.edu.ec/bitstream/123456789/2453/1/56T00321.pdf>

- Cárdenas C, Rodríguez A. (2011). *Unidad de Cultivos Celulares*. Enero 13, 2015, de Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación Sitio web: [http://www.scai.uma.es/servicios/ciencias\\_vida/cce/cce.html](http://www.scai.uma.es/servicios/ciencias_vida/cce/cce.html)
- Carrillo T, Moreno G. (Mayo 2010). Importancia de las plantas medicinales en el autocuidado de la salud en tres caseríos de Santa Ana Trujillo, Venezuela. *Revista de la Facultad de la Farmacia*, Vol. 48, pp. 21-22.
- Castaño M, Zapata J. (2012). *Principios de virología*. Febrero 9, 2015, de Biogénesis Sitio web: <http://editorialbiogenesis.udea.edu.co/index.php/biogenesis/article/viewFile/252/252>
- Diario Centinela. (2013). *Incidencia del cáncer de colon*. Enero 13, 2015, de Diario Centinela Sitio web: <http://diariocentinela.com.ec/incidencia-del-cancer-de-colon/>
- Eynard A. (2008). *Histología y embriología del ser humano. Bases celulares y moleculares*. Febrero 9, 2015: Editorial Médica Panamericana.
- Florez Y, Martínez E. (2010). *Obtención y evaluación de extractos bioactivos presentes en semillas de Annona muricata de la región cafetera*. Enero 13, 2015, de Universidad Tecnológica de Pereira Sitio web: <http://recursosbiblioteca.utp.edu.co/dspace/bitstream/11059/1828/1/63441F634.pdf>
- Gonzales M. (2013). *Chirimoya (Annona cherimola Miller), frutal tropical y subtropical de valores promisorios*. Febrero 8, 2015, de Scielo Sitio web: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0258-59362013000300008&script=sci\\_arttex](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0258-59362013000300008&script=sci_arttex)
- Instituto Nacional del Cáncer. (2014). *Exámenes para detectar el cáncer colorrectal y los pólipos*. Febrero 8, 2015, de Instituto Nacional del Cáncer de los Institutos Nacionales de la Salud de EE.UU Sitio web:

<http://www.cancer.gov/espanol/recursos/hojas-informativas/deteccion-diagnostico/examenes-colorrectal>

- López M. (2012). Manual de plantas medicinales para guinea ecuatorial. *Fundación de religiosos para la salud*, Vol. 1, pp. 7-8.
- Molina V. (2012). *Generalidades*. Febrero 8, 2015, de Molina V Sitio web: <http://mural.uv.es/monavi/disco/primer/anatomia/Tema56.pdf>
- Morales A. (2004). *Genetic diversity and geographic distribution of Annona cherimola in Southern Ecuador*. Febrero 8, 2015, de LYONIA Sitio web: [http://www.lyonia.org/articles/rbussmann/article\\_356/pdf/article.pdf](http://www.lyonia.org/articles/rbussmann/article_356/pdf/article.pdf)
- Navarro M. (21 de enero del 2014). Estudio preliminar del potencial bioactivo de la *Annona cherimola* (anona) y *Prunus domestica* (ciruelo) cultivadas en Costa Rica. *Tecnología en marcha*, Vol. 1, pp. 2-8.
- Nigenda G. (2010). La práctica de la medicina tradicional en América Latina y el Caribe: el dilema entre regulación y tolerancia. *Medicina Tradicional en América Latina y el Caribe*, Vol. 43, pp. 41-42.
- OMS. (2014). La batalla mundial contra el cáncer no se ganará únicamente con tratamiento. Enero 13, 2015, de OMS Sitio web: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/cancer-report-20140203/es/>
- OMS. (2014). *Cáncer*. Enero 13, 2015, de OMS Sitio web: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- Onsalus. (2015). *Extracto acuoso*. 11/02/015, de onsalus Sitio web: <http://www.onsalus.com/diccionario/extracto-acuoso/11204>
- Patient Education. (2011). *Cáncer del colon*. Enero 13, 2015, de The Patient Education Institute, Inc. Sitio web:

<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/tutorials/coloncancerspanish/oc0691s5.pdf>

- Pietrasanta L. (2011). *Práctica de laboratorio n° 4: Cultivo Celular*. Febrero 8, 2015, de Tópicos en Biofísica Molecular Sitio web: [http://users.df.uba.ar/catalina/TBM/TBM\\_labo4.pdf](http://users.df.uba.ar/catalina/TBM/TBM_labo4.pdf)
- Proliferación celular. (2010). *Proliferación celular*. Febrero 9,2015, de Medicina molecular. Sitio web: <http://medmol.es/glosario/104/>
- Quispe, A. (2009). Efecto citotóxico de las semillas de *Annona cherimola* en cultivos de cáncer de cérvix, mama y leucemia mieloide crónica. *Acta méd. peruana [online]*, Vol. 26, pp. 156-161.
- Quispe, A. (2007). Efecto citotóxico de *Annona muricata* (guanabana) en cultivo de líneas celulares de adenocarcinoma gástrico y pulmonar. *CIMEL*, Vol. 12, pp. 19-22.
- Quispe, A. (2006). Efecto citotóxico selectivo in vitro de Muricin H (acetogenina de *Annona muricata*) en cultivos celulares de cáncer de pulmón. *Rev. Perú Med*, Vol. 23, pp. 265-269.
- Rambay Mónica. (2010). *Utilidad del antígeno carcinoembrionario en el diagnóstico y seguimiento de los adenocarcinomas gástrico y color rectal en los pacientes del instituto del cáncer, solca, cuenca. periodo 1994 – 2009*. Enero 13, 2015, de Universidad de Cuenca Sitio web: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3464/1/MED05.pdf>
- Ruiz J. (2010). *Acetogeninas Annonaceas de Annona Squamosa procedente de Brasil*. Febrero 8, 2015, de Universidad Nacional de Tucumán Sitio web: <http://aqa.org.ar/pdf101/cd/Qca.Organica/3-086.pdf>

- Rodilla F. (2015). *Mecanismos de acción antitumoral*. Julio 29, 2015, de Servicio de Farmacia. Hospital General "Obispo Polanco" de Teruel Sitio web: [http://www.boloncol.com/index2.php?option=com\\_content&do\\_pdf=1&id=26.html](http://www.boloncol.com/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=26.html)
- Salazar I. (2014). *Fitofármacos*. Noviembre 14, 2105, de Scribd Sitio web: <http://es.scribd.com/doc/226522196/FITOFARMACOS#scribd>
- Sociedad de Lucha contra el Cáncer, Registro Hospitalaria 2014, Solca Loja.
- Sociedad de Lucha contra el Cáncer, Registro de Tumores Loja.
- Soto M. (2013). *Metabolitos secundarios y ruta de ácido shikimico*. Febrero 8, 2015, de Universidad Nacional de Trujillo Sitio web: <http://es.slideshare.net/maryluz/clase-de-metabolitos-secundarios-y-ruta-de-acido-shikimico-por-qf-maril-roxana-soto-vsquez>
- Vanhove W. (2008). *Descriptores para Chirimoyo*. Málaga, España: Bioersivity International.

## 11. ANEXOS

**ANEXO 1.-** Oficio que permita ser parte del presente proyecto de Investigación.



EVALUACION DEL EFECTO INMUNOESTIMULANTE DEL EXTRACTO DE  
*AMARANTHUS HYBRIDUS L.* Y SUS COMPONENTES EN LA ACTIVACION DE  
CÉLULAS LINFOIDES

Loja, 28 de mayo de 2015

Doctor.

Miguel Marín Gómez, Mg. Sc,

**DIRECTOR DEL LABORATORIO DE CULTIVO CELULAR**

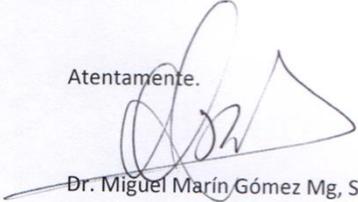
A petición verbal de la interesada:

CERTIFICO:

Que la Srta. **Jéssica Yajaira Peralta Armijos**, estudiante del **VIII MÓDULO** de la Carrera de **LABORATORIO CLÍNICO**, con cédula de identidad 1105226623 fue aceptada como parte del grupo de estudiantes para que participe en la realización del proyecto "**Evaluar el efecto citotóxico de las hojas de *Annona cherimola* en líneas celulares cancerígenas**", el mismo que forma parte del trabajo final de investigación que debe realizar el estudiante previo a la obtención del título de Licenciada en Laboratorio Clínico.

Es cuanto puedo certificar y autorizo a la estudiante hacer uso de este certificado en sus trámites respectivos.

Atentamente.

  
Dr. Miguel Marín Gómez Mg. Sc.

**DIRECTOR DEL PROYECTO**

## ANEXO 2.- Adquisición de líneas celulares ATCC.

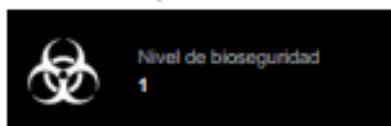
Multilizer PDF Translator Free version - translation is limited to ~ 3 pages per translation.



Hoja de producto

**RKO (ATCC®CRL2577)™**

Por favor lea esto primero



Uso previsto

Este producto está diseñado únicamente con fines de investigación, destinados a cualquier animal o humano terapéutico o uso diagnóstico.

Medio de cultivo completo

El medio de base de esta línea celular es ATCC Formulated Medio esencial mínimo de Eagle, catálogo N° 30 2003. Para preparar el medio de crecimiento completo, añada los siguientes componentes al medio base: bovino fetal suero hasta una concentración final de 10%.

Citación de cepa

Si el uso de esta cultura los resultados en una publicación científica deben ser citados en ese manuscrito en el siguiente manera: RKO (ATCC®CRL2577)™

<http://www.ATCC.org>

<mailto:Tech@ATCC.org>

American Type Culture Collection  
PO Box 1549  
Los Angeles, California, VA 20108  
[www.ATCC.org](http://www.ATCC.org)

800-438-6297 o al 703-365-2700  
Fax: 703-365-2750  
Como electrónico: [Tech@atcc.org](mailto:Tech@atcc.org)

### Descripción

Organismo: Homo sapiens, humano  
Tejido: Colón  
Enfermedad: Carcinoma  
Morfología: epiteliales  
Propiedades de crecimiento:  
Perfil de ADN:  
Amplificación: X  
CSF1PO: 8, 10  
D13S317: 8, 11  
D16S539: 12, 13  
D5S818: 11, 13  
D7S820: 8, 10  
THO1: 6, 10  
TPQ: 11  
SVA: 15, 16, 17

### Batch Specific Información

Consulte el certificado de análisis de resultados de la prueba de batch specific.

### PRECAUCIÓN DE SEGURIDAD

ATCC altamente recomienda que utilizar guantes y ropa de siempre y una máscara de rostro completo siempre ser puestas cuando manejo viales congelados. Es importante señalar que algunos frascos de fugas cuando sumergido en nitrógeno a poco a poco se llenará con nitrógeno líquido. Al descongelar, la conversión de nitrógeno líquido hacia su gas fase puede resultar en el vaso explote o que sopla su tapa con escombros voladores creando fuerza peligrosos.

### Desembalaje y almacenamiento

1. Revise todos los contenedores para la fuga o rotura. Después de recibir las células congeladas del hielo seco embalaje y coloque inmediatamente las células a una temperatura inferior a 130° C, preferiblemente en vapores de nitrógeno líquido, hasta que esté listo para su uso.

### Procedimiento de manipulación de las células

Para asegurar el más alto nivel de viabilidad, descongelar el vial e iniciar la cultura tan pronto como sea posible tras la recepción. Si a la llegada, almacenamiento de la cultura congelada es necesario, deben guardarse en la fase de vapor de nitrógeno líquido y no a 70° C. Almacenamiento a 70° C dará lugar a la pérdida de viabilidad.

1. descongelar el frasco por agitación suave en un baño de agua de 37° C. Para reducir la posibilidad de contaminación la junta tórica y la tapa fuera del agua. Descongelación debe ser rápida (aproximadamente 2 minutos)
2. Retire el frasco del baño tan pronto como el contenido es descongelado y descontaminación por sumergir o rociar con etanol al 70%. Todas las operaciones desde este punto deberán realizarse bajo condiciones asépticas estrictas.
3. transferir el contenido del vial a un tubo de centrifuga que contenía 9,0 mL medio de cultivo completo y vuelta a aproximadamente 125 x g durante 5 a 7 minutos.
4. Resuspender el sedimento celulares con medio completo recomendado (vea la información de lote específico para la cultura recomienda la relación de dilución) y dispensar en un 25 cm o un frasco de cultivo de 75 cm. Es importante evitar la excesiva alcalinidad del medio durante la recuperación de las células. Se sugiere antes de la incorporación de los contenidos del frasco, la nave de cultura que contiene el medio de cultivo colocado en la incubadora durante al menos 15 minutos para permitir que el medio llegar a su pH normal.
5. Incubar el cultivo a 37° C en una incubadora adecuada. Un 5% de co en atmósfera de aire se recomienda si usando el medio descrito en esta hoja de producto.

### Procedimiento manejo de frasco culturas

El frasco fue sembrado con las células (ver información del lote específico), crecido y completamente lleno de ATCC para evitar la pérdida de las células durante el transporte.

1. una vez recibida, examine visualmente la cultura evidencia macroscópica de cualquier contaminación microbiana.



Hoja de producto

**RKO (ATCC®CRL2577)™**

Por favor lea esto primero



Uso previsto

Este producto está diseñado únicamente con fines de investigación, destinados a cualquier animal o humano terapéutico o uso diagnóstico.

Medio de cultivo completo

El medio de base de esta línea celular es ATCC Formulated Medio esencial mínimo de Eagle, catálogo N° 30 2003, para preparar el medio de crecimiento completo, añadir los siguientes componentes al medio base: bovino fetal suero hasta una concentración final de 10%.

Citación de cepa

Si el uso de esta cultura los resultados en una publicación científica deben ser citados en ese manuscrito en el siguiente manera: RKO (ATCC®CRL2577)™

<http://www.ATCC.org>

<mailto:Tech@ATCC.org>

American Type Culture Collection  
PO Box 1549  
Lee, E.A., VA 20108  
[www.ATCC.org](http://www.ATCC.org)

800-438-6297 o al 703-365-2700  
Fax: 703-365-2750  
Correo electrónico: [Tech@atcc.org](mailto:Tech@atcc.org)

O póngase en contacto con su distribuidor local

Página 2 de 3

- en la parte inferior del matraz: durante el envío de las culturas a veces se manejan aproximadamente y muchas de las células a menudo separan y ser suspendidos en el medio de cultivo (pero son todavía v
- Si todavía se unen las células: Extraiga de forma aseptica todo pero 5 a 10 mL del medio de transporte medio de envío se puede guardar para su reutilización. Incube las células a 37°C en un 5% CO en atmósfera de hasta que estén listos para ser subcultivado.
- Si no se unen las células, asepticamente remueva todo el contenido del matraz y centrifugar a 125 x g durante 5 a 10 minutos. Retire el medio de envío y guardar. Resuspender las células sediment mL de este medio y añadir al matraz de 25 cm. Incubar a 37°C un 5% de CO en atmósfera de aire hasta las células están listos para ser subcultivado.



Procedimiento de subcultivo

Volumenes utilizados en el presente Protocolo están para frasco de 75 cm; proporcionalmente reducir o aumentar la ca medio para recipientes de cultivo de otros tamaños.

- Retire y deseche el medio de cultivo.
- Enjuague la capa de células con 0,25% (w/v) Trypsin0.53% (w/v) EDTA solución para eliminar los restos del suero que contiene el inhibidor de la tripsina.
- Agregue 2.0 a 3.0 mL de solución de TrypsinEDTA al frasco y observar las células bajo un microscopio invertido (hasta que capa de la célula se dispersa (generalmente dentro de 5 a 15 minutos).  
Nota: Para evitar la aglutinación no agitar las células golpeando o sacudiendo el frasco mientras se es células para separar. Las células que son difíciles de separar pueden colocarse a 37°C para facilitar la
- Añadir 6.0 a 8.0 mL de medio de cultivo completo y aspirar las células mediante pipeteo suave.
- Añadir alícuotas apropiadas de la suspensión de células a los buques nuevos de cultura.
- incubar los cultivos a 37°C

Cociente de la subcultivo

Renovación media Cada 2 a 3 días.

Nota: Para obtener más información sobre disociación enzimática y subcultivos de líneas celulares consultar ca Cultivo de células animales, un manual de técnica básica R. Ian Freshney, tercera edición, publicado po R. Liss, Nueva York, 1994



Comentarios

RKO células contienen p53 de tipo salvaje pero carecen del receptor tiroideo humano endógeno del receptor r El nivel de proteína p53 es mayor en las células RKO (ATCC CRL2577) que en RKOE6 las células (ATCC CRL2 La línea celular RKO es la línea celular parental (isogénicas) de RKOE6 (ATCC CRL2578) y RKO45451 (ATCC CRL2579).



Referencias

Referencias y otra información relacionada con este producto están disponibles online en [www.atcc.org](http://www.atcc.org).



Bioseguridad nivel: 1

Procedimientos de seguridad adecuados deben utilizarse siempre con este material. Seguridad en el laboral la publicación actual de la Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos los Estados Unidos Departamento de salud y servicios humanos centros para el Control de enfermedades y prevención y los institut para la salud.

ATCC garantía

La viabilidad de los productos de la ATCC es una garantía de 30 días desde la fecha de envío y es válida sólo si la producto es almacenado y cultivada según la información contenida en esta hoja de información del producto. listas de la formulación de los medios de comunicación que se ha encontrado para ser eficaz para esta cepa. También puede producir resultados satisfactorios, un cambio en los medios de comunicación o la ausencia de medios recomendados pueden afectar la recuperación, crecimiento y función de esta cepa. Si un medio altern se usa, ya no es válida la garantía de la ATCC para viabilidad.

Descargos de responsabilidad

Este producto está diseñado para propósitos de investigación de laboratorio solamente. No está diseñado par Mientras que ATCC utiliza esfuerzos razonables para incluir precisa y actualizada información en esta hoja de ATCC no hace ninguna garantía o representación en cuanto a su exactitud. Citas de literatura científica y



Hoja de producto

**RKO (ATCC®CRL2577)™**

las patentes se proporcionan para propósitos informativos solamente. ATCC no garantiza que dicha información confirmada para ser exactos.

Este producto se envía con la condición de que usted es responsable de su almacenamiento seguro, manipulación no es responsable por daños o lesiones derivados de recibir y/o uso de este producto. Mientras que el esfuerzo es hecho para asegurar la autenticidad y fiabilidad de las cepas en depósito, ATCC no es responsable por daños por identificación errónea o la tergiversación de las culturas.

Consulte el adjunto Material Transfer Agreement (MTA) para más detalles sobre el uso de este producto. El MTA también está disponible en nuestro sitio Web en [www.atcc.org](http://www.atcc.org)

Información adicional sobre esta cultura está disponible en el sitio web ATCC [www.atcc.org](http://www.atcc.org).

© 2013 ATCC. Todos los derechos reservados. ATCC es una marca registrada de la American Type Culture Collection. [06/06]

Por favor lea esto primero



Uso previsto

Este producto está diseñado únicamente con fines de investigación. <sup>1</sup> destinados a cualquier animal o humano terapéutico o uso diagnóstico.

Medio de cultivo completo

El medio de base de esta línea celular es ATCC formulated Medio esencial mínimo de Eagle, catálogo Nº 30 2003, para preparar el medio de crecimiento completo, añadir el siguientes componentes al medio base: bovino fetal suero hasta una concentración final de 10%.

Citación de cepa

Si el uso de esta cultura los resultados en una publicación científica, <sup>1</sup> deben ser citados en ese manuscrito en el siguiente manera: RKO (ATCC®CRL2577)™

<http://www.ATCC.org>

<mailto:Tech@ATCC.org>

American Type Culture Collection  
PO Box 1549  
Los E.U.A. Manassas, VA 20108  
[www.ATCC.org](http://www.ATCC.org)

800-638-6597 o al 703-365-2700  
Fax: 703-365-2750  
Correo electrónico: [Tech@atcc.org](mailto:Tech@atcc.org)

O póngase en contacto con su distribuidor local

### **ANEXO 3.- Medio de congelación.**

#### **MEDIO DE CONGELACIÓN**

- En un matraz colocar 4 ml de medio RPMI completo
- 5 ml de suero bovino fetal
- 1 ml de DMSO

## **ANEXO 4.- Criocongelación.**

### **CRIOCONGELACIÓN**

- Realizar el conteo de la línea celular que se va a criogenizar.
- Del soporte tomar 500 ul de células y agregar 500 ul de medio de cultivo de congelación
- Rotular cada criovial y colocarlo en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$
- A las 24 horas colocar los crioviales en el tanque de nitrógeno líquido, indicando con claridad los cuales van a ser ubicados en cada canastilla.
- Todos los días revisar si la cantidad de nitrógeno líquido está en la cantidad correcta.

## **ANEXO 5.- Descongelación celular.**

### **DESCONGELACIÓN CELULAR**

- Encender cabina de bioseguridad y esterilizar 15 minutos antes de usar, de igual manera el baño maría a 37°C
- Tener listo el medio de cultivo RPMI completo e incompleto, el tubo falcón
- Extraer del tanque de nitrógeno líquido el criovial que deseemos con la cantidad conocidas de cel/ml.
- Incubar durante 1 minuto el criovial a 37°C hasta q esté descongelado. Evitar que las células permanezcan demasiado tiempo descongeladas.
- Añadir las células descongeladas rápidamente a un tubo Falcón y añadir 10 ml de medio de cultivo completo para así diluir el DMSO y disminuir su toxicidad.
- Centrifugar el Falcón a 800 rpm durante 3 minutos para obtener el pellet de células en el fondo.
- Eliminar el sobrenadante con una pipeta Pasteur y dejar el pellet de células.
- Resuspender el pellet de células en 4 ml de medio cultivo completo en el caso de criovilaes con  $1.5 \times 10^6$  cel/ml y pipetear suavemente para homogenizar la suspensión.
- Pasar el contenido del tubo a una botella de cultivo el cual ya contiene 8ml de medio de cultivo completo y mezclar suavemente.
- Incubar a 37°C al 5% de CO<sub>2</sub>.
- Cambiar el medio de cultivo al día siguiente para eliminar posibles restos de DMSO y células muertas.

**ANEXO 6.-** Preparación de extracto acuoso de las hojas de *Annona cherimola* en diferentes concentraciones.

### **PREPARACIÓN DE EXTRACTOS EN DIFERENTES CONCENTRACIONES**

#### **EXTRACTO ACUOSO**

**Solución concentrada (Extracto 1):** Pesar 1 mg de extracto y disolver en 1 ml de medio de cultivo completo.

**Solución de extracto 2 (1:10):** Tomar 100 ul de la solución 1 de extracto y agregar 900 ul del medio de cultivo completo.

**Solución de Extracto 3 (1:50):** Tomar 20 ul de la solución de extracto 1 y agregar 980 ul de medio de cultivo completo.

## **ANEXO 7.- Preparación de medios de cultivo RPMI.**

### **PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO RPMI COMPLETO PARA pH Neutro**

1. Atemperar medio de cultivo RPMI incompleto, Suero bovino fetal, penicilina/estreptomicina y anfotericina B.
2. En un matraz colocar 5 ml de suero bovino fetal
3. 0,5 ml de penicilina
4. 0,5 de anfotericina B
5. 44 ml de RPMI incompleto
6. Medir el pH con la ayuda del pHmetro, el cual debe estar en 7,2 a 7,4
7. Mezclar bien y guardar en refrigeración, rotulado.

**ANEXO 8.-** Preparación de controles positivos con el fármaco Fluorouracilo.

**FLUOROURACILO**

**Solución concentrada 1:** Se colocan directamente los 25 ul de fluoracilo ya preparado en concentración de 50 mg/50 ml

**Solución 2:** Mezclar 100 ul de la solución concentrada con 900 ul de medio de cultivo completo.

**Solución 3:** Mezclar 20 ul de la solución concentrada con 980 ul de medio de cultivo completo.

## ANEXO 9.- Tripsinización de células RKO.

### **TRIPSINIZACION DE CÉLULAS A549 Y RKO**

1. Eliminar todo el contenido de medio de la botella
2. Agregar 5 ml de medio de cultivo incompleto, dejar unos minutos y sacar completamente
3. Agregar 2 ml de tripsina al 0,25%, especial para el cultivo, con esto las células comienzan a desprenderse.
4. Mantener moviendo dando golpes suaves a la botella, si no se sueltan las células se pueden incubar DE 2 a 3 minutos a 37°C.
5. Sueltas las células, agregar 10 ml de medio RPMI completo, sacar todo ese contenido a un tubo falcón y centrifugar 10 minutos a 1500 rpm.
6. Eliminar el sobrenadante, al fondo queda el pellet de células.
7. Resuspender este pellet de células con 2 ml de medio de cultivo RPMI completo
8. Contar las células con 20 ul de las mimas y 20 ul de azul de tripano.

**ANEXO 10.-** Colocación de células en los respectivos pocillos.

**LINEAS CELULARES (en el caso del extracto acuoso)**

- Una vez realizados los contajes de las líneas celulares en el caso del extracto acuoso no existe solvente para la disolución del extracto por lo tanto se necesitaron 10 500000 cel/pocillo resuspendidas en 500 ul de medio de cultivo
- Se coloca los 500 ul del medio con 500.000 células en cada uno y luego se añaden los extractos y medicamentos como controles positivos en diferentes concentraciones

Se procede a incubar las placas de cultivo en la incubadora de CO<sub>2</sub> al 5% y con humedad del 98%.

**ANEXO 11.-** Viabilidad celular con la técnica de coloración de azul de tripano.

**CONTAJE DE CÉLULAS CON AZUL DE TRIPANO (VIABILIDAD CELULAR)**

1. Se realiza el conteo de las células tanto muertas como vivas para evaluar así de esta manera la viabilidad y citotoxicidad celular.
2. En placas de cultivo de 96 pocillos se colocan 20  $\mu$ l de cada una de las células con los extractos en las diferentes concentraciones, los medicamentos antitumorales, los linfocitos humanos y los controles negativos.
3. Se deben extraer dichas células de manera mecánica frotando los pocillos donde se encuentran incubadas ya que estas células son adherentes y tienden a pegarse al fondo
4. A cada pocillo cargado con células colocar 20  $\mu$ l de azul de tripano y cargar en la cámara de Neubauer para su conteo.
5. Se deben contar los cuatro cuadrantes externos de las esquinas y el valor final se lo multiplica por 10, por 1000 y por 2.

Se realiza el mismo procedimiento a las seis horas de su incubación, 12, 24, 48, 60 y 72 horas.

**ANEXO 12.-** Proliferación celular basándose en la confluencia de las células.

**PROLIFERACIÓN CELULAR**

1. Las células que fueron incubadas con los diferentes extractos y medicamentos concentrados y diluidos se observaron a las 6, 36 y 72 horas de incubación en el microscopio invertido observando la elongación y crecimiento de las mismas.
2. Posteriormente se contaron las células vivas en la cámara de Neubauer que presentaban la forma típica de elongación, la misma que representa la confluencia.
3. De las células vivas contadas se calculó el porcentaje de confluencia para evaluar el grado de proliferación.
4. Realizamos los cálculos siguientes:

$$\text{Proliferación} = \text{número de células elongadas} * 100 / \text{total de células vivas.}$$

**ANEXO 13.-** Cálculos para la determinación de proliferación celular basado en la confluencia.

ENSAYO DE: *Extracto acuoso de hojas de Annona cherimola frente células RKO en medio con pH neutro*  
 FECHA: *11/05/2015* HORA: *18H00* RESPONSABLE: *Carmen Pineda*

6 HORAS

RKO + EXTRACTO 1	RKO + EXTRACTO 2	RKO + EXTRACTO 3	RKO + FLUOROURACILO 1	RKO + FLUOROURACILO 2	RKO + FLUOROURACILO 3
V 66 = 100% C 0 = 0%	V 90 = 100% C 0 = 0%	V 71 = 100% C 0 = 0%	V 66 = 100% C 0 = 0%	V 72 = 100% C 0 = 0%	V 88 = 100% C 0 = 0%
LH + EXTRACTO 1	LH + EXTRACTO 2	LH + EXTRACTO 3	RKO + MC		
<hr/>			V 81 = 100% C 0 = 0%		

36 HORAS

RKO + EXTRACTO 1	RKO + EXTRACTO 2	RKO + EXTRACTO 3	RKO + FLUOROURACILO 1	RKO + FLUOROURACILO 2	RKO + FLUOROURACILO 3
V 84 = 100% C 70 = 83,2%	V 60 = 100% C 50 = 83,4%	V 52 = 100% C 38 = 74,3%	V 52 = 100% C 33 = 63,5%	V 44 = 100% C 27 = 61,2%	V 45 = 100% C 28 = 62,5%
LH + EXTRACTO 1	LH + EXTRACTO 2	LH + EXTRACTO 3	RKO + MC		
<hr/>			V 59 = 100% C 45 = 76,7%		

72 HORAS

RKO + EXTRACTO 1	RKO + EXTRACTO 2	RKO + EXTRACTO 3	RKO + FLUOROURACILO 1	RKO + FLUOROURACILO 2	RKO + FLUOROURACILO 3
V 22 = 100%	V 28 = 100%	V 32 = 100%	V 16 = 100%	V 25 = 100%	V 26 = 100%
C 8. = 36,7%	C 13 = 48,3%	C 18 = 56,2%	C 5 = 31,4%	C 9 = 36,3%	C 12 = 46,5%
LH + EXTRACTO 1	LH + EXTRACTO 2	LH + EXTRACTO 3	RKO + MC		
<hr/>			V 42 = 100%		
			C 28 = 66,7%		

### ANEXO 14.- Cálculos de muerte celular.

EXTRACTO ACUOSO

ENSAYO DE: NOVA DE ALBONA CEEPIVA FRENTE A CÉLULAS RKO EN MEDIO BI DEUTRO.

FECHA: 11-05-2015 HORA: 18:00 RESPONSABLE: Cemei Pardo

6 HORAS		11,6%	7,5%	10,5%	16,1%	17,5%	10,1%
RKO+EXTRACTO 1	RKO+EXTRACTO 2	RKO+EXTRACTO 3	RKO+FLUORACILO 1	RKO+FLUORACILO 2	RKO+FLUORACILO 3		
V 56 = 91,7% H 56 = 6,3%	V 70 = 91,9% H 58 = 8,1%	V 72 = 85,6% H 40 = 14,4%	V 56 = 86,9% H 40 = 13,1%	V 72 = 85,8% H 12 = 14,2%	V 88 = 91,7% H 8 = 8,3%		
V 77 = 87,7% H 10 = 12,3%	V 70 = 92,8% H 6 = 7,2%	V 76 = 88,4% H 10 = 11,6%	V 55 = 78,6% H 15 = 21,4%	V 70 = 83,4% H 14 = 16,6%	V 78 = 88,7% H 10 = 11,3%		
V 54 = 85,8% H 14 = 14,2%	V 80 = 92,8% H 7 = 7,2%	V 85 = 94,5% H 5 = 5,5%	V 51 = 86,2% H 13 = 13,8%	V 61 = 78,3% H 17 = 21,7%	V 51 = 89,3% H 11 = 10,7%		
LH+EXTRACTO 1	LH+EXTRACTO 2	LH+EXTRACTO 3	RKO+25 ul SOLVENTE	RKO CON MC			
V 58 = 98,4% H 7 = 1,6%	V 54 = 96,5% H 2 = 3,5%	V 62 = 100% H 0 = 0%		V 60 = 87,4% H 10 = 12,6%			
V 36 = 97,1% H 2 = 2,9%	V 58 = 98,4% H 1 = 1,6%	V 70 = 98,6% H 1 = 1,4%		V 81 = 92,1% H 1 = 7,9%			
V 61 = 95,6% H 4 = 4,4%	V 54 = 98,5% H 1 = 1,5%	V 64 = 100% H 0 = 0%		V 76 = 91,6% H 3 = 8,4%			
↓ 2,9%	↓ 2,2%	↓ 0,4%		↓ 4,6%			

Células 17340 000 cel  
948

12 HORAS		9,5%	14%	12%	17,9%	18,6%	15,7%
RKO+EXTRACTO 1	RKO+EXTRACTO 2	RKO+EXTRACTO 3	RKO+FLUORACILO 1	RKO+FLUORACILO 2	RKO+FLUORACILO 3		
V 60 = 91% H 9 = 9%	V 56 = 87,5% H 8 = 12,5%	V 70 = 88,3% H 10 = 11,7%	V 56 = 84,9% H 10 = 15,1%	V 60 = 84,6% H 11 = 15,4%	V 81 = 84,4% H 15 = 15,6%		
V 60 = 93,3% H 7 = 6,7%	V 70 = 85,4% H 12 = 14,6%	V 58 = 89,3% H 7 = 10,7%	V 50 = 86,3% H 8 = 13,7%	V 58 = 81,7% H 22 = 18,3%	V 50 = 87,8% H 7 = 12,2%		
V 55 = 87,2% H 11 = 12,8%	V 74 = 85,1% H 13 = 14,9%	V 57 = 86,4% H 9 = 13,6%	V 48 = 75% H 16 = 25%	V 56 = 77,8% H 16 = 22,2%	V 54 = 80,6% H 13 = 19,4%		
LH+EXTRACTO 1	LH+EXTRACTO 2	LH+EXTRACTO 3	RKO+25 ul SOLVENTE	RKO CON MC			
V 66 = 94,3% H 4 = 5,7%	V 75 = 97,5% H 8 = 2,5%	V 83 = 94,8% H 3 = 5,2%		V 50 = 99,8% H 6 = 9,2%			
V 85 = 96,8% H 3 = 3,2%	V 72 = 96% H 3 = 4%	V 10 = 94,1% H 7 = 5,9%		V 90 = 91,0% H 9 = 9,0%			
V 50 = 95,8% H 4 = 4,2%	V 54 = 98,8% H 1 = 1,2%	V 58 = 97,8% H 2 = 2,2%		V 56 = 93,4% H 4 = 6,6%			
↓ 4,3%	↓ 2,5%	↓ 3,7%		↓ 8,2%			

24 HORAS

RKO+EXTRACTO 1	RKO+EXTRACTO 2	RKO+EXTRACTO 3	RKO+FLUORACILO 1	RKO+FLUORACILO 2	RKO+FLUORACILO 3
$\uparrow$ 15,1% V 75 = 88,3% F 10 = 11,7%	$\uparrow$ 15,4% V 60 = 88,3% F 8 = 11,7%	$\uparrow$ 14,1% V 55 = 88,1% F 3 = 11,9%	$\uparrow$ 17,6% V 68 = 85% F 12 = 15%	$\uparrow$ 18,5% V 42 = 82,8% F 10 = 17,2%	$\uparrow$ 18,2% V 52 = 83,9% F 10 = 16,1%
V 50 = 82,0% F 11 = 18,0%	V 60 = 86,2% F 10 = 13,8%	V 58 = 79,5% F 15 = 20,5%	V 86 = 82,7% F 18 = 17,3%	V 55 = 82,1% F 14 = 17,9%	V 40 = 81,7% F 14 = 18,3%
V 70 = 84,3% F 14 = 15,7%	V 57 = 79,2% F 15 = 20,8%	V 81 = 90% F 9 = 10%	V 85 = 79,5% F 22 = 20,5%	V 50 = 79,4% F 15 = 20,6%	V 47 = 79,7% F 11 = 20,3%
LH+EXTRACTO 1	LH+EXTRACTO 2	LH+EXTRACTO 3	RKO+25 ul SOLVENTE	RKO CON MC	
V 37 = 95,7% F 4 = 4,3%	V 92 = 96,5% F 3 = 3,5%	V 54 = 94,4% F 5 = 5,6%		V 42 = 92,4% F 4 = 7,6%	
V 55 = 95,1% F 3 = 4,9%	V 77 = 97,5% F 2 = 2,5%	V 96 = 95,6% F 4 = 4,4%		V 26 = 74,3% F 3 = 25,7%	
V 35 = 90,7% F 8 = 9,3%	V 65 = 98,6% F 1 = 1,4%	V 70 = 94,6% F 4 = 5,4%		V 40 = 83,4% F 8 = 16,6%	
$\downarrow$ 6,1%	$\downarrow$ 2,4%	$\downarrow$ 5,1%		$\downarrow$ 16,6%	

36 HORAS

RKO+EXTRACTO 1	RKO+EXTRACTO 2	RKO+EXTRACTO 3	RKO+FLUORACILO 1	RKO+FLUORACILO 2	RKO+FLUORACILO 3
$\uparrow$ 17,4% V 24 = 83,2% F 17 = 16,8%	$\uparrow$ 16,9% V 60 = 83,4% F 12 = 16,6%	$\uparrow$ 24% V 52 = 74,3% F 16 = 25,7%	$\uparrow$ 34,2% V 52 = 63,5% F 30 = 36,5%	$\uparrow$ 35% V 44 = 61,2% F 28 = 38,8%	$\uparrow$ 35,7% V 45 = 62,5% F 27 = 37,5%
V 85 = 84,5% F 15 = 15,5%	V 73 = 83% F 15 = 17%	V 51 = 77,3% F 15 = 22,7%	V 56 = 65,2% F 30 = 34,8%	V 51 = 66,3% F 26 = 33,7%	V 48 = 62,4% F 25 = 37,6%
V 56 = 80% F 14 = 20%	V 62 = 82,7% F 13 = 17,3%	V 48 = 76,2% F 12 = 23,8%	V 50 = 68,5% F 23 = 31,5%	V 41 = 67,3% F 20 = 32,7%	V 42 = 67,8% F 20 = 32,2%
LH+EXTRACTO 1	LH+EXTRACTO 2	LH+EXTRACTO 3	RKO+25 ul SOLVENTE	RKO CON MC	
V 40 = 74,1% F 14 = 25,9%	V 58 = 94,7% F 5 = 5,3%	V 86 = 94,6% F 5 = 5,4%		V 59 = 76,7% F 18 = 23,3%	
V 85 = 86,7% F 10 = 13,3%	V 53 = 96,6% F 3 = 3,4%	V 85 = 94,1% F 6 = 5,9%		V 45 = 78,7% F 13 = 21,3%	
V 66 = 89,2% F 6 = 10,8%	V 89 = 89,2% F 10 = 10,8%	V 90 = 93,8% F 6 = 6,2%		V 45 = 73,8% F 16 = 26,2%	
$\downarrow$ 16,6%	$\downarrow$ 6,5%	$\downarrow$ 5,8%		$\downarrow$ 23,6%	

48 HORAS

45,5%		37,6%		47,7%		42,8%		41,5%		40,0%	
RKO+EXTRACTO 1 V=28 = 60,6% M=25 = 37,4%	RKO+EXTRACTO 2 V=32 = 71,2% M=23 = 28,8%	RKO+EXTRACTO 3 V=18 = 54,6% M=25 = 45,4%	RKO+FLUORACILO 1 V=26 = 56,6% M=20 = 43,4%	RKO+FLUORACILO 2 V=30 = 58,9% M=21 = 41,1%	RKO+FLUORACILO 3 V=30 = 65,3% M=16 = 34,7%						
V=28 = 59,4% M=26 = 40,6%	V=18 = 53,0% M=16 = 47,0%	V=25 = 55,6% M=20 = 44,4%	V=37 = 48,1% M=40 = 51,9%	V=35 = 53,9% M=30 = 46,1%	V=25 = 55,6% M=20 = 44,4%						
V=20 = 43,5% M=26 = 56,5%	V=16 = 63% M=11 = 37%	V=20 = 46,6% M=23 = 53,4%	V=50 = 66,7% M=25 = 33,3%	V=40 = 62,5% M=21 = 37,5%	V=20 = 58,9% M=21 = 41,1%						
LH + EXTRACTO 1 V=61 = 86% M=10 = 14%	LH + EXTRACTO 2 V=55 = 87,4% M=8 = 12,6%	LH + EXTRACTO 3 V=81 = 94,2% M=5 = 5,8%	RKO+25 ul SOLVENTE	RKO CON MC							
V=86 = 86,9% M=5 = 13,1%	V=89 = 93,4% M=6 = 6,6%	V=68 = 93,2% M=5 = 6,8%		V=36 = 69,5% M=16 = 30,7%							
V=46 = 79,8% M=11 = 19,2%	V=57 = 85,3% M=11 = 14,7%	V=50 = 92,6% M=4 = 7,4%		V=32 = 65,4% M=17 = 34,6%							
↓ 15,4%	↓ 11,3%	↓ 6,6%		↓ 31,1%							

60 HORAS

61,1%		60,7%		46,2%		64%		59,8%		63,6%	
RKO+EXTRACTO 1 V=25 = 39,1% M=30 = 60,9%	RKO+EXTRACTO 2 V=22 = 41,8% M=39 = 58,2%	RKO+EXTRACTO 3 V=29 = 49,2% M=30 = 50,8%	RKO+FLUORACILO 1 V=15 = 28,4% M=38 = 71,6%	RKO+FLUORACILO 2 V=26 = 43,4% M=34 = 56,6%	RKO+FLUORACILO 3 V=21 = 38,2% M=34 = 61,8%						
V=28 = 38,4% M=45 = 61,6%	V=22 = 39,3% M=34 = 60,7%	V=22 = 54,3% M=27 = 45,7%	V=21 = 41,2% M=30 = 58,8%	V=24 = 40,7% M=38 = 59,3%	V=27 = 33,4% M=40 = 66,6%						
V=29 = 39,2% M=45 = 60,8%	V=19 = 36,6% M=33 = 63,4%	V=30 = 57,7% M=22 = 42,3%	V=23 = 38,4% M=37 = 61,6%	V=20 = 36,9% M=35 = 63,6%	V=21 = 37,5% M=35 = 62,5%						
LH + EXTRACTO 1 V=41 = 65,1% M=22 = 34,9%	LH + EXTRACTO 2 V=45 = 90% M=5 = 10%	LH + EXTRACTO 3 V=61 = 80,5% M=6 = 9,5%	RKO+25 ul SOLVENTE	RKO CON MC							
V=68 = 69,1% M=11 = 39,9%	V=48 = 82,8% M=10 = 17,2%	V=68 = 93,2% M=5 = 6,8%		V=42 = 68,9% M=19 = 31,1%							
V=50 = 75,8% M=16 = 24,2%	V=35 = 83,4% M=7 = 16,6%	V=54 = 87,1% M=8 = 12,9%		V=56 = 71,8% M=22 = 28,2%							
↓ 30%	↓ 14,6%	↓ 9,7%		↓ 28,7%							

72 HORAS

RKO + EXTRACTO 1		RKO + EXTRACTO 2		RKO + EXTRACTO 3		RKO + FLUORACILO 1		RKO + FLUORACILO 2		RKO + FLUORACILO 3	
↓ 22 = 36,7%	↑ 28 = 63,3%	↓ 28 = 48,3%	↑ 30 = 51,7%	↓ 32 = 56,2%	↑ 25 = 43,8%	↓ 16 = 31,4%	↑ 35 = 68,6%	↓ 25 = 36,3%	↑ 41 = 63,7%	↓ 26 = 46,5%	↑ 30 = 53,5%
↓ 25 = 38,5%	↑ 40 = 61,5%	↓ 25 = 37,7%	↑ 38 = 60,3%	↓ 38 = 52,4%	↑ 30 = 47,6%	↓ 20 = 32,3%	↑ 42 = 67,7%	↓ 20 = 31,8%	↑ 43 = 68,2%	↓ 28 = 44,2%	↑ 29 = 50,8%
↓ 26 = 42%	↑ 36 = 58,0%	↓ 31 = 47%	↑ 35 = 53%	↓ 28 = 60,4%	↑ 25 = 39,6%	↓ 25 = 37,9%	↑ 41 = 62,1%	↓ 19 = 29,3%	↑ 46 = 70,7%	↓ 24 = 46,2%	↑ 28 = 53,8%
LH + EXTRACTO 1		LH + EXTRACTO 2		LH + EXTRACTO 3		RKO + 25 ul SOLVENTE		RKO CON MC			
↓ 54 = 69,3%	↑ 24 = 30,7%	↓ 40 = 77%	↑ 12 = 23%	↓ 38 = 84,5%	↑ 7 = 15,5%	↓	↑	↓ 42 = 66,7%	↑ 21 = 33,3%		
↓ 55 = 73,4%	↑ 20 = 26,6%	↓ 68 = 87,2%	↑ 10 = 12,8%	↓ 55 = 86%	↑ 9 = 14%	↓	↑	↓ 38 = 67,9%	↑ 18 = 32,1%		
↓ 45 = 70,6%	↑ 20 = 29,4%	↓ 42 = 77,8%	↑ 12 = 22,2%	↓ 40 = 81,7%	↑ 9 = 18,3%	↓	↑	↓ 56 = 63,7%	↑ 32 = 36,3%		
↓ 28,9%		↓ 19,3%		↓ 15,9%				↓ 33,9%			

**ANEXO 15.- Análisis estadístico.**

**ACUOSO PH NEUTRO CELULAR RKO**

	RKO + EXTRACTO 1						
HORAS	6	12	24	36	48	60	72
REP 1	8.3	9	11.7	16.8	39.4	60.9	63.3
REP 2	12.3	6.7	18	15.5	40.6	61.6	61.5
REP 3	14.2	12.8	15.7	20	56.5	60.8	58
PROMEDIO	11.6	9.5	15.1	17.4	45.5	61.1	60.9
TOTAL	40.8	40.5	69.4	88.3	184.5	243.3	254.8

	RKO + EXTRACTO 2						
HORAS	6	12	24	36	48	60	72
REP 1	8.1	12.5	11.7	16.6	28.8	53.1	51.7
REP 2	7.2	14.6	13.8	17	47	51.8	60.3
REP 3	7.2	14.9	20.8	17.3	37	58.7	53
PROMEDIO	7.5	14.0	15.4	17.0	37.6	54.5	55.0
TOTAL	28.5	54	70.3	86.9	160.8	223.6	237

	RKO + EXTRACTO 3						
HORAS	6	12	24	36	48	60	72
REP 1	14.4	11.7	11.9	25.7	45.4	50.8	43.8
REP 2	11.6	10.7	20.5	22.7	44.4	45.7	47.6
REP 3	5.5	13.6	10	23.8	43.7	42.3	39.6
PROMEDIO	10.5	12.0	14.1	24.1	44.5	46.3	43.7

TOTAL	37.5	48	66.4	108.2	181.5	198.8	203
-------	------	----	------	-------	-------	-------	-----

	TESTIGO						
HORAS	6	12	24	36	48	60	72
REP 1	12.6	9.2	7.6	23.3	30.7	31.1	33.3
REP 2	7.9	9	25.7	21.3	34.6	28.2	32.1
REP 3	8.4	6.6	16.6	26.2	28	26.8	36.3
PROMEDIO	9.6	8.3	16.6	23.6	31.1	28.7	33.9
TOTAL	34.9	36.8	73.9	106.8	141.3	146.1	173.7

horas	extr1	extr2	extr3	Test
6	11.6	7.5	10.5	9.6
12	9.5	14.0	12.0	8.3
24	15.1	15.4	14.1	16.6
36	17.4	17.0	24.1	23.6
48	45.5	37.6	44.5	31.1
60	61.1	54.5	46.3	28.7
72	60.9	55.0	43.7	33.9

### ADEVA

VARIABLE DEPENDIENTE: valor

Factores de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F calculado	FT

Tratamiento	27	24989.16476	925.52462	53.83	1,72
Repetición	2	40.00500	20.00250	1.16	0.3201
Error experimental	54	928.46167	17.19373		
Error Total	83	25957.63143			
R cuadrado	Coeficiente de variación		Root MSE	Valor medio	
0.964232	15.09398		4.146533	27.47143	

De acuerdo al R- cuadrado se tiene un valor de 0.96, esto demuestra que la variabilidad de los datos con respecto a la media es muy cercana.

El coeficiente de variación en la presente investigación o estudio es de 15.09 nos permite determinar que su dispersión con respecto a la media es cercana.

#### DUNCAN

Alpha 0.05

Duncan	Media	N	tratamiento
A	61.100	3	rko_ext1_60
A	60.933	3	rko_ext1_72
A	55.000	3	rko_ext2_72
A	54.533	3	rko_ext2_60
B	46.267	3	rko_ext3_60
B	45.500	3	rko_ext1_48
C B	44.500	3	rko_ext3_48
C B	43.667	3	rko_ext3_72
C D	37.600	3	rko_ext2_48

E	D		33.900	3	test_72
E	D	F	31.100	3	test_48
E	G	F	28.700	3	test_60
H	G	F	24.067	3	rko_ext3_36
H	G		23.600	3	test_36
H	I		17.433	3	rko_ext1_36
H	I		16.967	3	rko_ext2_36
H	I		16.633	3	test_24
J	I		15.433	3	rko_ext2_24
J	I		15.133	3	rko_ext1_24
J	I		14.133	3	rko_ext3_24
J	I		14.000	3	rko_ext2_12
J	I		12.000	3	rko_ext3_12
J	I		11.600	3	rko_ext1_6
J	I		10.500	3	rko_ext3_6
J	I		9.633	3	test_6
J	I		9.500	3	rko_ext1_12
J			8.267	3	test_12
J			7.500	3	rko_ext2_6

Según la prueba de Duncan tenemos que el tratamiento rko\_ext1\_60; rko\_ext1\_72; rko\_ext2\_72; rko\_ext2\_60 no tienen diferencias significativas entre ellos pero si existe diferencia significativa con el tratamiento rko\_ext3\_60; rko\_ext1\_48; rko\_ext3\_48; rko\_ext3\_72.

Nota: los tratamientos que tienen la misma letra no tienen diferencia significativa pero si existe diferencia significativa con los tratamientos que tienen otra letra.

## T STUDENT

VARIABLE ANALISIS: diferente

Valor medio	TC	Tf
2.8714286	1.70	2,16

Con el fin de realizar comparaciones entre grupos de tratamientos se utilizó la prueba de T-student, según la prueba se observa que el valor es de 1.70 lo que demuestra que hay una diferencia significativa entre grupos.

## ANEXO 16.- Fotografías

### FASE PREANALÍTICA



Cultivos y subcultivos para mantenimiento de la línea RKO

### FASE ANALÍTICA



Células confluentes RKO



Cultivo de células RKO con extracto y medicamento



Pocillos con azul de tripano



Preparación para contaje de células



Contaje de células

## 12. ÍNDICE GENERAL

PORTADA.....	i
CERTIFICACIÓN.....	ii
AUTORÍA.....	iii
CARTA DE CERTIFICACIÓN DE TESIS.....	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTO.....	vi
1. TÍTULO.....	1
2. RESUMEN.....	2
SUMMARY.....	3
3. INTRODUCCIÓN.....	4
4. REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
4.1. Medicina Tradicional.....	6
4.2. Plantas medicinales.....	6
4.2.1. Importancia de las plantas medicinales.....	6
4.2.2. Fitofármacos.....	7
4.3. Conceptualización de <i>Annona cherimola</i> .....	7
4.3.1. Taxonomía y morfología.....	7
4.3.2. Origen.....	8
4.3.3. Usos y beneficios.....	8
4.3.4. Composición química de las hojas de <i>Annona cherimola</i> .....	9
4.3.4.1. Metabolitos.....	9
4.3.4.1.1. Metabolitos secundarios.....	10

4.4. Definición de extractos.....	12
4.4.1. Definición de extracto Acuoso.....	12
4.4.2. Método de obtención de extracto Acuoso.....	12
4.4.2.1. Procedimiento.....	12
4.5. Definición de cultivo Celular .....	13
4.5.1. Tipos de cultivo celular.....	13
4.5.1.1. Cultivos primarios.....	13
4.5.1.2. Cultivos secundarios.....	13
4.5.1.3. Líneas celulares.....	14
4.5.2. Tipos de crecimiento celular.....	14
4.5.2.1. Células adherentes o cultivos fijos.....	14
4.5.2.2. Células no adherentes o cultivos en suspensión.....	14
4.6. Factores Básicos para la supervivencia celular.....	14
4.7. Viabilidad celular.....	15
4.8. Proliferación celular.....	15
4.9. Terapia farmacológica para el cáncer.....	16
4.9.1. Fármacos antimetabolitos.....	17
4.9.1.1. Análogos de las bases pirimidínicas.....	17
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
6. RESULTADOS.....	21
7. DISCUSIÓN.....	25
8. CONCLUSIONES.....	28
9. RECOMENDACIONES.....	29
10. BIBLIOGRAFÍA.....	30
11. ANEXOS.....	35

11.1.	ANEXO 1.- Oficio que permita ser parte del presente proyecto de Investigación. ....	35
11.2.	ANEXO 2.- Adquisición de líneas celulares ATCC.....	36
11.3.	ANEXO 3.- Medio de congelación.....	39
11.4.	ANEXO 4.- Criocongelación.....	40
11.5.	ANEXO 5.- Descongelación celular.....	41
11.6.	ANEXO 6.- Preparación de extracto acuoso de las hojas de <i>Annona cherimola</i> en diferentes concentraciones.....	42
11.7.	ANEXO 7.- Preparación de medios de cultivo RPMI.....	43
11.8.	ANEXO 8.- Preparación de controles positivos con el fármaco Fluorouracilo en diferentes concentraciones.....	44
11.9.	ANEXO 9.- Tripsinización de células RKO.....	45
11.10.	ANEXO 10.- Colocación de células en los respectivos pocillos.....	46
11.11.	ANEXO 11.- Viabilidad celular con la técnica de coloración de azul de tripano.....	47
11.12.	ANEXO 12.- Proliferación celular basándose en la confluencia de las células.....	48
11.13.	ANEXO 13.- Cálculos para la determinación de proliferación celular basado en la confluencia.....	49
11.14.	ANEXO 14.- Cálculos de muerte celular.....	51
11.15.	ANEXO 15.- Análisis estadístico.....	55
11.16.	ANEXO 16.- Fotografías.....	60
12.	ÍNDICE GENERAL.....	62