



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

ÁREA DE LA SALUD HUMANA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

TÍTULO:

“EFECTO CITOTÓXICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE
ANNONA CHERIMOLA EN UNA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE
PULMÓN HUMANO EN MEDIO DE CULTIVO CON pH ÁCIDO”

TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN
DEL TÍTULO DE LICENCIADA EN
LABORATORIO CLÍNICO

AUTORA

Karla del Cisne Durán Hernández

1859

DIRECTORA

Dra. Paola Mercedes Benítez Castrillón, Mg.Sc

LOJA – ECUADOR

2016

CERTIFICACIÓN

Doctora

Paola Mercedes Benítez Castrillón, Mg. Sc

DIRECTORA DE TESIS

CERTIFICO:

Que el trabajo de investigación titulado “EFECTO CITOTÓXICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *ANNONA CHERIMOLA* EN UNA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE PULMÓN HUMANO EN MEDIO DE CULTIVO CON pH ÁCIDO” elaborado por la Srta. Durán Hernández Karla del Cisne ha sido revisado y se ajusta a los requisitos legales exigidos por la Carrera de Laboratorio Clínico del Área de la Salud Humana, por lo que autorizo su presentación.

Loja, 26 Diciembre del 2016



Dra. Paola Mercedes Benítez Castrillón, Mg. Sc

DIRECTORA DE TESIS

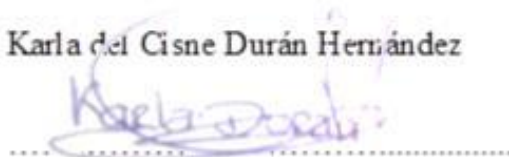
AUTORÍA

Yo, **Karla del Cisne Durán Hernández** declaro ser autora 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-Biblioteca virtual.

Autora: Karla del Cisne Durán Hernández

Firma:



Cédula: 1105146631

CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS POR PARTE DEL AUTOR, PARA LA CONSULTA, REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL, Y PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA DEL TEXTO COMPLETO

Yo, **Karla del Cisne Durán Hernández** declaro ser autora de la Tesis titulada:

“EFECTO CITOTÓXICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *ANNONA CHERIMOLA* EN UNA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE PULMÓN HUMANO EN MEDIO DE CULTIVO CON pH ÁCIDO”, como requisito para optar al grado de : Licenciada 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 de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional:

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el RDI, en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad.

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, a los 27 Días del mes de Enero del 2016, firma el autor

FIRMA:



AUTORA:

Karla del Cisne Durán Hernández

CÉDULA:

110514663-1

DIRECCIÓN:

Urb. La Samana Loja calle Mozart y Wagner

CORREO ELECTRÓNICO: karliss_1993@hotmail.com

TELÉFONO:

07-2-614-428

CELULAR:

0969223297

DATOS COMPLEMENTARIOS:

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Paola Mercedes Benitez Castrillón, Mg. Sc

TRIBUNAL DE GRADO:

Presidenta: Lcda. Glenda Alfarita Rodriguez León, Mg. Sc.

Vocal: Dra. Elsa Cumanda Ramirez Sanmartin, Mg, Sc.

Vocal: Dra. Diana del Roció Montaña Lavanda, Mg. Sc.

AGRADECIMIENTO

Me permito expresar mi gratitud a la Universidad Nacional de Loja, al Área de la Salud Humana, a la Carrera de Laboratorio Clínico, a sus Autoridades y a todos los docentes, por los valiosos conocimientos impartidos durante mi formación académica.

Un agradecimiento especial a la Dra. Paola Benítez Castrillón, director de tesis, por brindarme su total apoyo, orientación y enseñanzas.

Al centro de Investigaciones de la UNL, a todo el personal que apoyo mi trabajo de una forma desinteresada, por las facilidades brindadas para la recopilación de la información y por su continua colaboración en el presente trabajo investigativo.

La Autora

DEDICATORIA

Quiero dedicar el presente trabajo primeramente a Dios, quien nos dá la salud y fortaleza para cumplir cualquier meta propuesta.

A mis Padres, Hermana, amigos y demás familiares, que en cada momento siempre me han brindado su ayuda incondicional.

De manera especial a mi abuelita Fanny Sarmiento, que es mi apoyo permanente para llevar a cabo mis proyectos y metas propuestas, que siempre estuvo conmigo en cada sueño y ahora es una realidad, así como a mi mamá Silvia Hernández y a mi papá Carlos Durán y a mi hermana Valeria Durán que han sido mi pilar fundamental de esfuerzo y dedicación y siempre me han dado su mano para seguir adelante quiero dedicarles mi trabajo y con la bendición de mi bisabuelita seguiré proponiéndome nuevos retos.

Karla del Cisne

1. TÍTULO

**“EFECTO CITOTÓXICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS
DE *ANNONA CHERIMOLA* EN UNA LINEA CELULAR DE CÁNCER DE
PULMÓN HUMANO EN MEDIO DE CULTIVO CON pH ÁCIDO”**

2. RESUMEN

El cáncer de pulmón es un conjunto de enfermedades resultantes del crecimiento maligno de células del tracto respiratorio, en particular del tejido pulmonar, y uno de los tipos de cáncer más frecuentes a nivel mundial. El cáncer de pulmón suele originarse a partir de células epiteliales, y puede derivar en metástasis e infiltración a otros tejidos del cuerpo (Arias, J. 2000).

Hoy en día existen métodos naturales de gran importancia en el ámbito de la medicina como una opción alternativa y de apoyo para el tratamiento de ciertos cánceres utilizando el principio activo de muchas plantas que revelan resultados favorables. Al ser un problema de salud pública se consideró la necesidad de realizar el presente estudio denominado: “Efecto citotóxico del extracto etanólico de las hojas de *annona cherimola* en una línea celular de cáncer de pulmón humano en medio de cultivo con pH ácido” y tuvo como objetivos, determinar el grado de proliferación celular y medir la viabilidad celular en un cultivo con línea celular tumoral de pulmón A549 con el extracto etanólico con pH ácido de las hojas de *Annona cherimola* utilizando la técnica de proliferación celular , y viabilidad celular. El estudio de la presente investigación fue de tipo experimental – prospectiva; concluyendo que el 84% del extracto etanólico concentrado de las hojas de *annona cherimola* destruyó a las células cancerígenas en un lapso de 72 horas; y mostró una proliferación celular del 60.7% a las 36 horas y tuvo un declive significativo del 16.6% a las 72 horas.

Palabras claves: *cáncer de pulmón, proliferación celular, viabilidad celular*

RESUMEN / SUMMARY

Lung cancer is a malignant tumor that develops from lung and bronchial cells is uncontrolled growth of abnormal cells in the body that damage tissues and organs. Some of these agents, called carcinogenic substances such as nicotine in snuff act on the body and cause damage to the healthy cell. Being a health problem considering the need for this study called "Cytotoxic effect of ethanol extract of leaves *annonae cherimola* in a cell line of human lung cancer in culture medium with pH acid" and aims verify the cytotoxic activity of chloroform extract with acid pH leaves of *Annona cherimola* front lines of lung cancer in the Province of Loja.

The study of this research will be Experimental design - Prospective, and cell lung cancer line 549. The techniques used to identify the cytotoxic effect of the chloroform extract were cell proliferation and cell viability. And it was concluded that 84% of the concentrated extract killed cancer cells.

Keywords: *lung cancer cell lines, ethanol extract, proliferation, viability.*

3. INTRODUCCIÓN

El cáncer se origina cuando las células en alguna parte del cuerpo comienzan a crecer de manera descontrolada (Bailón, N. & Romero. 2014).

El cáncer de pulmón es el más frecuente del mundo, con aproximadamente 1.400.000 nuevos casos al año a nivel mundial, siendo entre un 80 a 90% fumadores activos o personas que han dejado de fumar recientemente. La relación entre ambos sexos es de 2.5 para hombres por cada mujer en el mundo (OMS. Martel C, Ferlay J, Franceschi S, et al., 2012) (OMS. Globocan, 2012).

La mayoría de los casos se diagnostican entre los 55 y los 75 años, con un máximo entre los 65 y los 70 años, aunque se registran casos que fluctúan entre los 35-40 años (OMS. Martel C, Ferlay J, Franceschi S, et al., 2012) (OMS. Globocan, 2012).

Tras constatar la relevancia que diferentes bases de datos norteamericanas conceden a los estudios sobre la acción de las plantas en relación al cáncer así como la muy extensa bibliografía existente sobre fitoterapia y tratamiento del cáncer, muchos investigadores consideran que debe potenciarse la capacidad del organismo para que reaccione y pueda destruir sus propias células cancerosas: “Si el organismo no tiene esa capacidad, prolifera el cáncer” (Zas.Pablo 2007) es por eso, que hay que fortalecer la inmunidad celular, mediante células que destruyan las células con cáncer, y la inmunidad humoral, o anticuerpos, que asimismo puede estimularse con plantas (Zas.Pablo 2007).

Si bien es cierto, que para el tratamiento de cáncer pulmonar existen muchos procedimientos tanto quirúrgicos como farmacológicos (quimioterápicos) que contienen múltiples fármacos; muchos de estos no son específicos para un tumor, los mismos que pueden atacar a células normales y provocar algunos efectos secundarios

graves como caída del cabello, úlceras en la boca, pérdida del apetito, náuseas y vómitos, diarrea o estreñimiento, daño renal, hepático entre otras.

Con estos antecedentes se han hecho múltiples investigaciones enfocados a la utilización de medicina natural alternativa, las mismas que han brindado resultados eficaces en varias líneas de investigación; una de ellas es el efecto antitumoral especialmente localizados en pulmón, páncreas y próstata, que posee la *annona cherimola* comúnmente llamada Chirimoya la misma que contiene poderosos principios activos anticancerígenos o citostáticos, como lo son las Acetogeninas (García, Alicia 2011).

Estudios realizados en los años 1998 al 2000 por McLaughlin y por Chih Hw, Chui HF han revelado que las acetogeninas son inhibidores del complejo I de la cadena de fosforilación oxidativa con lo cual bloquean la formación de ATP; energía que necesita la célula cancerosa para poner en funcionamiento su bomba que le permite mantenerse activa.

La acetogeninas, también inhiben la ubiquinona-ubiquinona oxidasa, enzima dependiente del NADH, que es peculiar en la membrana plasmática de la célula cancerosa. McLaughlin realizó sus investigaciones con las acetogeninas Bullatacin y Bullatacinone (García, Alicia 2011).

Es por eso, mi afán e interés el de verificar la actividad citotóxica del extracto Etanólico con pH Ácido de las hojas de *Annona cherimola* frente a líneas de cáncer de pulmón.

El estudio de la presente investigación fue de tipo experimental – prospectiva. La misma que se cumplió siguiendo métodos que fueron estandarizados a lo largo de la investigación como es la técnica de proliferación celular en la cual realizamos dos

cultivos; el primero que permitió incrementar el número de células tumorales en un medio de cultivo el cual contó con los nutrientes necesarios y en el segundo con la adición del extracto; la técnica de viabilidad celular cuyo objetivo fue determinar simultáneamente células vivas y muertas en una muestra total, tras un determinado estímulo o tratamiento. Para su evaluación se utilizó el método cuantitativo de azul de tripano para teñir las estructuras y evaluar la integridad de la membrana, posteriormente se colocó en la cámara de Neubauer y se observó en el microscopio de inversión para contar el número de células cancerígenas presentes en cada campo visual y realizamos los cálculos respectivos referentes a células vivas y células muertas. Concluyendo que el 84% del extracto etanólico concentrado de las hojas de *annona cherimola* destruyó a las células cancerígenas en un lapso de 72 horas; y mostró una proliferación celular del 60.7% a las 36 horas y tuvo un declive significativo del 16.6% a las 72 horas.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. Medicina Tradicional

La medicina tradicional abarca una amplia variedad de terapias y prácticas que varían entre países y entre regiones. En algunos países se denomina medicina «alternativa» o «complementaria».

La medicina tradicional es todo el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales (Zhang. Xiaorui OMS 2000).

4.2. Plantas Medicinales

Si bien la medicina moderna está bien desarrollada en la mayor parte del mundo, grandes sectores de la población de los países en desarrollo todavía dependen de los profesionales tradicionales, las plantas medicinales y los medicamentos herbarios para su atención primaria. Es más, durante los últimos decenios, el interés del público en las terapias naturales ha aumentado enormemente en los países industrializados, y se halla en expansión el uso de plantas medicinales y medicamentos herbarios.

Las muchas y diversas formas de los productos medicinales tradicionales han evolucionado frente a entornos ampliamente diferentes en lo etnológico, cultural, climático, geográfico y aun filosófico.

Evaluar estos productos y asegurar su inocuidad y eficacia mediante el registro y la reglamentación plantean importantes desafíos.

Los medicamentos herbarios, que formaron la base de la atención de salud en todo el mundo desde los primeros días de la humanidad, siguen utilizándose ampliamente y tienen una considerable importancia en el comercio internacional. Sigue en aumento el reconocimiento de su valor clínico, farmacéutico y económico, si bien esto varía ampliamente entre un país y otro.

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 Miriam. 2012).

4.3. Fitoquímicos

El término Fitoquímico significa sustancias químicas de las plantas que aunque no se consideran esenciales para nuestro metabolismo, sin embargo son beneficiosas a largo plazo para nuestra salud.

Existen más de 2.000 fitoquímicos en las plantas, que se agrupan en clases de acuerdo a su función y sus características estructurales, de los cuales se considera que los terpenos, los fenoles y los tioles, son los más estudiados (Aponte M. 2008).

4.4. Principio Activo

Los principios activos son los ingredientes de los medicamentos herbarios que tienen actividad terapéutica. En el caso de los medicamentos herbarios cuyos principios activos hayan sido identificados, se debe normalizar su preparación, si se dispone de métodos analíticos adecuados, para que contengan una cantidad determinada de ellos.

Si no se logra identificar los principios activos, se puede considerar que todo el medicamento herbario es un solo principio activo (Zhang. Xiaorui OMS 2000).

4.5. Annona cherimola

La chirimoya (*Annona cherimola*) es una de las muchas especies frutales en el género *Annona* (familia Annonaceae). El nombre chirimoya parece derivarse de ‘chirimuya’ que en Quechua significa ‘semilla fría’. Esto se refiere a la región andina donde está presente esta especie, que es relativamente fría comparada con las regiones donde están presentes el resto de las especies de *Annona*.

4.5.1. Taxonomía y morfología

- **Familia:** Annonaceae.
- **Género:** *Annona*
- **Especie:** *Annona cherimola* (Renata J. 2007).

4.5.2. Origen

La *Annona cherimola* es un árbol tropical originario del Perú y Ecuador, que es usado en la medicina tradicional como insecticida y antiparasitario¹. Tiene un fruto conocido en nuestro medio como “chirimoya” habiendo sido cultivado desde los tiempos de los incas (Quispe, A., Riva., D. Rojas, J. Zavala., D. Margarita. Rivera., P. Abraham J. 2009).

4.5.3. Usos y beneficios

La decocción de estas semillas, especialmente de aquellas especies que se encontraban sembradas a mayor altitud; servía para la eliminación de “piojos” (ectoparásitos generalmente ubicados en el cuero cabelludo). También se reporta que la semilla machacada era utilizada para eliminar “chinchas” y “talepates”; sin embargo, el

manejo debe ser cuidadoso ya que algunos de los alcaloides presentes en las semillas son tóxicos y afectan seriamente los ojos. Por otra parte, el aceite que se extrae de las semillas amarillo y sin olor, a pesar de no ser apto para el consumo humano, es utilizado en la fabricación de jabones y lubricantes (Renata J. 2007).

4.6. Composición química de las Hojas de *Annona Cherimola*

Por ser una de las annonaceas 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.

4.6.1. 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.Adolfo. 2009).

4.6.1.1. Metabolitos Secundarios

El metabolismo secundario comprende aquellos procesos químicos que son únicos para una planta dada, y no son universales. Dicho metabolismo es la química que conduce a la formación de un producto natural. Algunas porciones de esta química son comunes para un número de plantas diferentes o familias de plantas, pero actualmente la química de productos naturales es usualmente diferente de una planta a otra. Precursores químicos comunes que pueden conducir a resultados diferentes (Ávalos.Adolfo 2009).

No todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. Se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies. Algunos productos del metabolismo secundario tienen funciones ecológicas específicas como atrayentes o repelentes de animales. Muchos son pigmentos que proporcionan color a flores y frutos, jugando un papel esencial en la reproducción atrayendo a insectos polinizadores, o atrayendo a animales que van a utilizar los frutos como fuente de alimento, contribuyendo de esta forma a la dispersión de semillas. Otros compuestos tienen función protectora frente a predadores, actuando como repelentes, proporcionando a la planta sabores amargos, haciéndolas indigestas o venenosas. También intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas naturales. Las principales rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios derivan del metabolismo primario del carbono. 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. Adolfo 2009).

Se agrupan en cuatro clases principales.

- **Terpenos.** Entre los que se encuentran hormonas, pigmentos o aceites esenciales.
- **Compuestos fenólicos.** Cumarinas, flavonoides, lignina y taninos. Glucósidos. Saponinas, glucósidos cardiacos, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos.
- **Alcaloides.**

4.6.1.1.1. Terpenos

Los terpenos, o terpenoides, constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios (más de 40.000 moléculas diferentes). La ruta biosintética de estos compuestos da lugar tanto a metabolitos primarios como secundarios de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas. Entre los metabolitos primarios se encuentran hormonas (giberelinas, ácido abscísico y citoquininas), carotenoides, clorofilas y plastoquinonas (fotosíntesis), ubiquinonas (respiración) y esteroles (de gran importancia en las estructura de membranas) (Ávalos. Adolfo 2009).

Muchos terpenoides son comercialmente interesantes por su uso como aromas y fragancias en alimentación y cosmética, o por su importancia en la calidad de productos agrícolas. Otros compuestos terpenoides tienen importancia medicinal por sus propiedades anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimalariales, antimicrobianas, etc (Ávalos. Adolfo 2009).

4.6.1.1.1. Acetogeninas

Las acetogeninas derivados de la larga cadena de ácidos grasos tienen acción directa sobre las mitocondrias, el ATP, el Aparato Reticular de Goldi y las membranas y plasmatas celulares de las células cancerosas destruyéndolas selectivamente sin dañar las células y tejidos sanos

La modulación de la producción de ATP afecta la viabilidad de células específicas y el crecimiento de vasos sanguíneos que los nutren (Ruiz, José 2005).

4.7. 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 OMS el 25% de los fármacos comercializados actualmente son de origen vegetal y un 25 % contiene principios vegetales modificados químicamente (Zapata, J. 2002).

4.7.1. Extracto Etanólico

Extracto con olor característico, obtenido a partir de materia prima desecada de origen vegetal, por maceración o percolación en contacto con etanol, seguida de la eliminación de dicho solvente por un procedimiento físico. Estos procesos pueden ser sometidos a determinadas operaciones para eliminar algunos de sus componentes y así mejorar notablemente la calidad del producto deseado (González, A. 2004).

4.7.2. Métodos de obtención de extracto Etanólico

4.7.2.1. Maceración

Es una extracción que se realiza a temperatura ambiente. Consiste en remojar el material vegetal, debidamente fragmentado en un solvente (agua o etanol, se prefiere el etanol puesto que a largos tiempos de extracción el agua puede propiciar la fermentación o la formación de mohos) hasta que éste penetre y disuelva las porciones solubles. Se puede utilizar cualquier recipiente con tapa que no sea atacado con el disolvente; en éste se colocan el material vegetal con el disolvente y tapado se deja en reposo por un período de 2 a 14 días con agitación esporádica. Luego se filtra el líquido, se exprime el residuo, se recupera el solvente en un evaporador rotatorio y se obtiene el extracto (González, A. 2004).

4.7.2.2. Percolación

También conocido como lixiviación, es uno de los procesos más difundidos pues se puede realizar con disolventes orgánicos en frío para preservar los compuestos termolábiles que pudiera contener el material. Consiste en colocar el material fragmentado en un embudo o recipiente cónico y hacer pasar un disolvente adecuado a través del mismo. No es apropiado para resinas o materiales que se hinchen dado que el disolvente no percolará. Se requiere agregar solvente constantemente (González, A., 2004).

4.8. Cultivo Celular

El cultivo celular es el conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de células in vitro, preservando al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Las células son capaces de dividirse, incrementar su tamaño y en condiciones

adecuadas pueden replicarse hasta ser limitadas por algunas variables de cultivo como el consumo total de nutrientes o limitación del espacio físico (Castaño, E., 2012).

4.8.1. Tipos de cultivo celular

4.8.1.1. Cultivo Primario

Son preparados directamente de un tejido u órgano; consisten en una mezcla de células por lo general del riñón, pulmón o piel, obtenidas por disociación de las células de trozos de órgano. Una vez que se subcultivan repetidas veces in vitro, los cultivos primarios se transforman en líneas celulares. En estos cultivos las células están vivas, conservan sus características originales y su proliferación es limitada (Castaño, E., 2012).

4.8.1.2. Cultivo Secundario

En estas condiciones las células suelen multiplicarse 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 estadio, las células frecuentemente mostrarán distintas propiedades según su origen. Por ejemplo, los fibroblastos (células que sintetizan fibras y mantienen la matriz extracelular del tejido de muchos animales) secretarán colágeno, las células derivadas de tejido muscular esquelético se fusionarán para generar fibras musculares con capacidad contráctil espontánea, las células nerviosas extenderán prolongaciones (axones) eléctricamente excitables que podrán conectarse (establecer sinapsis) con otras células nerviosas, las células epiteliales formarán largas capas con varias propiedades de un epitelio intacto (figura 4). Gracias

a que estos fenómenos ocurren en cultivo, es posible estudiarlos con diferentes metodologías, a veces no aplicables a tejidos intactos (Segretin M. 2002).

4.9. Líneas celulares

Son células derivadas de un cultivo primario, las cuales pueden subcultivarse in vitro repetidamente. Pueden subdividirse en:

- ***Diploides:*** se originan de un tejido normal y continúan normales a medida que se cultivan.
- ***Heteroploides o continuas:*** se originan de un tejido normal o anormal, pero se considera que estas células han sufrido una transformación que le confiere características de crecimiento diferentes.

4.9.1. Tipos de crecimiento celular

4.9.1.1. Células adherentes o cultivos fijos

Éste tipo de células requieren unirse a una superficie para su multiplicarse y formar una monocapa.

4.9.1.2. Células no adherentes o cultivos en suspensión

Células que se multiplican suspendidas en medio líquido, donde se sedimentan pero no se adhieren a la superficie del recipiente (Castaño, E.2012).

4.10. 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

4.11. Medios de cultivo

Los medios de cultivo están constituidos por una solución salina balanceada, suplementada con factores implicados en el metabolismo celular tales como carbohidratos, aminoácidos , vitaminas, Suero bovino fetal (SFB) o Líquido amniótico y otros suplementos como lacto- albumina hidrolizada, extractos embrionarios o de levaduras y hormonas entre otras.

La mayoría de suplementos y medios, deben esterilizarse mediante filtración a través de una membrana de poros de 0.22 micras (Castaño, E., 2012).

4.12. Viabilidad celular

La viabilidad celular es una determinación de las células vivas o muertas, en base a una muestra total de células. Mediciones de la viabilidad celular se puede utilizar para evaluar la muerte o la vida de las células cancerosas y el rechazo de órganos implantados (Aladro, F. 2009).

4.13. 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.

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 (Aladro, F., 2009).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Tipo de investigación

De acuerdo a la naturaleza y características del objeto de investigación, el estudio se realizó a través de un diseño experimental, de tipo prospectivo, que consistió en indagar el efecto citotóxico que puede producir el extracto de las hojas de *Annona cherimola* sobre líneas celulares de cáncer de pulmón.

5.2 Área de estudio

La presente investigación se llevó a cabo en los laboratorios del Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.

5.3 Técnicas y procedimientos

5.3.1 Fase pre-analítica

- Oficio que permitió ser parte del presente proyecto de Investigación (ANEXO 1)
- Adquisición de la Línea Celular A549 (ANEXO 2)
- Mantenimiento celular:
 - ✓ Medio de Congelación (ANEXO 3)
 - ✓ Crio congelación (ANEXO 4)
 - ✓ Descongelación celular (ANEXO 5)

5.3.2 Fase analítica

En el presente proyecto se efectuó:

- Obtención del extracto etanólico de las Hojas de *Annona Cherimola* en diferentes concentraciones en el Laboratorio de cultivos celulares de la Universidad Nacional de Loja. (ANEXO 6)

- Preparación de medios de cultivo RPMI pH ácido. (ANEXO 7)
- Preparación de Controles positivos con el fármaco Cisplatino en diferentes Concentraciones (ANEXO 8)
- Tripsinización de células A549 (ANEXO 9)
- Colocación de células en los respectivos pocillos (ANEXO 10)
- **Viabilidad celular:** se usó 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 las células confluentes en la cámara de Neubauer a las 6, 36,72 horas de incubación. (ANEXO 12).

5.3.2.1 Controles Negativos y Controles positivos:

5.3.2.1.1 Control positivo:

- Medio de cultivo más línea celular de cáncer de pulmón más el Fármaco que en este caso se utilizó el Cisplatino que es el de elección para este tipo de Cáncer a nivel local

5.3.2.1.2 Control negativo:

- Cultivo de células A549 sin extracto en medio RPMI en pH ácido.

5.3.2.1.3 Control Guía:

- Medio de cultivo con la línea celular A549 y Dimetil sulfoxido al 10% DMSO

5.3.2.1.4 Evaluación de Citotoxicidad:

- Extracto Etanólico mas células normales, en medio RPMI en pH ácido

5.3.3 Fase Post-analítica

- Certificado de haber realizado los ensayos de campo correspondiente en los laboratorios de Investigaciones de la UNL del centro de Biotecnología. **(ANEXO 13)**
- Realizar los cálculos correspondientes a la Viabilidad Celular obteniendo el porcentaje de células vivas y muertas **(ANEXO 14)**
- Realizar los cálculos correspondientes a la Proliferación Celular obteniendo el porcentaje de células elongadas en relación a las células vivas lo que se conoce como Confluencia. **(ANEXO 15)**
- Se realizó el Análisis estadístico mediante el Programa SAS, utilizando tres métodos estadísticos como la Prueba de ADEVA la misma que se caracteriza por realizar una varianza, es decir observa si los ensayos son o no diferentes, si la respuesta es positiva se sigue con la Prueba de DUNCAN, que es la prueba de significancia de las medias, es decir categoriza por medio de letras asignando en cual es mejor una con otra y finalmente se utiliza la Prueba de T-Student la misma que utiliza los dos grupos más significativos determinando la media entre las dos. **(ANEXO 16)**

6. RESULTADOS

TABLA 1

PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS A549 CON EL EXTRACTO ETANÓLICO EN MEDIO DE CULTIVO* CON pH ÁCIDO**

HORAS	6	36	72
CONCENTRADO	0,0%	60,7%	16,6%
DILUCIÓN 1:10	0,0%	64,5%	53,9%
DILUCIÓN 1:50	0,0%	74,5%	56,6%

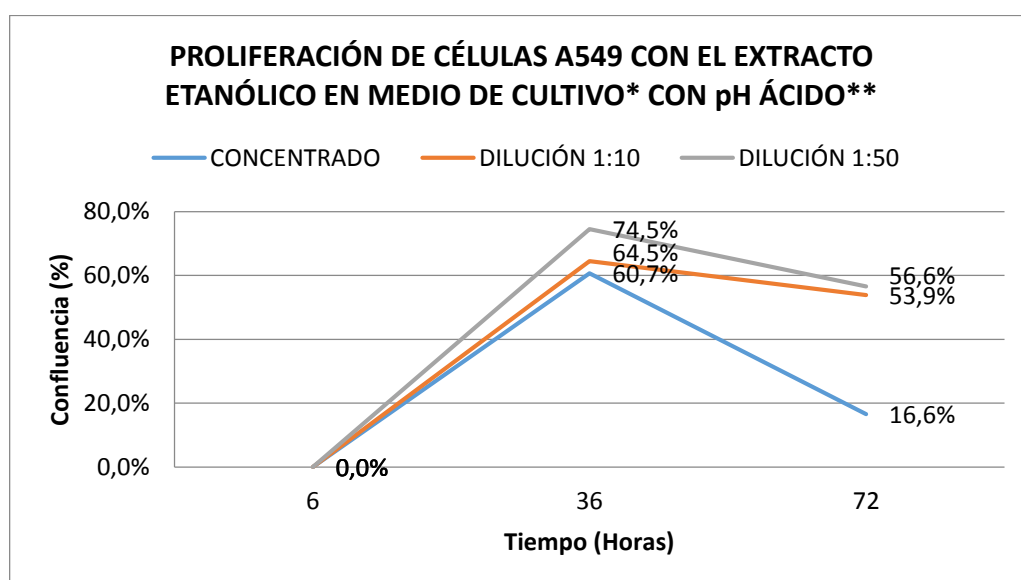
Fuente: Ensayo realizado en el Laboratorio de cultivo de celulas de la Universidad Nacional de Loja.

Autor: Karla del Cisne Durán Hernández

** Medio RPMI 1640

*** pH: 6.2

GRÁFICO 1



Fuente: Ensayo realizado en el Laboratorio de cultivo de celulas de la Universidad Nacional de Loja.

Autor: Karla del Cisne Durán Hernández

** Medio RPMI 1640

*** pH: 6.2

Interpretación:

En el gráfico 1 se determinó una proliferación de 0 % a las 6 horas, 60.7 % a las 36 horas y 16.6 % a las 72 horas en el cultivo del extracto concentrado; 0 % a las 6 horas, 64.5 % a las 36 horas y 53.9 % a las 72 horas de incubación en el cultivo diluido 1:10; 0 % a las 6 horas, 74.5 % a las 36 horas y 56.6 % a las 72 horas de incubación en el cultivo diluido 1:50. Demostrando que existe una proliferación mayor a las 36 horas y disminuyendo a las 72 horas.

TABLA 2

PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS A549 CON EL CISPLATINO EN UN MEDIO DE CULTIVO* CON pH ÁCIDO**

HORAS	6	36	72
CONCENTRADO	0,0%	57,5%	11,8%
DILUCIÓN 1:10	0,0%	73,7%	69,4%
DILUCIÓN 1:50	0,0%	80,0%	60,6%

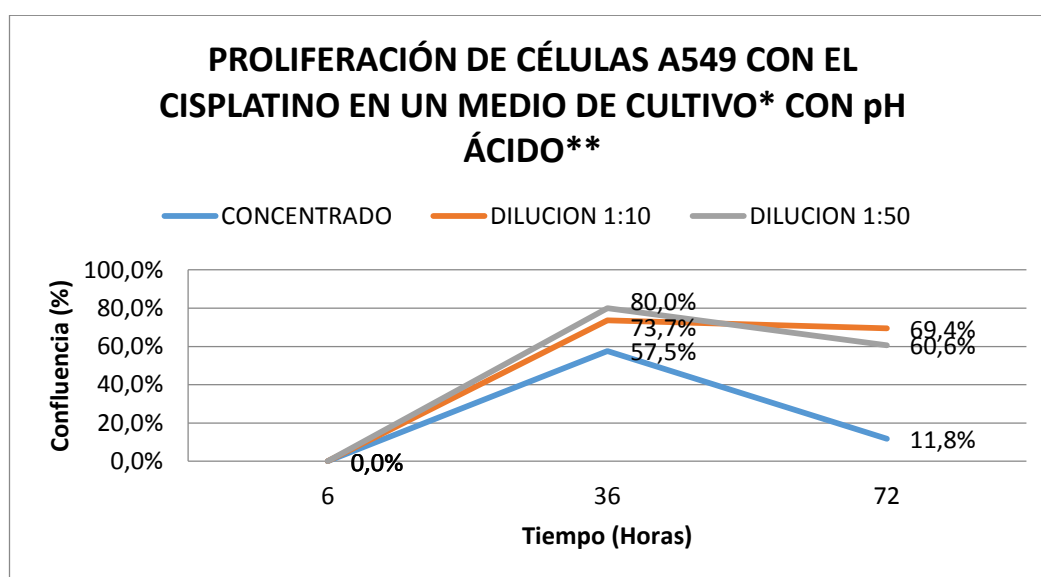
Fuente: Ensayo realizado en el Laboratorio de cultivo de celulas de la Universidad Nacional de Loja.

Autor: Karla del Cisne Durán Hernández

** Medio RPMI 1640

*** pH: 6.2

GRÁFICO 2



Fuente: Ensayo realizado en el Laboratorio de cultivo de celulas de la Universidad Nacional de Loja.

Autor: Karla del Cisne Durán Hernández

** Medio RPMI 1640

*** pH: 6.2

Interpretación:

En el gráfico 2 se observa una proliferación de 0 % a las 6 horas de incubación, 57.5 % a las 36 horas y 11.8 % a las 72 horas de incubación en el cultivo con el cisplatino concentrado; en el cultivo con la dilución 1:10 la proliferación fue de 0%, 73.7 % y de 69.4 % a las 6, 36 y 72 horas de incubación; de la misma forma en el cultivo con la dilución 1:50 fue de 0 %, 80.0 % y 60.5 % de proliferación a: 6,36 y 72 horas de incubación. Determinando que la proliferación celular se da a las 36 horas y disminuye a las 72 horas por acción de medicamento.

TABLA 3

PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS A549 EN MEDIO DE CULTIVO* CON pH ÁCIDO**

HORAS	6	36	72
CONTROL NEGATIVO	0,0%	84,5%	79,5%

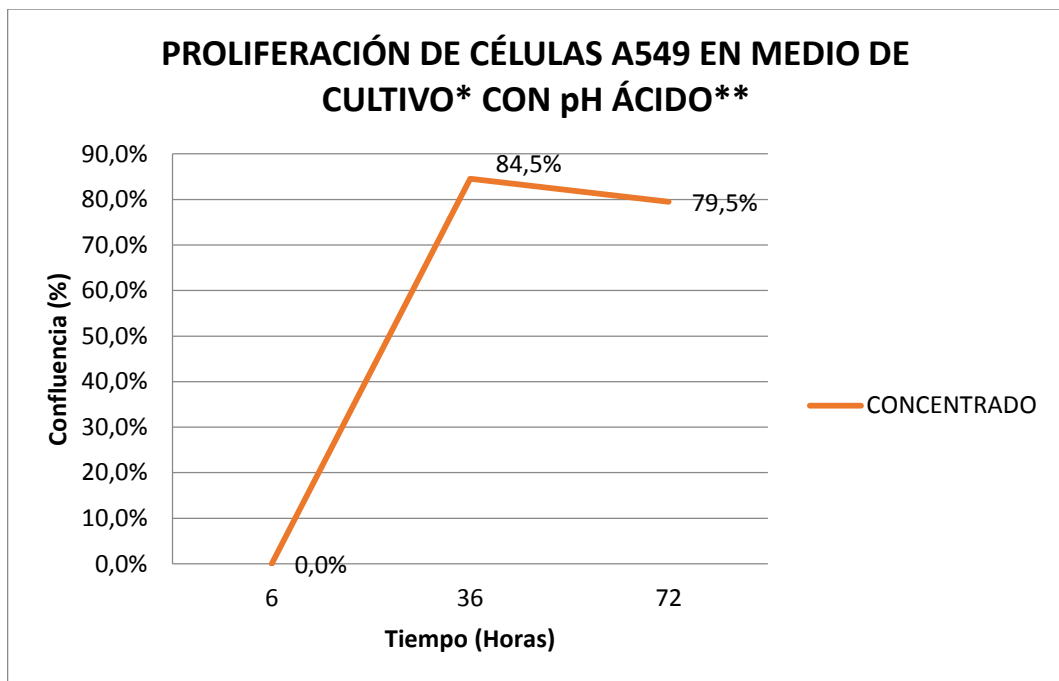
Fuente: Ensayo realizado en el Laboratorio de cultivo de celulas de la Universidad Nacional de Loja.

Autor: Karla del Cisne Durán Hernández

** Medio RPMI 1640

*** pH: 6.2

GRÁFICO 3



Fuente: Ensayo realizado en el Laboratorio de cultivo de celulas de la Universidad Nacional de Loja.

Autor: Karla del Cisne Durán Hernández

** Medio RPMI 1640

*** pH: 6.2

Interpretación:

En el gráfico 3 observamos que la proliferación de células A549 en medio de cultivo es de 0 % a las 6 horas, 84.5 % a las 36 horas y 79.5 % a las 72 horas. Demostrando que la proliferación celular aumenta a las 36 horas y disminuye a las 72 horas de incubación.

TABLA 4

CÉLULAS A549* CON EL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE *Annona cherimola* EN UN MEDIO DE CULTIVO CON pH ÁCIDO*****

Horas	Concentrado	Dilución 1:10	Dilución 1:50	Control negativo
6	12,1%	11,4%	8,7%	9,2%
12	18,1%	16,2%	12,1%	8,6%
24	26,6%	24,8%	19,7%	19,8%
36	36,8%	30,5%	26,3%	20,7%
48	44,3%	36,3%	33,5%	23,0%
60	81,3%	46,5%	38,6%	18,6%
72	84,0%	46,0%	32,9%	19,9%

Fuente: Ensayo realizado en el Laboratorio de cultivo de células de la Universidad Nacional de Loja.

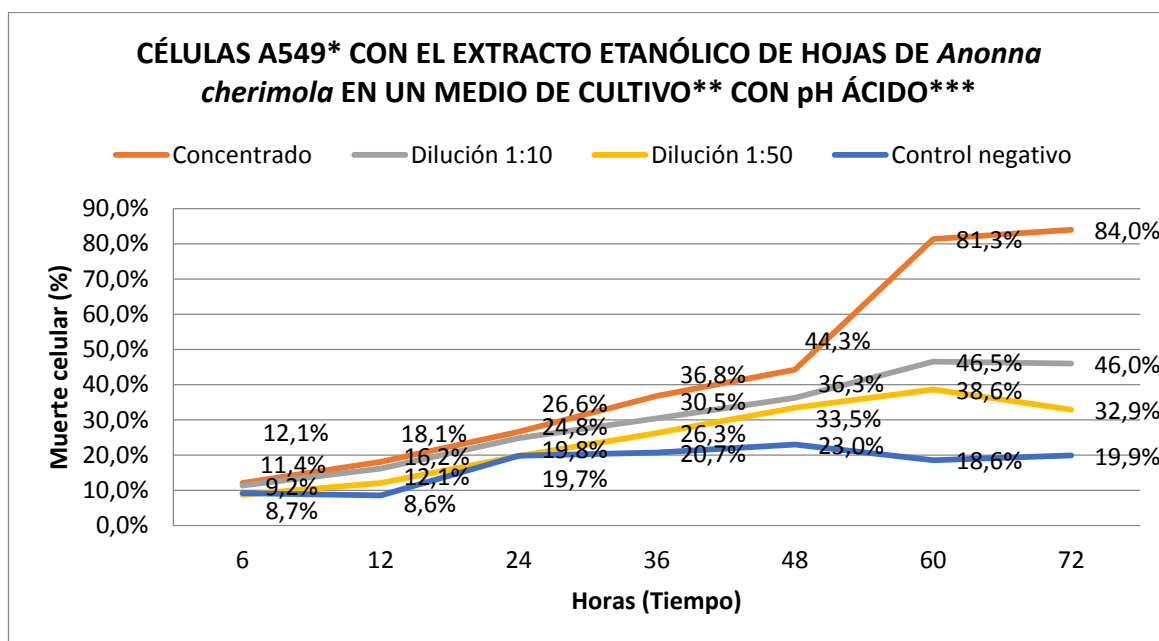
Autor: Karla del Cisne Durán Hernández

* Línea Celular de Cáncer de Pulmón Humano

** Medio RPMI 1640

*** pH: 6.2

GRÁFICO 4



Fuente: Ensayo realizado en el Laboratorio de cultivo de células de la Universidad Nacional de Loja.

Autor: Karla del Cisne Durán Hernández

* Línea Celular de Cáncer de Pulmón Humano

** Medio RPMI 1640

*** pH: 6.2

Interpretación:

De acuerdo a los datos obtenidos podemos observar que el cultivo de extracto 1 concentrado tiene una mayor actividad citotóxica produciendo un 84.0 % de muerte celular seguido del extracto 2 que fue diluido 1:10 produciendo una muerte celular de 46.0 % luego de incubación de 72 horas.

TABLA 5

CÉLULAS A549* CON EL CISPLATINO EN UN MEDIO DE CULTIVO CON pH ÁCIDO**

Horas	Concentrado	Dilución 1:10	Dilución 1:50	Control negativo
6	17,1%	12,8%	8,9%	9,2%
12	17,2%	15,6%	16,7%	8,6%
24	35,3%	33,7%	23,9%	19,8%
36	53,2%	24,9%	16,0%	20,7%
48	82,8%	36,4%	32,7%	23,0%
60	86,3%	47,8%	32,1%	18,6%
72	86,6%	37,1%	37,6%	19,9%

Fuente: Ensayo realizado en el Laboratorio de cultivo de células de la Universidad Nacional de Loja.

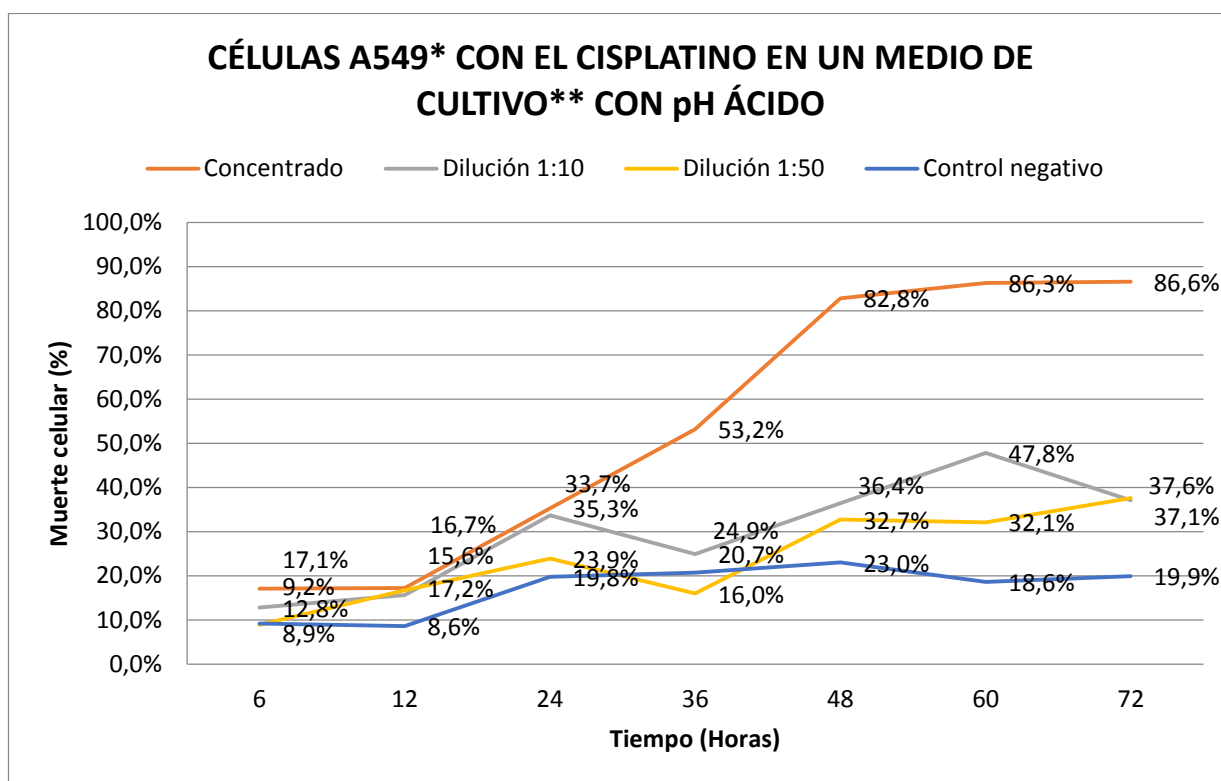
Autor: Karla del Cisne Durán Hernández

* Línea Celular de Cáncer de Pulmón Humano

** Medio RPMI 1640

*** pH: 6.2

GRAFICO 5



Fuente: Ensayo realizado en el Laboratorio de cultivo de células de la Universidad Nacional de Loja.

Autor: Karla del Cisne Durán Hernández

* Línea Celular de Cáncer de Pulmón Humano

** Medio RPMI 1640

*** pH: 6.2

Interpretación:

Los resultados obtenidos determinan que en el cultivo concentrado de cisplatino 1 existió una muerte celular de un 86.6 % y en el cultivo diluido 1:50 una muerte celular de 37.6 % después de una incubación de 72 horas demostrando su efectividad frente a células tumorales.

TABLA 6

CULTIVO DE CÉLULAS NORMALES* CON EL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE ANNONA CHERIMOLA EN UN MEDIO DE CULTIVO CON pH ÁCIDO*****

Horas	Concentrado	Dilución 1:10	Dilución 1:50
6	0,5%	0,5%	0,4%
12	8,4%	6,1%	3,7%
24	24,5%	6,7%	7,9%
36	55,2%	8,1%	3,8%
48	88,6%	16,9%	13,8%
60	84,0%	10,3%	13,9%
72	84,4%	14,6%	11,3%

Fuente: Ensayo realizado en el Laboratorio de cultivo de celulas de la Universidad Nacional de Loja.

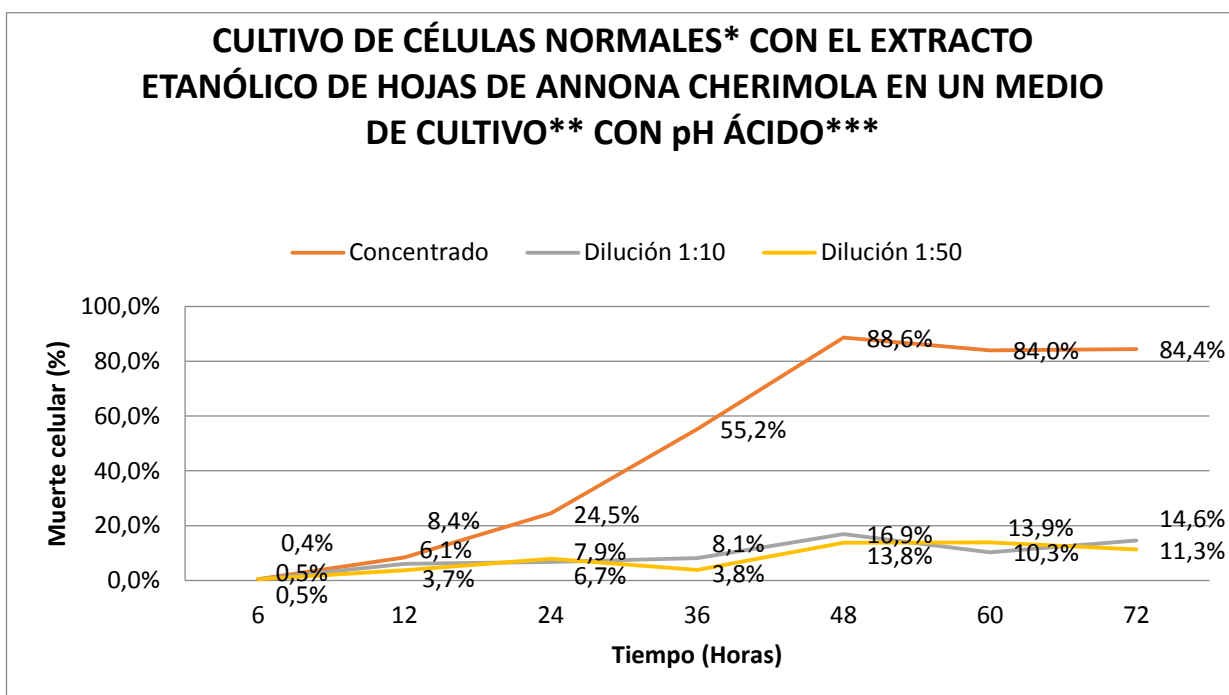
Autor: Karla del Cisne Durán Hernández

* Línea Celular de Cáncer de Pulmón Humano

** Medio RPMI 1640

*** pH: 6.2

GRÁFICO 6



Fuente: Ensayo realizado en el Laboratorio de cultivo de celulas de la Universidad Nacional de Loja.

Autor: Karla del Cisne Durán Hernández

* Línea Celular de Cáncer de Pulmón Humano

** Medio RPMI 1640

*** pH: 6.2

Interpretación:

Los resultados obtenidos demuestran que el extracto Etanólico de hojas de Annona cherimola producen una citotoxicidad alta observando que existió un 84.4 % de muerte celular en el cultivo de linfocitos 1 concentrado y un 14.6 % de muerte celular en el cultivo de linfocitos 2 diluido 1:10 a 72 horas de incubación.

TABLA 7

COMPARACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO (CONCENTRADO) Y ANTITUMORAL* (CONCENTRADO) SOBRE CÉLULAS A549 EN MEDIO DE CULTIVO*** CON pH ÁCIDO******

HORAS	6	12	24	36	48	60	72
EXTRACTO	12,1%	18,1%	26,6%	36,8%	44,3%	81,3%	84,0%
CISPLATINO	17,1%	17,2%	35,3%	53,2%	82,8%	86,3%	86,6%
DMSO	6,6%	14,3%	24,4%	22,3%	24,0%	22,5%	25,9%

Fuente: Ensayo realizado en el Laboratorio de cultivo de células de la Universidad Nacional de Loja.

Autor: Karla del Cisne Durán Hernández

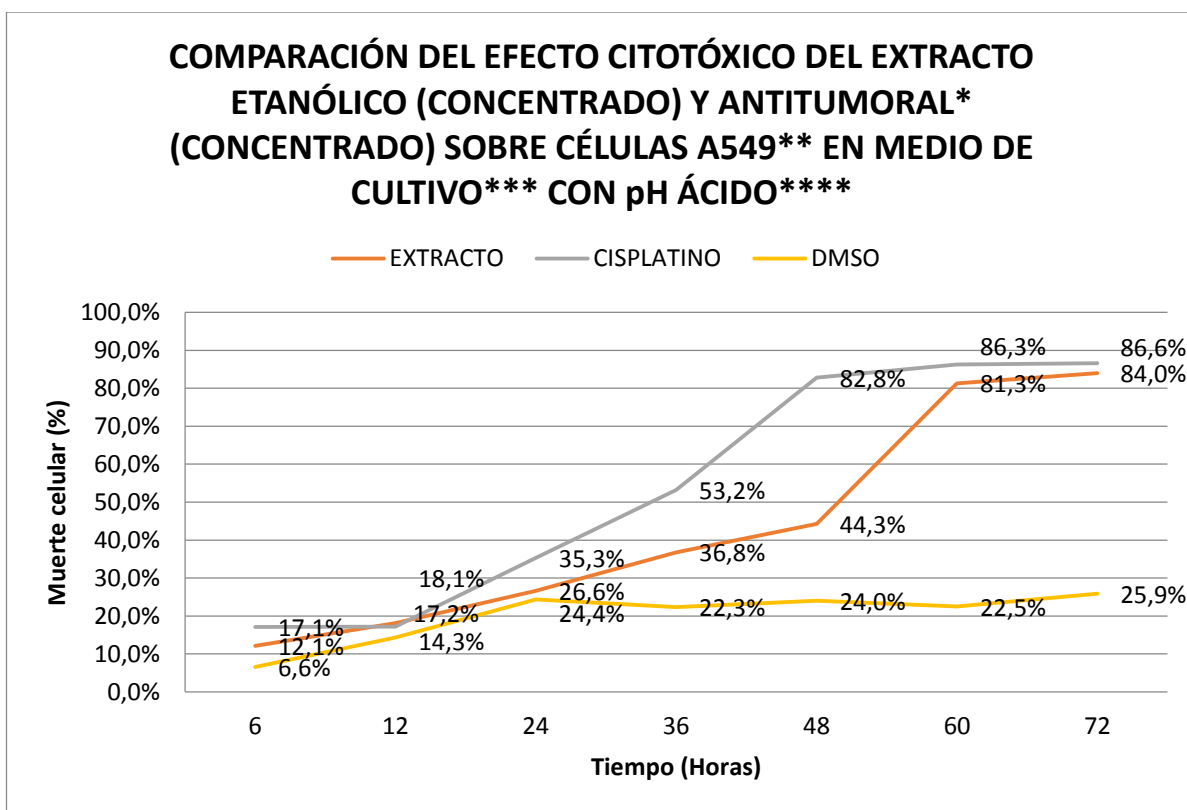
* Cisplatino

** Línea Celular de Cáncer de Pulmón Humano

*** Medio RPMI 1640

**** pH: 6.2

GRÁFICO 7



Fuente: Ensayo realizado en el Laboratorio de cultivo de células de la Universidad Nacional de Loja.

Autor: Karla del Cisne Durán Hernández

* Cisplatino

** Línea Celular de Cáncer de Pulmón Humano

*** Medio RPMI 1640

**** pH: 6.2

Interpretación:

Se obtuvo una citotoxicidad del extracto etanólico de hojas de *Annona cherimola* de 84,0 % y del Cisplatino de 84,6 % en 72 horas de incubación demostrando que tienen similar acción citotóxica.

7. DISCUSIÓN

Esta investigación tuvo como propósito determinar el grado de proliferación celular y medir la viabilidad celular en el cultivo de líneas celulares tumorales de pulmón con el extracto etanólico en un pH ácido de las hojas de *Annona cherimola*, sobre todo se investigó si existe o no efecto del extracto etanólico con una línea celular de cáncer de pulmón, y si es que éste es el más óptimo en tratamiento contra el cáncer de pulmón frente a un fármaco utilizado comúnmente en la actualidad como es el cisplatino, utilizando técnicas de viabilidad y proliferación celular. Concluyendo que el 84% del extracto etanólico concentrado de las hojas de *annona cherimola* destruyó a las células cancerígenas en un lapso de 72 horas; y mostró una proliferación celular del 60.7% a las 36 horas y tuvo un declive significativo del 16.6% a las 72 horas.

De esta manera, contrastamos los principales hallazgos de este estudio con datos de otros estudios investigativos internacionales.

En un estudio realizado en Lima – Perú 2006 en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM) 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), donde se realizó el conteo de células; a las 48 horas se obtuvo que el porcentaje de crecimiento de las células tumorales de cáncer de pulmón (H460) fue 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 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 del 74.5 % con el extracto y un 80% con el cisplatino en la dosis más baja; en cambio en la dosis alta se obtuvo un 60.7% con el extracto y un 57.5% con el cisplatino; 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 etanólico de la *Annona cherimola* (Quizpe A, Rojas J, Zavala D, Pozo M, 2006).

Según un estudio realizado en Lima – Perú 2007 en la Universidad Mayor de San Marcos acerca del “Efecto citotóxico de *Annona muricata* (guanábana) 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, se obtuvieron los siguientes resultados: un crecimiento celular de - 2.5% con fluorouracilo y - 6.7% con extracto en la línea celular H 460; - 12.4% con fluorouracilo y - 19.8% con extracto en la línea celular C - 678 lo que difiere del presente estudio en el cual se realizó el conteo de células confluentes en un hemocitómetro con la ayuda de un microscopio óptico a las 36 horas dando lugar a los siguientes resultados: una proliferación de 57.5% con Cisplatino y 60.7% con el extracto etanólico de la hoja de *Annona cherimola* (Quizpe A, Rojas J, Zavala D, Pozo M, 2007).

8. CONCLUSIONES

- El extracto etanólico de las hojas annona cherimola con la línea celular de cáncer de pulmón mostró una proliferación de 60.7% a las 36 horas que tuvo un declive significativo del 16.6% a las 72 horas; siendo el extracto concentrado de las hojas de *Annona cherimola* el de mayor eficacia en relación a las diluciones
- En la viabilidad celular observamos que el extracto etanólico si tuvo un efecto citotóxico importante en la línea celular tumoral de un 84% al cabo de las 72 horas de incubación siendo mejor el extracto concentrado.

9. RECOMENDACIONES

- Dado que los resultados obtenidos fueron positivos se sugiere seguir con la misma línea de investigación con el fin de alcanzar un aporte científico para la salud en el ámbito de tratamiento alternativo natural para el cáncer.

- Cumplir con todos los protocolos planteados y en caso de cambios, ir paso a paso estandarizando los mismos.

- Todo procedimiento de investigación se debe llevar a cabo cumpliendo las Normas de Bioseguridad.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Aladro, F. (2009). *Viabilidad miocárdica y los principales métodos para su detección*. ardiocentro “Ernesto che Guevara” santa clara, villa clara. España
2. Ávalos, M. (2009). *Caracterización Genética de células Endoteliales Transferencias a partir de células madre de gelatina de Warthon*. Diciembre 27,2014, de Universidad de Granada. Facultad de Medicina Sitio web: <http://hera.ugr.es/tesisugr/1850579x.pdf>
3. Bailón, N., Romero., & Ostrosky, P. (2014, Enero 12). *Development of anticancer drugs based on the hallmarks of tumor cells*. Tumor Biol., S.Vol., p.4
4. Castaño, E., Zapata, J. *Principios de virología*. (2012). Capítulo 4. Sitio web: <http://editorialbiogenesis.udea.edu.co/index.php/biogenesis/article/viewFile/252/252>
5. Castillo, Jh. (2014, Octubre 20). *Incidencia de Mortalidad 1997-2009. tasas de incidencia promedial anual según localización topográfica por grupos de edad*, S.Vol., p.1. 2014, diciembre 27, De EXCEL Base de datos.
6. Castro, J. (2007). CULTIVO DE LA ANONA (*Annona cherimola*, Mill). Diciembre 27,2014, de MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERÍA Sitio web: <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/a00109.PDF>
7. Castaño, E., Zapata, J. (2012). *Cultivos Celulares*. Diciembre 27,2014, de Biogénesis Sitio web: <http://editorialbiogenesis.udea.edu.co/index.php/viewFile/252/252>
8. Cultek. (Febrero, 2006). *Soluciones Cultivos Celulares Protocolos y técnicas*. Diciembre 27,2014, de Cultek Sitio web: http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/soluciones-cultivos_celulares-protocolos.pdf
9. Globocan. (2012). *Lung Cancer Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012*. Diciembre 27,2014, de Organización Mundial de la Salud (OMS) Sitio web: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
10. González, M. (2013, Julio-Septiembre). *CHIRIMOYA (Annona cherimola Miller), FRUTAL TROPICAL Y SUB-TROPICAL DE VALORES PROMISORIOS*. Red de

Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal, 34, pp.52-60.

11. Instituto Nacional del Cáncer. (4/23/2014). *Cáncer de Tiroides*. Diciembre 27,2014, de American Cáncer Society Sitio web: <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002324-pdf.pdf>
12. Laínez, J., & Ramírez, J. ("s.f."). *Detección y análisis estadístico de los principales factores que inciden en el cáncer de pulmón*. Diciembre 27,2014, de Instituto de ciencias Matemáticas de la ESPOL Sitio web: <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/2105/1/4162.pdf>
13. Martel C., Ferlay J., Franceschi S., et al.. (2012). *Cáncer. Datos y Cifras*. Diciembre 27,2014, de Organización Mundial de la Salud (OMS) Sitio web: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
14. Marnet. ("s.f."). *Cáncer de pulmón y mortalidad*. Diciembre 27,2014, de Kioskea Sitio web: <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/2105/1/4162.pdf>
15. Machado, A., Pérez, G., Machado, L., Cándido, J., Torres, O., & Castro, J. (1998). *TUMORES DEL PULMON*. Revista Científica Villa Clara, 2, p.1.
16. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente Loja. (2007). *Naturaleza y Cultura. Perspectivas del Medio Ambiente Urbano: GEO Loja*, S.Vol, pp.114-115.
17. Quispe, A., Callacondo, D., Rojas, J., Zavala, D., Posso, M., & Vaisberg A. (2009,Julio). *Efecto citotóxico de las semillas de Annona cherimola en cultivos de cáncer de cérvix, mama y leucemia mieloide crónica*. Scielo Perú, S.Vol, s.p.
18. Rossi, S. (Noviembre 12, 2010). *Propiedades de la guanábana contra el cáncer*. Diciembre 27,2014, de I mujer otra Medicina Sitio web: <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/2105/1/4162.pdf>
19. Sánchez, J. (2013). *Cáncer de Pulmon*.Medicos Ecuador, S.Vol., p.1.
20. Sánchez, J., & Isla, D. (Octubre, 2011). *Hablemos de El cáncer de pulmón*. Diciembre 27,2014, de ROCHE hablemos de Sitio web: http://www.roche.es/content/dam/internet/corporate/roche/es_ES/documents/HABLEMOS_CANCER_PULMON_ok.pdf

21. Aguirre P., Parra M., Quinaloa G. (2003). Annona Cherimola. 09-02-2015, de ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL (ESPOL) Sitio web: http://www.cib.espol.edu.ec/Digipath/D_Tesis_PDF/D-32243.pdf.
22. Aladro, F. (2009). Viabilidad miocárdica y los principales métodos para su detección. ARDIOCENTRO “ERNESTO CHE GUEVARA” SANTA CLARA, VILLA CLARA.España
23. Álvarez, G., Villegas, A. (2005.). Cáncer de pulmón Una Guía práctica. 19-01-2015, de Asociación Española Contra el Cáncer. Sitio web: https://www.aecc.es/comunicacion/publicaciones/documents/guia_ca_pulmon.pdf
24. Barahona. V,. (2013). Evaluación de la Actividad Antioxidante y valor Nutracéutico de las Hojas y frutos de la Guanábana. 11/02/015, de Escuela Superior Politécnica de Chimborazo Sitio web: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/2453/1/56T00321.pdf>
25. Batiste X., Porta J., Tuca A. (2008). Síntomas Respiratorios.. En Manual Control De Síntomas En Pacientes Con Cáncer Avanzado Y Terminal (161). España: https://books.google.com.ec/books?id=zZNqb_96iRIC&pg=PA161&dq=fisiopatologia+del+cancer+de+pulmon&hl=es&sa=X&ei=wBfYVOi8HJeQsQTKu4DwAw&ved=0CEcQ6AEwCA#v=onepage&q=fisiopatologia%20del%20cancer%20de%20pulmon&f=false.
26. Campozano, J., Salazar, C. (2010). Incidencia del cáncer en Guayaquil 2003 – 2006. 19-01-2014, de SOLCA- Guayaquil Sitio web: <http://www.estadisticas.med.ec/Publicaciones/INCIDENCIA2003-2006.pdf>
27. Carrillo F., Fuentes A., Procel E. (2003). Evaluacion Diagnostica en el cáncer broncogenico por fibrobroncoscopia en casos sospechosos de neoplasia . En Cirujanos y Cirugía (369). México: <https://books.google.com.ec/books?id=djHWD46Yri4C&pg=PA369&dq=diagnostico+del+cancer+de+pulmon+histopatologico&hl=es&sa=X&ei=pi3YVPayKs3dsAS1i4GQDg&ved=0CB8Q6AEwAQ#v=onepage&q=diagnostico%20del%20cancer%20de%20pulmon%20histopatologico&f=false>
28. Castaño, E.,. (2012). Cultivos Celulares. 11/02/015, de Biogénesis Sitio web: <http://editorialbiogenesis.udea.edu.co/index.php/biogenesis/article/viewFile/252/252>

- 29.** Cueva, P. (2013). El Cáncer en el Ecuador. 19/01/015, de SOLCA Quito Sitio web: <http://www.taringa.net/posts/salud-bienestar/17638672/El-Cancer-en-el-Ecuador.html>
- 30.** Galvis, J.. (2010). Evaluación de la actividad leishmanicida in vitro de extractos de *Annona cherimolioides*. 19/01/015, de Facultad de Ciencias Exactas y Naturales., Universidad de Caldas. Sitio web: http://www.bvs.sld.cu/revistas/pla/vol_15_4_10/pla04410.htm
- 31.** Gil, P.. (2011). Lineas celulares. Células Híbridas. En Cultivo de células Animales y Humanas(289). Madrid: Visión libros.
- 32.** GLOBALCAN., de Martel, C. (2014). Cáncer. 19/01/015, de Organización Mundial de la Salud Sitio web: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- 33.** GLOBALCAN. (2010). Cáncer de Pulmón en las Américas . 19/01/015, de Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud Sitio web: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=22071&Itemid=
- 34.** HARRISON., FARRERAS-ROZMAN.. (2003). Cáncer Broncopulmonar. 19/01/015, de Universitat de Lleida Sitio web: http://web.udl.es/usuaris/w4137451/webresp/contenidos_docentes/temario/temas/cancer/cancer10-1.htm
- 35.** INC. (2014). Qué es el Cáncer. 11/02/015, de INC Sitio web: <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es>
- 36.** Isla, D., Sánchez, J. (2011). Hablemos del Cáncer de Pulmón con Roche. 19-01-2014, de Asociación Roche; Sitio web: http://www.roche.es/content/dam/internet/corporate/roche/es_ES/documents/HABLEMOS_CANCER_PULMON_ok.pdf
- 37.** James A. (2001). Cáncer Del Pulmón Guías De Tratamiento Para Los Pacientes Versión I. 8-02-2015, Sociedad Americana Del Cáncer Sitio web: http://www.hispasante.be/documentacion/guias/med/cancer/Cancer_pulmon_guias_pacientes.pdf.

- 38.** Larráyo, M.. (2011). Relevancia Funcional del VEGFA y sus receptores en cancer de pulmón . 19/01/015, de Universidad de Navarra Sitio web: <http://dadun.unav.edu/handle/10171/34913>
- 39.** Lupera, H. 2013. (2013). Vida y Salud. 19/01/015, de Organización Mundial de la Salud Sitio web: http://www.lahora.com.ec/index.php/noticias/show/1101515272/-1/Ecuador%3A_de_cada_100_tipos_de_c%C3%A1ncer_registrados,_tres_se_producen_en_ni%C3%B1os_y_j%C3%B3venes.html#.VLz8MkeG_85
- 40.** Lomonte, B.. (2009). Técnicas de Laboratorio en Inmunología Clínica. 11/02/015, de Universidad de Costa Rica Sitio web: http://www.medic.ula.ve/idic/docs/clases/iahula/curso_2010/suplementario-tema16.pdf
- 41.** Onsalus. (2015). extracto acuoso. 11/02/015, de onsalus Sitio web: <http://www.onsalus.com/diccionario/extracto-acuoso/11204>
- 42.** Pardo, J.. (2002). Patentabilidd de los extractos vegetales. 11/02/015, de Los Lunes del Centro de Patentes Sitio web: http://www.ub.edu/centrepatents/pdf/doc_dilluns_CP/pardo_patentesextractos plantas.pdf
- 43.** Quispe, A.. (2009). Efecto citotóxico de las semillas de Annona cherimola en cultivos de cáncer de cervix, mama, y leucemia mieloide crónica. 19/01/015, de Acta Médica Peruana Sitio web: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172009000300003
- 44.** Renata J. (2007). CULTIVO DE LA ANONA (Annona cherimola). 08-02-2015, de MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERÍA Sitio web: <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/a00109.PDF>
- 45.** Rojas, O.. (2006). Inmunidad adquirida: el sistema linfoide. En Inmunología de Memoria(73). México: Médica Panamericana.
- 46.** Rubio, A., Raviña, A. (2007). Cribado de Cáncer de Pulmón. 19-01-2014, de Plan de Calidad para el Sistema Nacional de Salud del Ministerio de Sanidad y Política Social España Sitio web: <http://www.sergas.es/docs/Avaliat/CribCancerPulmonMemFinal.pdf>
- 47.** Sociedad de lucha contra el cáncer. Registros Hospitalarios 2014. Solca-Loja.

11. ANEXOS

ANEXO 1

Oficio para la participación del 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. **Karla del Cisne Durán Hernández**, estudiante del **VIII MÓDULO** de la Carrera de **LABORATORIO CLÍNICO**, con cédula de identidad 1105146631 fue aceptada para ser 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

Obtención de la Línea Celular A549




ATCC
Product Sheet
A549 (ATCC® CCL-185™)

Please read this FIRST



Storage Temp.
**liquid nitrogen
vapor phase**



Biosafety Level
1

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Complete Growth Medium

The base medium for this cell line is ATCC-formulated F-12K Medium, Catalog No. 30-2004. To make the complete growth medium, add the following components to the base medium: fetal bovine serum to a final concentration of 10%.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: A549 (ATCC® CCL-185™)

Description

Organism: Homo sapiens, human
Tissue: lung
Disease: Carcinoma
Age: 58 years
Gender: male
Morphology: epithelial
Growth Properties: adherent
Isoenzymes:
G6PD, B
DNA Profile:
Amelogenin: X,Y
CSF1PO: 10,12
D13S317: 11
D16S539: 11,12
D5S818: 11
D7S820: 8,11
TH01: 8,9,3
TPOX: 8,11
vWA: 14

Cytogenetic Analysis: This is a hypodiploid human cell line with the modal chromosome number of 66, occurring in 24% of cells. Cells with 64 (22%), 65, and 67 chromosome counts also occurred at relatively high frequencies; the rate with higher ploidies was low at 0.4%. There were 6 markers present in single copies in all cells. They include der(5)(1;5) (q11;q27); ?del(5) (p23); del(11) (q21), del(2) (q11), M4 and M5. Most cells had two X and two Y chromosomes. However, one or both Y chromosomes were lost in 40% of 50 cells analyzed. Chromosomes N2 and N6 had single copies per cell; and N12 and N17 usually had 4 copies. Note: Cytogenetic information is based on initial seed stock at ATCC. Cytogenetic instability has been reported in the literature for some cell lines.

Batch-Specific Information

Refer to the Certificate of Analysis for batch-specific test results.

SAFETY PRECAUTION

ATCC highly recommends that protective gloves and clothing always be used and a full face mask always be worn when handling frozen vials. It is important to note that some vials leak when submerged in liquid nitrogen and will slowly fill with liquid nitrogen. Upon thawing, the conversion of the liquid nitrogen back to its gas phase may result in the vessel exploding or blowing off its cap with dangerous force creating flying debris.

Unpacking & Storage Instructions

1. Check all containers for leakage or breakage.
2. Remove the frozen cells from the dry ice packaging and immediately place the cells at a temperature below -130°C, preferably in liquid nitrogen vapor, until ready for use.

Handling Procedure for Frozen Cells

To insure the highest level of viability, thaw the vial and initiate the culture as soon as possible upon receipt. If upon arrival, continued storage of the frozen culture is necessary, it should be stored in liquid nitrogen vapor phase and not at -70°C. Storage at -70°C will result in loss of viability.

1. Thaw the vial by gentle agitation in a 37°C water bath. To reduce the possibility of contamination, keep the O-ring and cap out of the water. Thawing should be rapid (approximately 2 minutes).
2. Remove the vial from the water bath as soon as the contents are thawed, and decontaminate by dipping in or spraying with 70% ethanol. All of the operations from this point on should be carried out under strict aseptic conditions.
3. Transfer the vial contents to a centrifuge tube containing 9.0 mL complete culture medium, and spin at approximately 125 x g for 5 to 7 minutes.
4. Resuspend cell pellet with the recommended complete medium (see the specific batch information for the culture recommended dilution ratio). It is important to avoid excessive alkalinity of the medium during recovery of the cells. It is suggested that, prior to the addition of the vial contents, the culture

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.538.8537 or 703.365.1700
Fax: 703.365.1710
Email: Tech@atcc.org



ATCC

Product Sheet

A549 (ATCC® CCL-185™)

Please read this FIRST

 **Storage Temp.**
liquid nitrogen
vapor phase

 **Biosafety Level**
1

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Complete Growth Medium

The base medium for this cell line is ATCC-formulated F-12K Medium, Catalog No. 30-2004. To make the complete growth medium, add the following components to the base medium: fetal bovine serum to a final concentration of 10%.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: A549 (ATCC® CCL-185™)

- Inoculate the culture at 37°C in a suitable incubator. A 5% CO₂ in air atmosphere is recommended if using the medium described on this product sheet.



Handling Procedure for Flask Cultures

The flask was seeded with cells (see specific batch information) grown and completely filled with medium at ATCC to prevent loss of cells during shipping.

- Upon receipt visually examine the culture for macroscopic evidence of any microbial contamination. Using an inverted microscope (preferably equipped with phase-contrast optics), carefully check for any evidence of microbial contamination. Also check to determine if the majority of cells are still attached to the bottom of the flask; during shipping the cultures are sometimes handled roughly and many of the cells often detach and become suspended in the culture medium (but are still viable).
- If the cells are still attached, aseptically remove all but 5 to 10 mL of the shipping medium. The shipping medium can be saved for reuse. Incubate the cells at 37°C in a 5% CO₂ in air atmosphere until they are ready to be subcultured.
- If the cells are not attached, aseptically remove the entire contents of the flask and centrifuge at 125 x g for 5 to 10 minutes. Remove shipping medium and save. Resuspend the pelleted cells in 10 mL of this medium and add to 25 cm² flask. Incubate at 37°C in a 5% CO₂ in air atmosphere until cells are ready to be subcultured.



Subculturing Procedure

Volumes used in this protocol are for 75 cm² flask; proportionally reduce or increase amount of dissociation medium for culture vessels of other sizes. Corning® T-75 flasks (catalog #430641) are recommended for subculturing this product.

- Remove and discard culture medium.
- Briefly rinse the cell layer with 0.25% (w/v) Trypsin-0.53 mM EDTA solution to remove all traces of serum that contains trypsin inhibitor.
- Add 2.0 to 3.0 mL of Trypsin-EDTA solution to flask and observe cells under an inverted microscope until cell layer is dispersed (usually within 5 to 15 minutes).
Note: To avoid clumping do not agitate the cells by hitting or shaking the flask while waiting for the cells to detach. Cells that are difficult to detach may be placed at 37°C to facilitate dispersal.
- Add 5.0 to 8.0 mL of complete growth medium and aspirate cells by gently pipetting.
- Add appropriate aliquots of the cell suspension to new culture vessels.
Cultures can be established between 2 x 10⁵ and 1 x 10⁶ viable cells/cm². Do not exceed 7 x 10⁶ cells/cm².
- Inoculate cultures at 37°C.

Interval: Maintain cultures at a cell concentration between 5 X 10⁵ and 6 X 10⁶ cells/cm².

Subcultivation Ratio: A subcultivation ratio of 1:3 to 1:8 is recommended.

Medium Renewal: 2 to 3 times per week.



Cryopreservation Medium

Complete growth medium described above supplemented with 5% (v/v) DMSO.

Cell culture tested DMSO is available as ATCC Catalog No. 4-K.



Comments

Studies by M. Lieber, et al. revealed that A549 cells could synthesize lecithin with a high percentage of desaturated fatty acids utilizing the cytidine diphosphocholine pathway.



References

References and other information relating to this product are available online at www.atcc.org.



Biosafety Level: 1

Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.

ATCC Warranty

American Type Culture Collection
PO Box 1546
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.538.8587 or 703.368.2700
Fax: 703.368.2700
Email: info@atcc.org



Or contact your local distributor



Product Sheet

A549 (ATCC® CCL-185™)

Please read this FIRST

	Storage Temp. liquid nitrogen vapor phase
	Biosafety Level 1

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Complete Growth Medium

The base medium for this cell line is ATCC-formulated F-12K Medium, Catalog No. 30-2004. To make the complete growth medium, add the following components to the base medium: fetal bovine serum to a final concentration of 10%.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: A549 (ATCC® CCL-185™)

The viability of ATCC® products is warranted for 30 days from the date of shipment, and is valid only if the product is stored and cultured according to the information included on this product information sheet. ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this strain. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this strain. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.

Disclaimers

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans. While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate. This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to insure authenticity and reliability of strains on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of cultures. Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is also available on our Web site at www.atcc.org.

Additional information on this culture is available on the ATCC web site at www.atcc.org.
© ATCC 2014. All rights reserved. ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection. [1003]

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800-638-8597 or 703-365-2700
Fax: 703-365-2750
Email: TechSupport@atcc.org

Or contact your local distributor

Page 3 of 3

ANEXO 3

MEDIO DE CONGELACIÓN

1. En un matraz colocar 4 ml de medio RPMI completo
2. 5 ml de suero bovino fetal
3. 1 ml de DMSO

ANEXO 4

CRIOCONGELACIÓN

1. Realizar el conteo de la línea celular que se va a criogenizar.
2. Realizar el procedimiento de Tripsinización
3. En el paso de eliminar el medio de cultivo luego de la centrifugación, queda el pellet de células
4. Al pellet de células se resuspenden en 1 ml de medio de cultivo de congelación y traspasar a un vial
5. Rotular cada criovial y colocarlo en congelación a -20°C por 24 horas.
6. 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.
7. Todos los días revisar si la cantidad de nitrógeno líquido está en la cantidad correcta.

ANEXO 5

DESCONGELACIÓN CELULAR

1. Encender cabina de bioseguridad y esterilizar 15 minutos antes de usar, de igual manera el baño maría a 37°C
2. Tener listo el medio de cultivo RPMI completo e incompleto, el tubo falcón
3. Extraer del tanque de nitrógeno líquido el criovial que deseemos con la cantidad conocidas de cel/ml.
4. Incubar durante 1 minuto el criovial a 37°C hasta q esté descongelado. Evitar que las células permanezcan demasiado tiempo descongeladas.
5. 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.
6. Centrifugar el Falcón a 800 rpm durante 3 minutos para obtener el pellet de células en el fondo.
7. Eliminar el sobrenadante con una pipeta Pasteur y dejar el pellet de células.
8. Resuspender el pellet de células en 4 ml de medio cultivo completo en el caso de crioviales con 1.5×10^6 cel/ml y pipetear suavemente para homogenizar la suspensión.
9. Pasar el contenido del tubo a una botella de cultivo el cual ya contiene 8ml de medio de cultivo completo y mezclar suavemente.
10. Incubar a 37°C al 5% de CO₂.
11. Cambiar el medio de cultivo al día siguiente para eliminar posibles restos de DMSO y células muertas.

ANEXO 6

PREPARACIÓN DE EXTRACTOS EN DIFERENTES CONCENTRACIONES

EXTRACTO ETANÓLICO:

Solución concentrada (Extracto 1 = 1mg/1ml): Pesar 1 mg de extracto y disolver en 100 ul de DMSO al 10%; a los 100 ul de DMSO con extracto ya disuelto agregar 900 ul 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 MEDIO DE CULTIVO RPMI COMPLETO

1. Atemperar medio de cultivo RPMI completo, Suero bovino fetal, penicilina/estreptomina 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. Mezclar bien y guardar en refrigeración, rotulado.

MEDIO DE CULTIVO pH ÁCIDO

1. Al medio de cultivo incompleto pH neutro 7,2 agregar HCL al 1N hasta obtener un pH de 6.8 - 6.9.

Una solución 1N se prepara de la siguiente manera:

- $V1 * N1 = V2 * N2$
- $V2 = (V1 * N1) / N2$

$$\frac{50 * 1}{5} = 10 \text{ ml}$$

V1: quiero preparar

N1: concentración que quiero preparar

V2: lo que quiero calcular

N2: La mayor concentración del HCL que es 5N

2. En un matraz se colocan 10 ml de HCL concentrado y se afora a 50 ml de H₂O destilada y queda la solución de HCL al 1N.
3. En el medio de cultivo incompleto se coloca esta solución gota a gota hasta que el Peachímetro marque el valor necesario hasta que se haga ácido.
4. Un pH ácido torna de color amarillo al medio, un pH neutro es de color anaranjado y un pH alcalino se torna color fucsia.

ANEXO 8

PREPARACIÓN DE CONTROLES POSITIVOS

CISPLATINO

Solución concentrada 1: Se colocan directamente los 25 ul de cisplatino 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 A549

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 mismas y 20 ul de azul de tripano.

ANEXO 10

PARA COLOCAR LAS CÉLULAS EN CADA POCILLO (CÁLCULOS)

LÍNEAS CELULARES (extracto etanólico)

- Una vez realizado el conteo de las líneas celulares ambas resuspendidas en 2 ml de medio de cultivo se debe distribuir la cantidad de células que irá en cada pocillo, en este caso fueron 500.000 cel/pocillo en 500 ul de medio de cultivo
- En este caso se necesitaron 12 000 000 de células resuspendidas en 12 ml de medio de cultivo.
- Se colocan los 500 ul del medio con 500.000 células en cada una y luego se añaden los extractos y los medicamentos como controles positivos en diferentes concentraciones por triplicado.
- Se procede a incubar las placas de cultivo en la incubadora de CO2 al 5% y con humedad del 98%

ANEXO 11

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

ANEXO 12

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:

Confluencia = número de células elongadas * 100 dividido para el total de células vivas.

ANEXO 13

Certificado de haber realizado los ensayos de campo correspondiente en los laboratorios de Investigaciones de la UNL del centro de Biotecnología.



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. **Karla del Cisne Durán Hernández**, estudiante del **VIII MÓDULO** de la Carrera de **LABORATORIO CLÍNICO**, con cédula de identidad 1105146631 realizó sus prácticas en el laboratorio de cultivos celulares como parte de su tesis (ensayos de citotoxicidad) en el Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja, los días 25, 26, 27, 28 de mayo de 2015, en los horarios de 8H00 a 10H30 y de 16H30 a 18H30

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

24 HORAS

24 HORAS					
A549 +EXTRACTO 1	A549 +EXTRACTO 2	A549 +EXTRACTO 3	A549 +CISPLATINO 1	A549 + CISPLATINO2	A549 + CISPLATINO 3
V 50 73.5% M 18 26.5%	V 49 78.4% M 16 24.6%	V 42 70% M 14 20%	V 36 63.2% M 21 36.8%	V 43 68.3% M 20 31.7%	V 54 76.1% M 17 23.9%
V 61 75.3% M 20 24.7%	V 48 76.2% M 15 23.8%	V 50 80.3% M 10 16.6%	V 40 63.8% M 23 36.8%	V 38 60.3% M 25 39.7%	V 40 72.2% M 15 27.3%
V 45 71.4% M 18 28.5% T=26.6%	V 40 74.1% M 14 25.9% T=24.8%	V 56 82.4% M 12 17.6% T=19.7%	V 52 67.6% M 25 32.8% T=35.3%	V 45 70.3% M 19 29.7% T=33.7%	V 66 79.6% M 17 20.5% T=23.9%
LH + EXTRACTO 1	LH + EXTRACTO 2	LH + EXTRACTO 3	A549+25 uISOLVENTE	A549 CON MC	
V 60 86.7% M 10 14.3%	V 50 95.6% M 4 7.4%	V 36 90% M 4 10%	V 50 78.8% M 16 24.2%	V 68 88.3% M 9 11.7%	
V 48 72.7% M 18 27.2%	V 43 94.2% M 3 5.8%	V 42 93.3% M 3 6.6%	V 44 78.6% M 12 21.4%	V 47 72.3% M 18 27.7%	
V 36 67.9% M 17 32.1% T=24.5%	V 40 93% M 3 7% T=6.7%	V 40 93% M 3 7% T=7.8%	V 33 72.2% M 15 27.7% T=24.4%	V 40 80% M 10 20% T=19.8%	

36 HORAS

36 HORAS					
A549 +EXTRACTO 1	A549 +EXTRACTO 2	A549 +EXTRACTO 3	A549 +CISPLATINO 1	A549 + CISPLATINO2	A549 + CISPLATINO 3
V 45 64.5% M 25 35.7%	V 70 74.5% M 24 25.5%	V 67 77.9% M 19 22.1%	V 40 51.6% M 37 48.05%	V 70 73.7% M 25 26.3%	V 80 80% M 20 20%
V 46 63.01% M 27 36.9%	V 47 60.1% M 24 33.8%	V 60 74.07% M 21 25.9%	V 40 44.4% M 50 55.6%	V 67 72.01% M 20 22.9%	V 87 87% M 13 13%
V 49 62.02% M 30 37.9% T=36.2%	V 55 67.9% M 26 32.1% T=30.5%	V 58 69% M 26 30.9% T=26.3%	V 30 44.1% M 38 55.8% T=53.16%	V 70 74.6% M 24 25.5% T=24.9%	V 85 85% M 15 15% T=36%
LH + EXTRACTO 1	LH + EXTRACTO 2	LH + EXTRACTO 3	A549+25 uISOLVENTE	A549 CON MC	
V 23 43.4% M 30 56.6%	V 70 93.3% M 5 6.6%	V 67 97.3% M 2 2.9%	V 82 84.5% M 15 15.5%	V 59 85.5% M 10 14.5%	
V 26 46.4% M 30 53.6%	V 72 93.8% M 5 6.5%	V 81 95.3% M 4 4.7%	V 63 71.6% M 25 28.4%	V 46 74.2% M 16 25.8%	
V 30 44.4% M 35 55.5% T=55.3%	V 71 88.8% M 9 11.2% T=8.7%	V 78 96.3% M 3 3.7% T=3.87%	V 50 76.9% M 15 23.1% T=22.3%	V 50 78.1% M 14 21.9% T=20.7%	

64,5%
74,5%
77,9%
51,6%
73,7%
80%

84,5%
85,5%
84,5%
84,5%
85,5%
85,5%

48 HORAS

48 HORAS X			X		
A549 +EXTRACTO 1 V 47 57.3% M 35 42.7%	A549 +EXTRACTO 2 V 60 60.9% M 31 34.0%	A549 +EXTRACTO 3 V 60 73.2% M 22 26.8%	A549 +CISPLATINO 1 V 12 14.6% M 70 85.3%	A549 + CISPLATINO2 V 47 65.3% M 25 34.7%	A549 + CISPLATINO 3 V 44 61.1% M 28 38.8%
V 45 56.3% M 35 43.8%	V 50 66.6% M 25 33.3%	V 40 65.6% M 21 34.4%	V 8 11.9% M 59 88.1%	V 53 61.6% M 33 38.4%	V 42 67.7% M 20 32.3%
V 46 53.5% M 40 46.5% T=44.3%	V 42 58.3% M 30 41.6% T=36.3%	V 57 60.6% M 37 39.4% T=33.2%	V 20 23.3% M 66 76.7% T=23.4%	V 78 64% M 27 36% T=36.4%	V 60 73.2% M 22 26.9% T=32.6%
LH + EXTRACTO 1 V 8 15.38% M 44 84.6%	LH + EXTRACTO 2 V 50 71.6% M 17 25.4%	LH + EXTRACTO 3 V 61 85.9% M 10 14.1%	A549+25 uISOLVENTE V 52 75.4% M 17 24.6%	A549 CON MC V 42 76.3% M 13 23.6%	
V 7 11.9% M 40 88.1%	V 62 82.6% M 13 17.3%	V 53 86.8% M 8 13.2%	V 48 76.2% M 15 23.8%	V 50 75.3% M 16 24.2%	
V 2 2.84% M 50 96.2% T=86.6%	V 68 91.9% M 6 8.10 T=16.9%	V 66 85.7% M 11 14.2% T=13.8%	V 58 76.3% M 18 23.7% T=24.03%	V 52 78.8% M 14 21.3%	

60 HORAS

60 HORAS					
A549 +EXTRACTO 1 V 10 18.2% M 45 81.8%	A549 +EXTRACTO 2 V 26 44.8% M 32 53.2%	A549 +EXTRACTO 3 V 30 62.0% M 18 37.5%	A549 +CISPLATINO 1 V 5 8.5% M 54 91.5%	A549 + CISPLATINO2 V 48 65.8% M 25 34.2%	A549 + CISPLATINO 3 V 70 67.9% M 33 32%
V 9 20.5% M 35 79.5%	V 38 57.5% M 28 42.4%	V 32 57.1% M 24 42.9%	V 10 14.1% M 61 85.9%	V 20 41.6% M 28 58.3%	V 45 64.3% M 25 35.7%
V 10 19.2% M 48 82.7% T=81.4%	V 36 58.06% M 26 41.9% T=46.5%	V 40 64.5% M 22 35.5% T=38.6%	V 15 18.5% M 66 81.5% T=86.3%	V 30 49.2% M 31 50.8% T=47.8%	V 50 71.4% M 20 28.5% T=32%
LH + EXTRACTO 1 V 10 19.2% M 42 80.8%	LH + EXTRACTO 2 V 61 89.9% M 7 10.3%	LH + EXTRACTO 3 V 60 86.9% M 9 13.1%	A549+25 uISOLVENTE V 75 78.9% M 20 21%	A549 CON MC V 57 82.6% M 12 17.4%	
V 15 30% M 35 70%	V 73 93.6% M 5 6.4%	V 50 87.7% M 7 12.3%	V 67 78.8% M 18 21.2%	V 62 80.5% M 15 19.5%	
V 16 30.2% M 37 69.8% T=73.5%	V 67 85.9% M 11 14.1% T=10.3%	V 67 83.8% M 13 16.2% T=13.9%	V 70 74.5% M 24 25.5% T=22.5%	V 60 81.1% M 14 18.9% T=18.6%	

72 HORAS

72 HORAS						
	16,6%	60,7%	57,5%	11,8%	69,4%	60,6%
A549 +EXTRACTO 1	A549 +EXTRACTO 2	A549 +EXTRACTO 3	A549 +CISPLATINO 1	RKO + CISPLATINO 2	RKO + CISPLATINO 3	
V 12 16.6% M 60 83.3%	V 37 60.7% M 24 39.3%	V 33 57.9% M 24 42.1%	V 10 11.8% M 75 88.2%	V 68 69.4% M 30 30.6%	V 40 60.6% M 26 39.4%	
V 10 15.4% M 55 84.6%	V 30 54.5% M 25 45.5%	V 50 68.7% M 26 34.2%	V 12 13.5% M 76 86.4%	V 40 57.1% M 30 42.8%	V 38 60.3% M 25 39.7%	
V 8 16% M 42 84% IT=58.9%	V 30 46.9% M 34 53.1% IT=45.9%	V 62 77.5% M 27 22.5% IT=32.9%	V 14 14.7% M 81 85.3% IT=86.6%	V 44 61.9% M 27 38.0% IT=37.1%	V 41 66.1% M 21 33.8% IT=37.6%	
LH + EXTRACTO 1	LH + EXTRACTO 2	LH + EXTRACTO 3	A549+25 uISOLVENTE	A549 CON MC		
V 12 28.6% M 30 71.4%	V 56 91.8% M 5 8.2%	V 65 89.04% M 8 10.9%	V 85 79.5% M 23 20.5%	V 68 83.9% M 13 16%		
V 13 28.2% M 33 71.7%	V 52 83.9% M 10 16.1%	V 67 87.01% M 10 12.9%	V 45 72.6% M 17 27.4%	V 48 78.7% M 13 21.3%		
V 8 16.6% M 40 83.3% IT=78.8%	V 45 80.4% M 11 19.6% IT=14.6%	V 32 90% M 8 10% IT=11.3%	V 52 70.3% M 22 29.7% IT=25.9%	V 57 77.6% M 15 22.4% IT=59.7%		
	no hay		70,5%	83,5%		• Azules Cor

ANEXO 15

Respaldo del Contaje de Células en Proliferación Celular

ENSAYO DE: Extracto etanólico de las hojas de Anonna Frente a células A549 en Medio de Cultivo pH ácido

FECHA: 25 de Mayo 2015 **HORA:** 17h00 **RESPONSABLE:** Lic. Carmen Pineda

6 HORAS

A 549 + EXTRACTO 1	A 549 + EXTRACTO 2	A 549 + EXTRACTO 2	A 549 + CISPLATINO 1	A 549 + CISPLATINO 2	A 549 + CISPLATINO 3
V: 100 % CC: 0	V: 100 % CC: 0	V: 100 % CC: 0	V: 100 % CC: 0	V: 100 % CC: 0	V: 100 % CC: 0
A 549 + ul SOLVENTE	A549 + MC				
V: 100 % CC: 0	V: 100 % CC: 0				

36 HORAS

A 549 + EXTRACTO 1	A 549 + EXTRACTO 2	A 549 + EXTRACTO 2	A 549 + CISPLATINO 1	A 549 + CISPLATINO 2	A 549 + CISPLATINO 3
V: 64.5 % CC: 20	V: 74.5 % CC: 52	V: 77.9 % CC: 52	V: 57.5 % CC: 23	V: 73.7 % CC: 52	V: 80 % CC: 64
A 549 + ul SOLVENTE	A549 + MC				
V: 84.5 % CC: 69	V: 85.5 % CC: 50				

72 HORAS

A 549 + EXTRACTO 1	A 549 + EXTRACTO 2	A 549 + EXTRACTO 2	A 549 + CISPLATINO 1	A 549 + CISPLATINO 2	A 549 + CISPLATINO 3
V: 16.6 % CC: 2	V: 60.7 % CC: 22	V: 57.9 % CC: 19	V: 11.8 % CC: 1	V: 69.4 % CC: 47	V: 60.6 % CC: 24
A 549 + ul SOLVENTE	A549 + MC				
V: 79.5 % CC: 71	V: 83.9 % CC: 57				

ANEXO 16

ETANÓLICO pH ÁCIDO CELULAS A549

EXTRACTO

ADEVA

		Suma de	C.Medio del		
FV(F.de V)	GL	cuadrados SM	error CME	FC	FT
trat	27	29141.50189	1079.31488	61.62	1.72
repet	2	65.02127	32.51063	1.86	0.1661
Error	54	945.84900	17.51572		
Corr Total	83	30152.37216			

R-Cuadrado	Coef. Var	Raiz MSE	Media de Resultado
0.968631	14.52749	4.185179	28.80869

DUNCAN

Alpha	0.05
-------	------

T-STUDENT

Valor.Medio	T Calculado	T Tabulado
13.0714286	2.14	2.16

CISPLATINO

ADEVA

		Suma de	Cf. Medio de		
FV(F.de V)	GL	Cuadrados SC	error CME	FC	FT
trat	27	40160.59217	1487.42934	86.47	1.72
repet	2	135.00849	67.50425	3.92	0.0256
Error ex	54	928.88037	17.20149		
ErrorTotal	83	41224.48103			

R-Cuadrado	Coef. Variac	Raiz MSE	Media de Resultados
0.977468	13.19874	4.147468	31.42321

DUNCAN

Alpha	0.05
-------	------

T-STUDENT

Valor Medio	T Calculado	T. Tabulado
23.6285714	3.03	2.16

LINFOCITOS

ADEVA

		Suma de	Coef. Medio del		
FV(F.de V)	GL	Cuadrados SC	error CME	FC	FT
trat	27	57063.94846	2113.47957	115.04	1.72
repet	2	32.43632	16.21816	0.88	0.4195
Error EX	54	992.10282	18.37227		
ErrorTotal	83	58088.48760			

R-Cuadrado	Coef Variacion	Raiz MSE	Medias de Resultados
0.982921	18.49151	4.286289	23.17976

DUNCAN

Alpha	0.05
-------	------

T-STUDENT

Valor Medio	T Calculado	T.Tabulado
22.5714286	1.97	2.16

Guía de respaldo del Procedimiento Estadístico de los Resultados
con el Programa Informático SAS

ETANÓLICO PH ÁCIDO CELULAR A549

EXTRACTO

A549 + EXTRACTO 1						
6	12	24	36	48	60	72
9.09	18.07	26.5	35.7	42.7	81.8	83.3
12	16.41	24.7	36.9	43.8	79.5	84.6
15.1	19.73	28.5	37.9	46.5	82.7	84
12.1	18.1	26.6	36.8	44.3	81.3	84.0
42.19	66.21	103.7	146.5	181	304	323.9

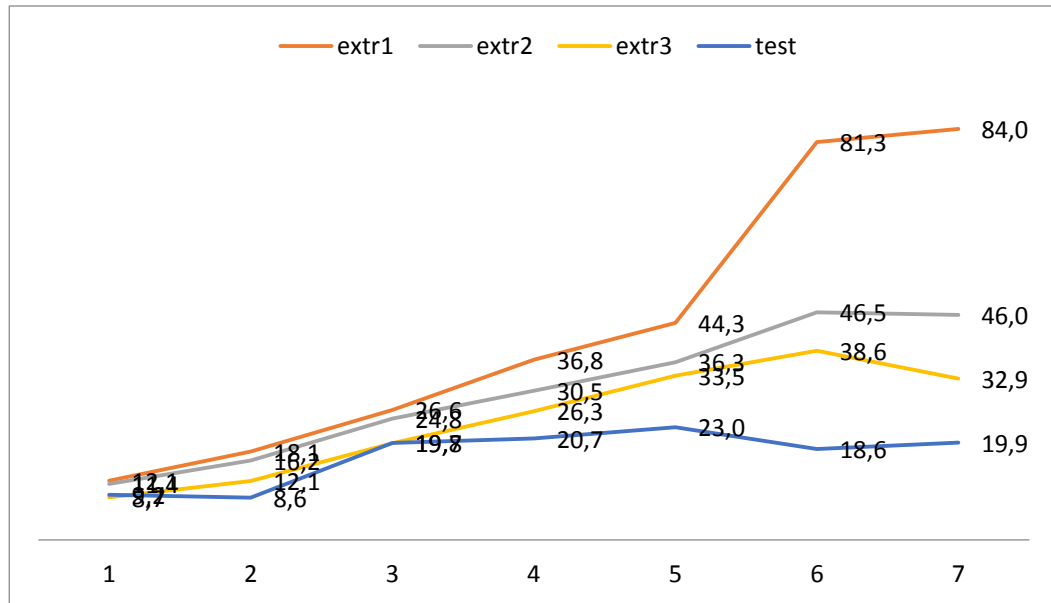
A549 + EXTRACTO 2						
6	12	24	36	48	60	72
12.8	12.2	24.6	25.5	34.06	55.2	39.3
12.34	19.5	23.8	33.8	33.3	42.4	45.5
9.19	17	25.9	32.1	41.6	41.9	53.1
11.4	16.2	24.8	30.5	36.3	46.5	46.0
40.33	60.7	98.3	127.4	156.96	199.5	209.9

A549 + EXTRACTO 3						
6	12	24	36	48	60	72
8.2	10.8	25	22.1	26.8	37.5	42.1
6.76	13	16.6	25.9	34.4	42.9	34.2
11.1	12.37	17.6	30.9	39.4	35.5	22.5
8.7	12.1	19.7	26.3	33.5	38.6	32.9
32.06	48.17	83.2	114.9	148.6	175.9	170.8

TESTIGO						
6	12	24	36	48	60	72
9.21	6.17	11.7	14.5	23.6	17.4	16
10.81	10.3	27.7	25.8	24.2	19.5	21.3
7.69	9.4	20	21.9	21.2	18.9	22.4
9.2	8.6	19.8	20.7	23.0	18.6	19.9
33.71	37.87	83.4	98.2	117	115.8	131.7

horas	extr1	extr2	extr3	Test
6	12.1	11.4	8.7	9.2
12	18.1	16.2	12.1	8.6
24	26.6	24.8	19.7	19.8
36	36.8	30.5	26.3	20.7
48	44.3	36.3	33.5	23.0
60	81.3	46.5	38.6	18.6
72	84.0	46.0	32.9	19.9

Resultados con el Programa Informático SAS



Obs	trat	repet	valor
1	rko_ext1_6	1	9.09
2	rko_ext1_6	2	12.00
3	rko_ext1_6	3	15.10
4	rko_ext1_12	1	18.07
5	rko_ext1_12	2	16.41
6	rko_ext1_12	3	19.73
7	rko_ext1_24	1	26.50
8	rko_ext1_24	2	24.70
9	rko_ext1_24	3	28.50
10	rko_ext1_36	1	35.70
11	rko_ext1_36	2	36.90
12	rko_ext1_36	3	37.90
13	rko_ext1_48	1	42.70
14	rko_ext1_48	2	43.80
15	rko_ext1_48	3	46.50
16	rko_ext1_60	1	81.80
17	rko_ext1_60	2	79.50
18	rko_ext1_60	3	82.70
19	rko_ext1_72	1	83.30
20	rko_ext1_72	2	84.60
21	rko_ext1_72	3	84.00
22	rko_ext2_6	1	12.80
23	rko_ext2_6	2	12.30
24	rko_ext2_6	3	9.20
25	rko_ext2_12	1	12.20
26	rko_ext2_12	2	19.50
27	rko_ext2_12	3	17.00
28	rko_ext2_24	1	24.60
29	rko_ext2_24	2	23.80
30	rko_ext2_24	3	25.90
31	rko_ext2_36	1	25.50
32	rko_ext2_36	2	33.80
33	rko_ext2_36	3	32.10
34	rko_ext2_48	1	34.06
35	rko_ext2_48	2	33.30
36	rko_ext2_48	3	41.60
37	rko_ext2_60	1	55.20
38	rko_ext2_60	2	42.40

39	rko_ext2_60	3	41.90	62	rko_ext3_72	2	34.20
40	rko_ext2_72	1	39.30	63	rko_ext3_72	3	22.50
41	rko_ext2_72	2	45.50	64	test_6	1	9.20
42	rko_ext2_72	3	53.10	65	test_6	2	10.80
43	rko_ext3_6	1	8.20	66	test_6	3	7.70
44	rko_ext3_6	2	6.80	67	test_12	1	6.17
45	rko_ext3_6	3	11.10	68	test_12	2	10.30
46	rko_ext3_12	1	10.80	69	test_12	3	9.40
47	rko_ext3_12	2	13.00	70	test_24	1	11.70
48	rko_ext3_12	3	12.40	71	test_24	2	27.70
49	rko_ext3_24	1	25.00	72	test_24	3	20.00
50	rko_ext3_24	2	16.60	73	test_36	1	14.50
51	rko_ext3_24	3	17.60	74	test_36	2	25.80
52	rko_ext3_36	1	22.10	75	test_36	3	21.90
53	rko_ext3_36	2	25.90	76	test_48	1	23.60
54	rko_ext3_36	3	30.90	77	test_48	2	24.20
55	rko_ext3_48	1	26.80	78	test_48	3	21.20
56	rko_ext3_48	2	34.40	79	test_60	1	17.40
57	rko_ext3_48	3	39.40	80	test_60	2	19.50
58	rko_ext3_60	1	37.50	81	test_60	3	18.90
59	rko_ext3_60	2	42.90	82	test_72	1	16.00
60	rko_ext3_60	3	35.50	83	test_72	2	21.30
61	rko_ext3_72	1	42.10	84	test_72	3	22.40

The GLM Procedure

Class Level Information

Class Levels Values

trat 28 rko_ext1_12 rko_ext1_24 rko_ext1_36 rko_ext1_48 rko_ext1_6 rko_ext1_60
rko_ext1_72 rko_ext2_12 rko_ext2_24 rko_ext2_36 rko_ext2_48 rko_ext2_6 rko_ext2_60
rko_ext2_72 rko_ext3_12 rko_ext3_24 rko_ext3_36 rko_ext3_48 rko_ext3_6 rko_ext3_60
rko_ext3_72 test_12 test_24 test_36 test_48 test_6 test_60 test_72

repet 3 1 2 3

Number of observations 84

The GLM Procedure **ADEVA**

Dependent Variable: valor

		Suma de	C.Medio del			
FV(F.de V)	GL	cuadrados	SM error	CME	FC	Pr > F
trat	27	29141.50189	1079.31488	61.62	<.0001	
repet	2	65.02127	32.51063	1.86	0.1661	
Error	54	945.84900	17.51572			
Corr Total	83	30152.37216				

R-Square	Coeff Var	Root MSE	valor Mean
0.968631	14.52749	4.185179	28.80869

The GLM Procedure **DUNCAN**

Duncan's Multiple Range Test for valor

Alpha 0.05

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	trat
A	83.967	3	rko_ext1_72
A	81.333	3	rko_ext1_60
B	46.500	3	rko_ext2_60
B	45.967	3	rko_ext2_72
C B	44.333	3	rko_ext1_48
C D	38.633	3	rko_ext3_60
E D	36.833	3	rko_ext1_36
E D	36.320	3	rko_ext2_48
E D F	33.533	3	rko_ext3_48
E D F	32.933	3	rko_ext3_72
E G F	30.467	3	rko_ext2_36
H G F	26.567	3	rko_ext1_24
H G F	26.300	3	rko_ext3_36
H G I	24.767	3	rko_ext2_24
H J G I	23.000	3	test_48
H J I	20.733	3	test_36
H J K I	19.900	3	test_72
H J K I	19.800	3	test_24
H J K I	19.733	3	rko_ext3_24
L H J K I	18.600	3	test_60
L J K I	18.070	3	rko_ext1_12
L M J K	16.233	3	rko_ext2_12
L M K	12.067	3	rko_ext3_12
L M K	12.063	3	rko_ext1_6
L M	11.433	3	rko_ext2_6
M	9.233	3	test_6
M	8.700	3	rko_ext3_6
M	8.623	3	test_12

The MEANS Procedure
Analysis Variable : diferen

Mean	t Value	Pr > t
13.0714286	2.14	0.0764

Trabajo de Campo

**VISUALIZACIÓN DE
CÉLULAS VIVAS Y
ELONGADAS**



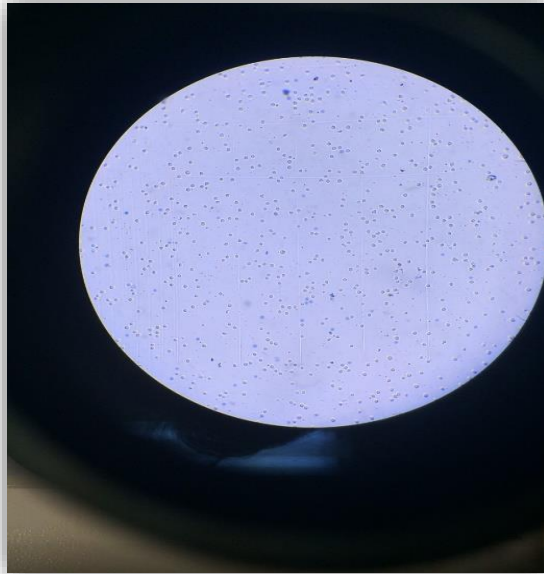
**SUSPENSIÓN DE CÉLULAS
A549 + EXTRACTOS,
FÁRMACOS Y CONTROLES**



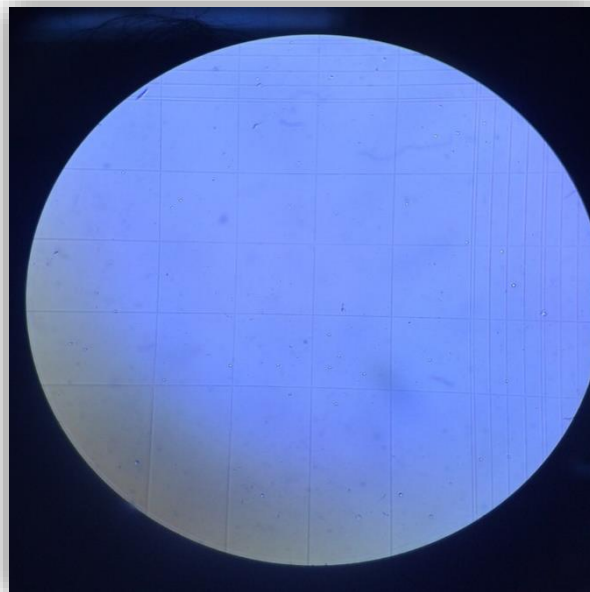
**PREPARACIÓN DE LAS
CÉLULAS CON AZUL DE
TRIPANO**



**VISUALIZACIÓN DE
CÉLULAS VIVAS Y
MUERTAS**



**VISUALIZACIÓN DE CÉLULAS
VIVAS Y MUERTAS EN EL
TRANCURSO DE HORAS**



12. ÍNDICE

PORTADA	i
CERTIFICACIÓN	ii
AUTORÍA	iii
CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS	iv
AGRADECIMIENTO	v
DEDICATORIA	vi
1. TÍTULO	1
2. RESUMEN	2
3. INTRODUCCIÓN	4
4. REVISIÓN DE LITERATURA	7
4.1. Medicina Tradicional	7
4.2. Planta Medicinales	7
4.3. Fitoquímicos	8
4.4. Principio Activo	8
4.5. Annona cherimola	9
4.5.1. Taxonomía y morfología	9
4.5.2. Origen	9
4.5.3. Usos y beneficios	9
4.6. Composición química de las Hojas de Annona Cherimola	10
4.6.1. Metabolitos	10
4.6.1.1. Metabolitos Secundarios	11
4.6.1.1.1. Terpenos	12
4.6.1.1.1.1. Acetogeninas	13
4.7. Extractos	13
4.7.1. Extracto Etanólico	13
4.7.2. Métodos de obtención de extracto Etanólico	14
4.7.2.1. Maceración	14
4.7.2.2. Percolación	14
4.8. Cultivo Celular	14
4.8.1. Tipos de cultivo celular	15
4.8.1.1. Cultivo Primario	15

4.8.1.2.	Cultivo Secundario.....	15
4.9.	Líneas celulares.....	16
4.9.1.	Tipos de crecimiento celular	16
4.9.1.1.	Células adherentes o cultivos fijos	16
4.9.1.2.	Células no adherentes o cultivos en suspensión.....	16
4.10.	Factores Básicos para la supervivencia celular.....	16
4.11.	Medios de cultivo	17
4.12.	Viabilidad celular.....	17
4.13.	Proliferación celular	18
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
5.3.1	<i>Fase pre-analítica</i>	19
5.3.2	<i>Fase analítica</i>	19
5.3.2.1	<i>Controles Negativos y Controles positivos:</i>	19
5.3.3	<i>Fase post- analítica</i>	20
6.	RESULTADOS.....	22
7.	DISCUSIÓN	29
8.	CONCLUSIONES.....	31
9.	RECOMENDACIONES.....	32
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	33
11.	ANEXOS	38
12.	ÍNDICE.....	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N.- 1 Proliferación de células a549 con el extracto etanólico en medio de cultivo con pH ácido.....	28
Tabla N.- 2 Proliferación de células a549 con el cisplatino en un medio de cultivo con pH ácido.....	29
Tabla N.- 3 Proliferación de células a549 en medio de cultivo* con pH ácido.....	30
Tabla N.- 4 Células a549 con el extracto etanólico de hojas de <i>annonna cherimola</i> en un medio de cultivo con pH ácido.....	31
Tabla N.- 5 Células a549 con el cisplatino en un medio de cultivo con pH ácido.....	32
Tabla N.- 6 Cultivo de células normales con el extracto etanólico de hojas de <i>annonna cherimola</i> en un medio de cultivo con pH ácido.....	33
Tabla N.- 7 Comparación del efecto citotóxico del extracto etanólico (concentrado) y antitumoral (concentrado) sobre células a549 en medio de cultivo con pH ácido.....	34

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO N.- 1 Oficio para la participación del proyecto de investigación.....	46
ANEXO N.- 2 Obtención de la línea celular a549.....	47
ANEXO N.-3 Medio de congelación.....	50
ANEXO N.- 4 Criocongelación.....	51
ANEXO N.- 5 Descongelación celular.....	52
ANEXO N.-6 Preparación de extractos en diferentes concentraciones.....	53
ANEXO N.- 7 Preparación de medio de cultivo RPMI completo.....	54
ANEXO N.- 8 Preparación de controles positivos.....	55
ANEXO N.- 9 Tripsinización de células a549.....	56
ANEXO N.- 10 Para colocar las células en cada pocillo (cálculos).....	57
ANEXO N.- 11 Contaje de células con azul de tripano (viabilidad celular).....	58
ANEXO N.- 12 Proliferación celular.....	59
ANEXO N.- 13 Certificado de haber realizado los ensayos de campo correspondiente en los laboratorios de investigaciones de la UNL del centro de biotecnología.....	60
ANEXO N.- 14 Respaldo del contaje de células en viabilidad celular.....	61
ANEXO N.- 15 Respaldo del contaje de células en proliferación celular.....	62
ANEXO N.- 16 Etanólico pH ácido celular a549.....	63