



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**

**ÁREA DE LA SALUD HUMANA**

**CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO**

**NIVEL DE PREGRADO**

**TÍTULO:**

EFFECTO CITOTÓXICO DEL EXTRACTO ACUOSO DE LAS HOJAS DE *Annona cherimola* EN UNA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE PULMÓN EN MEDIO DE CULTIVO CON pH ÁCIDO.

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

**AUTORA:**

Mayra Alexandra Medina Lanche.

**DIRECTORA:**

Dra. Paola Mercedes Benítez Castrillón, Mg. Sc

**Loja- Ecuador**

2015

## CERTIFICACIÓN

Dra. Paola Benítez

**DIRECTORA DE TESIS**

### CERTIFICA:

Que la presente tesis titulada “EFECTO CITOTÓXICO DEL EXTRACTO ACUOSO DE LAS HOJAS DE *Annona cherimola* EN UNA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE PULMÓN EN MEDIO DE CULTIVO CON pH ÁCIDO”.

Elaborada por Mayra Alexandra Medina Lanche, ha sido desarrollada, corregida y orientada bajo mi dirección, cumpliendo con los requerimientos académicos estipulados para su aprobación. Por lo tanto autorizo su presentación, para los fines pertinentes.

Loja, 20 Noviembre del 2015



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

**DIRECTORA DE TESIS**

## AUTORÍA

Los criterios emitidos en el contenido del presente trabajo, denominado: "EFECTO CITOTÓXICO DEL EXTRACTO ACUOSO DE LAS HOJAS DE *Annona cherimola* EN UNA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE PULMÓN EN MEDIO DE CULTIVO CON pH ÁCIDO", así como su análisis y conclusiones son de exclusiva responsabilidad del autor.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi tesis en el Repositorio Institucional-Biblioteca Virtual.

Loja, 20 de Noviembre del 2015



CI: 1105199077

MAYRA ALEXANDRA MEDINA LANCHE

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

Yo, **Mayra Alexandra Medina Lanche**, CI:1105199077 declaró, ser la autora de la tesis titulada: **“EFECTO CITOTÓXICO DEL EXTRACTO ACUOSO DE LAS HOJAS DE *Annona cherimola* EN UNA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE PULMÓN EN MEDIO DE CULTIVO CON pH ÁCIDO”**, como requisito para optar el grado de **Licenciada en Laboratorio Clínico**, autorizo, al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional del 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 (R.D.I.)

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

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

Para la constancia en la ciudad de Loja, a los 20 días del mes de Noviembre del dos mil quince, firma el autor.

Firma:.....

Autor: Mayra Alexandra Medina Lanche

CI: 1105199077

Dirección: Loja

Correo: mairamed92@gmail.com

Teléfono: 072572-547

Celular: 0939656544

**Datos complementarios**

**Director de tesis:** Dra. Paola Mercedes Benítez Castrillón, Mg. Sc.

**Tribunal de Grado:**

Dra. Elsa Cumandá Ramírez Sanmartín, Mg. Sc. **(Presidenta)**

Dra. Diana Alexandra Montaña Peralta, Mg. Sc. **(Vocal)**

Lic. María del Cisne Loján González, Mg. Sc. **(Vocal)**

## **DEDICATORIA.**

El presente trabajo investigativo va dedicado a Dios por brindarme la fortaleza y sabiduría necesaria para culminar con éxito mis estudios.

A mi madre por regalarme su amor incondicional y esta maravillosa profesión.

MAYRA ALEXANDRA MEDINA LANCHE.

## **AGRADECIMIENTO**

Por medio del presente quiero expresar mi sincero agradecimiento a Dios y a mi madre santísima la Virgen del Cisne, por siempre iluminarme durante toda mi vida estudiantil que gracias, a su palabra brindada me ha dado la suficiente fe, para poder cumplir este sueño que parecía ser imposible.

A mi madre que a pesar de no siempre estar a mi lado ha sabido brindarme su apoyo incondicional moral y económico en todo momento.

Mi eterna gratitud a la planta docente de la carrera de Laboratorio Clínico del Área de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja, por sus conocimientos impartidos, de manera especial a mi directora de tesis Dra. Paola Benítez, por la acertada orientación, paciencia y asesoría en el desarrollo del presente trabajo investigativo.

A los investigadores Dr. Miguel Marín y Lic. Carmen Pineda del Laboratorio de cultivo celular del centro de biotecnología de la Universidad Nacional de Loja que me permitieron participar en la presente investigación.

Y en general a todas las personas que me supieron brindar sus consejos que me motivaron a no desmayar y culminar con éxito mi profesión.

MAYRA ALEXANDRA MEDINA LANCHE

## **1. TÍTULO**

EFFECTO CITOTÓXICO DEL EXTRACTO ACUOSO DE LAS HOJAS DE *Annona cherimola* EN UNA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE PULMÓN EN MEDIO DE CULTIVO CON pH ÁCIDO.

## 2. RESUMEN:

Las acetogeninas pertenecientes al género *Annona* en diversos ensayos intra-laboratorio, han demostrado, su actividad citotóxica frente a células tumorales A-549; en virtud de ello hemos desarrollado la presente investigación con diseño experimental-prospectivo orientada a evaluar el efecto citotóxico del extracto acuoso de las hojas de *Annona cherimola* en una línea celular de cáncer de pulmón en un medio de cultivo con pH ácido; enfocada a determinar el grado de proliferación y viabilidad de las células A-549, frente al extracto; mediante técnicas de proliferación celular que consisten en valorar el desarrollo celular, mientras que, su viabilidad (muertas-vivas) se determinó mediante la tinción con azul de tripán cada 6 horas durante 4 días. Para concluir este estudio, se utilizó, un control positivo (células A-549 frente al cisplatino) y un control negativo (células A-549 frente al medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute (R.P.M.I) completo) como control de calidad del estudio. El grado de proliferación celular en las A-549 frente al extracto acuoso de las hojas de *Annona ch.* en diferentes concentraciones (concentrado , 1:10 –1:50) a las 6 horas da un 0% de confluencia, por lo tanto a las 36 horas en las diferentes concentraciones respectivamente se obtiene un: 74,4%, 71,9% y 80,5% sin embargo a las 72 horas se disminuye su desarrollo, adquiriendo los siguientes valores: 68,2%, 61,1% y 64,7%; al valorar la viabilidad celular se consiguió una citotoxicidad de: 89,2% frente al medicamento y un 34,4% en extracto acuoso de las hojas de *Annona ch.*, en cambio las células normales frente al extracto acuoso de las hojas de *Annona ch.* diluido 1:10 desarrolla un 10,9% a las 72 horas de incubación. Finalmente se concluye que el nivel de citotoxicidad del extracto acuoso de las hojas de *Annona ch.* frente a las células A-549 y mononucleares es bajo en relación al cisplatino que provoca una alta citotoxicidad.

**Palabras clave:** *Annonae cherimola*, acetogeninas, citotóxico, pH ácido, cáncer pulmonar, proliferación celular y viabilidad celular.



## **SUMMARY:**

The Acetogenins which belong to the genre *Annona* in several intra-laboratory tests have shown their cytotoxic activity against tumor cells; therefore we have developed the following investigation with an experimental-perspective design guided to evaluate the cytotoxic effect of aqueous extracts from the *Annona cherimola* leaves in the line cell of lung cancer with a medium crop of Ph. acid, its focused to determine the grade/level of proliferation and the viability of A-549 cells versus the extract of the proliferation cell technique which consists on assessing the cell development meanwhile its viability (living-dead) was determined through blue staining tripán every 6 hours during 4 days. In order to conclude this study we used a positive control (cells a-549 in front of cisplatin) and a negative control (cells A-549 in front of the medium crop Roswell Park Memorial Institute (R.P.M.I.) completed) in order to control the quality of the study. The proliferation cell degree in A-549 versus the extract aqueous from the *Annona ch.* leaves in different concentrations (concentrated, 1:10-1:50) in 6 hours' time gives a 0% of confluence meanwhile in 36 hours of different concentration we can clearly obtain a 74,4%, 71,9% y 80,5% ; nevertheless at 72 hours his development is diminished acquiring the following values 68,2 %, 61,1% and a 64,7%; meanwhile in order to assess its cell viability an 82,2% of cytotoxicity was acquired with the medicine, and a 34,4% in extract while normal cells, versus the diluted 1:10 extract from the *Annona ch.* leaves develop a 10,9% during the first 72 hours of incubation. Finally we can conclude the level of cytotoxicity from the extract from the *Annona ch.* leaves versus the cells A-549 and Mo nuclear is very low in relation to the cisplatin which causes a high cytotoxicity.

**Key Words:** - *Annona Cherimola*, Acetogenins, Cytotoxicity, pH acid, Lung cancer, Proliferation Cellular and Viability Cellular.

### 3. INTRODUCCIÓN

Las plantas naturales son consideradas desde la antigüedad como el primer recurso para el cese de distintas patologías como; parasitarias, bacteriológicas, oncológicas entre otras, con la finalidad, de mantener la salud, basándose en creencias y experiencias culturales que han sido transmitidas, de generación en generación a nivel mundial; la Medicina natural, tradicional, alternativa o complementaria, es utilizada, en algunos países como terapia, por lo tanto la O.M.S. (Organización Mundial de la Salud) ante este fenómeno actual de la medicina ha desarrollado nuevas estrategias para el periodo 2014-2023, en la cual, intentan evaluarla e integrarla con la medicina convencional, de manera que, la Dra. Margaret Chan, manifestó, que “las medicinas tradicionales de calidad, seguridad y eficacia comprobada, contribuyen a asegurar el acceso de todas las personas a la atención de salud”. (1)

En la actualidad, se encuentran realizando varias investigaciones en plantas con propiedades empíricamente curativas que en su mayoría, científicamente aun no son comprobadas, con la finalidad, de descubrir el principio activo y sus efectos en la salud e incluirlas en las terapias de la medicina convencional, caracterizada, por establecer tratamientos que desarrollan efectos adversos a la enfermedad como en el cáncer, por el uso de medicamentos quimioterapéuticos que genera muerte en las células tumorales y normales en igual proporción.

Ensayos experimentales en la *Annona cherimola*, comúnmente conocida, como, Chirimoya, perteneciente a la familia de las Annonaceae aproximadamente con 120 géneros y 2.500 especies distribuidas en regiones tropicales y subtropicales del Ecuador y en los valles Andinos de Perú (2), estudios fitoquímicos, han demostrado, la presencia de péptidos cíclicos, acetogeninas, alcaloides, amidas, kauranos y lignanos en donde las acetogeninas, presentan propiedades citotóxicas ante las células tumorales, por esta razón, se ha desarrollado una investigación en Perú en el año 2009, en los Laboratorios del Departamento de Farmacología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM) y los Laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH), en extracto etanólico de las semillas del fruto de esta planta, sobre células cancerígenas de

carcinoma epidermoide cérvix ME-180, adenocarcinoma de mama MCF-7 y leucemia mieloide crónica K-562, superando los niveles de citotoxicidad del cisplatino y 5-fluorouracilo medicamentos quimioterapéuticos ampliamente conocidos. (3)

Por otra parte, en Ecuador existe un estudio el cual evalúa la actividad antioxidante y valor nutracéutico de la *Annona muricata* comúnmente conocida como Guanábana en el 2013, sin embargo, en la *Annona ch.* aún no se evidencian estudios que valoren la actividad citotóxica. (4) Es por ello que basándose en varios estudios nos hemos propuesto en desarrollar la presente investigación, con diseño experimental–prospectivo enfocada a evaluar el efecto citotóxico del extracto acuoso de las hojas de *Annona cherimola*, en una línea celular de cáncer de pulmón, en medio de cultivo con pH ácido, con el fin de determinar el grado de proliferación celular de las células A-549 y su viabilidad.

Se inició con la obtención de la línea celular A-549 de la casa comercial ATCC (Colección de cultivos de tipo americano), seguido de la preparación del extracto acuoso en diferentes concentraciones (concentrado - 1:10 – 1:50), elaboración de protocolos para el mantenimiento celular en medio de cultivo (M.C.) RPMI completo, preparación de medio de cultivo pH ácido (Anexo 6), además se obtuvieron células mononucleares a través de la técnica Fycoll Hypaque inmediatamente incubadas con extracto en diferentes concentraciones para determinar su comportamiento, seguidamente las células A-549 se cultivaron en tubos falcón con extracto más M.C. RPMI completo, posteriormente, se elaboró un control positivo (células A-549 más extracto y M.C.) y un control negativo (M.C. más células A549) como control de calidad, ensayos que fueron incubados a una temperatura de 37°C con 5% CO<sub>2</sub>, subsiguientemente, se evaluó la proliferación y viabilidad celular cada 6 hora durante 4 días, realizando, pases o subcultivos mediante la tripzinización celular, que consiste, en el desprendimiento celular por medio de la tripsina, cuyos protocolos fueron elaborados durante el desarrollado de la investigación . (Anexo 9)

La proliferación celular se determinó, a través, de la observación microscópica utilizando en primera instancia el microscopio de inversión, que nos permite visualizar la elongación que evidencia el desarrollo celular, posteriormente, se contó las células

viabiles confluentes en una cámara de Neubauer, por medio, de un microscopio óptico, dando como resultado que las células A-549 frente al extracto concentrado y diluido (1:10-1:50) a las 6 horas da un 0% de confluencia, mientras que a las 36 horas existió un 74,4% (concentrado), 71,9%(1:10), 80,5%(1:50) y a las 72 horas 68,2%, 61,1% y 64,7% respectivamente, demostrando que existe una mayor confluencia a las 36 horas y disminuyendo a las 72 horas.

La viabilidad celular se evaluó mediante tinción con azul de tripán, coloide, que tiñe las membranas degeneradas de las células; en una placa con 96 pocillos se colocó 20 ul de las células A- 549 y mononucleares; 20 ul de azul de tripán, y finalmente se cargó la cámara de Neubauer para realizar el contaje de cada tipo de células a través del microscopio óptico y valorar su capacidad citotóxica del extracto acuoso de las hojas de *Annona cherimola* y del medicamento como control positivo frente a células tumorales y normales, demostrando, una baja citotoxicidad del extracto en comparación al cisplatino dando como resultado a las 72 horas un 34,4 % de muerte celular frente al extracto; mientras que, al ser ensayada con la droga quimioterapéutica (cisplatino), existe un 89,2% lo que indica efectivamente una alta citotoxicidad, por lo tanto, las células normales frente al extracto diluido 1:10 a las 72 horas indica 10,9% de muerte celular señalando una baja citotoxicidad.

## **4. REVISIÓN LITERARIA**

### **4.1 Medicina Tradicional**

La medicina tradicional o natural son creencias medicinales ancestrales o culturales que se han venido aplicando desde la antigüedad, basada en experiencias indígenas de diferentes culturas, que consisten en terapias espirituales conocidas como fitoterapia, entre otros tratamientos curativos los cuales son elaborados y aplicados para mantener y mejorar la salud tanto física como mental del ser humano. (5)

### **4.2 Plantas Medicinales**

Las plantas medicinales constituyen ciertos elementos de los vegetales como; hojas, tallos, raíces semillas entre otros los cuales contiene cierta actividad farmacológica, siendo en la actualidad un gran aporte para la sociedad, con la finalidad de prevenir, atenuar o sanar distintas patologías que hoy en día con medicamentos convencionales químicamente elaborados o comúnmente conocidos como sintéticos, no han sido 100% eficaces, (2) por lo tanto estos, han ido desarrollando en el individuo ciertas patologías adyacentes a la enfermedad, que ha sido en primera instancia a tratar, por lo tanto, instituciones enfocadas en desarrollar investigaciones de tipo experimental se han direccionado a indagar estas costumbres ancestrales curativas, en distintas plantas medicinales, despejando de esta manera varias hipótesis relacionadas a la medicina alternativa demostrando, a través de varios ensayos in-vitro en células animales el comportamiento del principio activo, así como también la forma de como ensayarlos ya sea: enteros, fragmentados o pulverizados. (6)

### **4.3 Fitomedicina**

Es la ciencia que estudia el principio activo de las plantas medicinales con fines terapéuticos, la misma que desde la antigüedad ha sido utilizada como terapia complementaria mediante la utilización de plantas o fragmentos, (5) por lo tanto ante lo expuesto varias instituciones han decidido poner a prueba este tipo de medicina, mediante, ensayos experimentales de laboratorio utilizando una metodología científica para de esta manera determinar el correcto uso y eficacia en células animales in vitro,

por lo tanto, la OMS reconoce la importancia del uso de este tipo de medicina, ya que, a pesar de ser más fiable que los medicamentos convencionales está a su vez es económica y para así poder lograr que los galenos en la actualidad hagan uso de las distintas plantas medicinales. (7)

#### **4.4 Fitofármaco**

Término asociado en el campo de la bioquímica, el mismo que se origina del griego “fito” = planta / “fármaco” medicamento, por lo tanto, se define como medicamentos elaborados en base a plantas o partes de las mismas, en diferentes formas para el tratamiento de las enfermedades; aplicando, procedimientos fitoquímicos para conocer el componente químico del vegetal. (8)

#### **4.5 Metabolitos a nivel vegetal**

El metabolismo se caracteriza por desarrollar una serie de reacciones químicas que se llevan a cabo en la célula, a partir de metabolismo: primario y secundario.

##### **4.5.1 Metabolitos primarios:**

Conjunto de procesos químicos, que intervienen directamente en el desarrollo de la planta como por ejemplo; en la fotosíntesis o también en procesos de crecimiento y desarrollo, a partir de la elaboración de metabolitos primarios los cuales son: carbohidratos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. (9)

**a. Carbohidratos:** también llamados glúcidos, son monosacáridos como: pentosas, hexosas, desoxiosas y derivados, como: ácido urónico, polioles y azúcares aminadas, etc. La condensación de monosacáridos se conoce como polisacáridos mientras que si los monosacáridos se unen a una molécula no glúcida como un terpeno que es un metabolito secundario se formará un heterósido, pero desde el punto de vista Fito-terapéutico los de mayor importancia son los polisacáridos entre los cuales son: (10)

- Polisacáridos derivados de hongos y bacterias como: los dextranos (expansores del plasma), goma xantán (estabilizante y gelificante) y lentinanos (antimicrobianos e hipolipemiantes)
- Polisacáridos procedentes de algas: ácido algínico (protector de la mucosa gástrica, emulsionante y estabilizador), carragenatos (protectores gástricos, etc) y agar-agar mezcla de dos polisacáridos utilizado como medio de cultivo así como también laxante, soporte cromatográfico y en curas gastrointestinales. (9)
- Polisacáridos homogéneos de plantas superiores: como almidón, celulosa, fibra alimentaria e inulina.
- Polisacáridos heterogéneos de plantas superiores: como gomas, mucílagos neutros/ ácidos y pectinas. (10)

**b. Aminoácidos, péptidos y proteínas:** no se encuentran formando parte de la fitoterapia, porque, la mayoría son tóxicos sin embargo, existen ciertos aminoácidos que forman parte de la fitoterapia como: los heterósidos cianogénicos, glucosinolatos, purinas, pirimidinas, péptidos, proteínas y vitaminas. (9)

**c. Lípidos:** son compuestos formados por carbono, hidrógeno y en menores proporciones de oxígeno, además, pueden llegar a contener nitrógeno, azufre y fósforo, sin embargo, se pueden llegar a distinguir dos tipos de lípidos que son:

- Lípidos simples: como los glicéridos, céridos y esteroides los cuales constituyen el mayor interés en la fitoterapia.
- Lípidos complejos: fosfolípidos y glucolípidos los cuales se encuentran constituyendo la membrana celular y no poseen actividad farmacológica a excepción de las lactinas.

Mientras que, en varios medicamentos se encuentran algunos lípidos como aceites vegetales, insaponificables, acetogeninas, acetilenos y poliacetilenos. (10)

#### 4.5.2 Metabolitos secundarios.

Los metabolitos secundarios derivados del metabolismo primario son los responsables del olor, color, sabor, así como, también de sus propiedades medicinales, en la que según su estructura química se diferencian los siguientes grupos de metabolitos secundarios: (9)

**a. Terpenos** o isoprenoides: compuestos orgánicos de origen vegetal estructurados por unidades de isopreno ( $C_5$ ) que se sintetizan a partir de la ruta del ácido mevalónico, se clasifican en:

- liridiones o monoterpénicos: comprende hidrocarburos, alcoholes y cetonas que forman los aceites esenciales obtenidos de hojas, raíces, corteza y flores de varias plantas. (10)
- Lactonas sesquiterpénicas: se encuentran en todas las partes de la planta pero mayoritariamente en las hojas, favorecen el sabor amargo de algunas drogas como: el diente de león, entre otras; posee una actividad antibacteriana, antifúngica, citotóxica, antitumoral, analgésica entre otras y además induce a la formación de alérgenos. (11)
- Saponinas: sólidos e incoloros se caracteriza por ser espumantes en soluciones acuosas permitiendo la elaboración de detergentes además son tenso-activas naturales, favoreciendo la permeabilidad celular utilizándose, en algunos tratamientos terapéuticos con otros fármacos para mejorar la entrada a la célula, además, poseen actividad espermicida, citotóxica, expectorante, cicatrizante, por otra parte, muchas poseen propiedades hemolíticas resultando muy tóxicas al ser inyectadas en sangre y además en animales de sangre fría, sin embargo, al ser administradas oralmente se reduce su toxicidad. (6)

**b. Compuestos fenólicos:** o también llamados poli fenoles o fenilpropanoides compuestos químicos que contiene un grupo fenol un anillo aromático con un



grupo hidroxilo que implica en la biosíntesis una ruta del ácido siquímico y la ruta del ácido malónico. Los grupos más importantes de este grupo son:

- Ácidos fenólicos y fenoles libres: se encuentran compuestos por: un anillo aromático con un grupo carboxilo, posee acciones farmacológicas como: antioxidantes, analgésicas entre otras, mientras que, los fenoles libres constituyen importantes esencias. (10)
- Flavonoides: se encuentran en todas las partes de la planta, constituyen aproximadamente la mitad de los compuestos fenólicos posee una estructura molecular de C6 – C3 – C6, se caracterizan por ser poli fenólicos y solubles en agua, además, se pueden clasificar en: antocianinas (pigmentos), chalconas, flavonas, flavonoles, entre otras, que desde el punto de vista farmacológico, se emplean: en la fragilidad capilar, dilatadores de las coronarias, espamolítica, antihepatóxica, colerétrica, estrógeno, diurética, antimicrobiana y fungitóxica. (11)
- Cumarinas: son los metabolitos C6-C3 más característicos, distribuidos en: las raíces, flores y frutos; se encuentran en forma libre o como glicósidos, se clasifican en: hidroxycumarinas, furanocumarinas y piranocumarinas, además, poseen propiedades: antimicrobianas, anticoagulante, inhibidores de germinación, saborizantes, perfumería entre otras. (10)
- Lignanos: son muy abundantes empleados en terapias antitumorales insoluble en agua y en la mayoría de solventes orgánicos. (6)
- Taninos: compuestos fenólicos poliméricos con la capacidad de unirse a proteínas desnaturalizantes, químicamente existen dos tipos de taninos: los hidrolizantes y no hidrolizantes; se encuentran en raíces, corteza y en menor proporción en hojas, poseen propiedades antibacterianas, astringentes como antidiarreico, además, favorecen la cicatrización en tratamiento de heridas y quemaduras. (10)

- Quinonas: compuestos aromáticos procedentes de la oxidación de fenoles con pigmentación amarilla pálida a negro se encuentran en: corteza, hojas, raíces y en el corazón de la madera; se subdividen en: bensoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas y quinonas isoprenoide; posee propiedades antimicóticas y bactericida. (9)

**c. Glicócidos:** compuestos que constituyen los principios activos de muchas plantas formados por un azúcar y un no azúcar como genina o aglicón siendo esta la parte farmacológica, se clasifican en: (11)

- Heterósidos antraquinónicos: compuestos de una sola molécula de azúcar unido a un derivado del antraceno farmacológicamente es empleado como laxante o purgante. (10)
- Heterósido cardiotónicos: compuestos químicos que actúan sobre el músculo cardíaco empleándose en tratamientos terapéuticos para la insuficiencia cardíaca, congestiva o en las alteraciones del ritmo cardíaco. (6)
- Heterósidos cianogénicos: droga que desprende ácido cianhídrico se suele utilizar como: agua destilada, antiespasmódico, estimulante de la respiración y aromatizante. (11)

**d. Alcaloides:** se encuentran en hojas, raíces, semillas y corteza de la planta comprenden, el grupo más grande de los metabolitos secundarios químicamente en su estructura cíclica contiene, uno o más átomos de nitrógeno se sintetizan a partir de: lisina, tirosina y triptófano, sin embargo, la nicotina lo hace a partir de la ornitina; farmacológicamente en los humanos genera respuestas fisiológicas y psicológicas por interacción con neurotransmisores, por lo tanto, en dosis altas son muy tóxicos, mientras que, en bajas dosis se emplean como relajantes musculares, tranquilizantes, antitusivos o analgésicos. (12)

#### 4.6 Conceptualización de *Annona cherimola*

La *Annona cherimola* perteneciente a la familia de la Annonáceae, su nombre etiológico Quechua: - chiri= frío/a muya = semillas, posee un gran número de especies dentro de las cuales tenemos: *Annona muricata*, *squamosa*, *cherimola* entre otras. (13)

La *Annona cherimola*, es un vegetal el mismo que se desarrolla como árbol, mide de 3-10 m de altura, se cultiva en lugares fríos como en los valles andinos de Ecuador y Perú, en temperaturas osciladas entre 17-22°C con pH de 6,5 a 7,6 y en lugares arenosos o de tierra arcillosa. (2)

#### 4.7 Características Generales:

➤ **Taxonomía y morfología:**

- *Filo*: Magnoliophyta
- *Clase*: Magnoliopsida
- *Sub clase*: Magnoliidae
- *Orden*: Magnoliales
- *Familia*: Annonáceae
- *Género*: *Annona*
- *Especie*: *cherimola*. (2)
- *Árbol*: pequeño de 5-7 m, tronco recto de corteza lisa y gruesa
- *Hojas*: firmes, simples, íntegras, de forma oblongo-lanceolada, de 10-25 cm de longitud, de color verde oscuro y algo pubescente en el haz y más claras y tomentosas en el envés. Nerviación en el envés; su caída ocurren a principios de diciembre y termina en marzo.
- *Flores*: agrupadas de tres pétalos color verde crema; florecimiento en febrero y termina en mayo.

- *Frutos*: corteza de color verde reticulada, su forma cónico-globoso, carnoso color crema, múltiples semillas planas. Su madurez alcanza en septiembre a enero. (13)

➤ **Origen, Usos y Beneficios.**

La *Annona cherimola* es una planta medicinal que se origina en los lugares fríos de los valles andinos de Perú y Ecuador como en Loja desarrollándose en los valles de Vilcabamba. (2)

La *Annona cherimola* constituye, una gran fuente nutricional, generalmente es usada como una fruta debido a su exquisito sabor, además, se elaboran: helados, batidos, yogurt, etc, así como también en forma de vino. (13)

Sin embargo, en la *Annona cherimola* se ha desarrollado varias investigaciones que han descubierto, su actividad en la salud como: “insecticida, antiparasitario” y en la actualidad se ha venido descubriendo su actividad citotóxica en las semillas de esta especie. (3)

➤ **Composición química de las hojas de la *Annona cherimola*.**

Las hojas de *Annona cherimola* se encuentran compuestas de:

- *Alcaloides como*: annomonicina, annomurina, annonaina, annonina, coclaurina, coreximina, reticulina. Alcaloides misceláneos: muricina, muricinina, estefarina, aterospermina, aterosperminina.
- *Acetogeninas*: muricapentocin, muricatocin C, muricatocin A, muricin H, annomuricin B, annomuricin A, murihexocin C, muricoreacin, bullatacinone, y bullatacin. (2)
- *Compuestos fenólicos*: ácido cafeíco, ácido p-cumarico, leucoantocianidinas.
- *Lípidos*: ácido esteárico, ácido linoleico, ácido lignocérico, y ácido gentsílico
- *Latonas*: annomontacina, annonacina, solamina, muricatacina.

- *Taninos carcinogénicos.*
- *Ácido ascórbico*
- *Compuestos cianogénicos: ácido hidrocianico*
- *Fitoesteroles: β sito esterol, estigmasterol, arronol, ipuranol (4)*

➤ **Actividad Citotóxica:**

Es la actividad que ejercen las acetogeninas, la cual es inhibir el crecimiento celular tumoral. (14)

➤ **Actividad biológica de las Acetogeninas.**

Las acetogeninas son policétidos constituidos por cadenas largas de carbono, las mismas que poseen actividad citotóxica antiparasitaria, entre otras.

Varios estudios experimentales han demostrado que las acetogeninas de la familia Annonáceae, son metabolitos secundarios considerados como inhibidores del complejo I mitocondrial el mismo que posee la función de sintetizar ATP a partir de moléculas reducidas que se producen en el metabolismo celular. (4)

Las acetogeninas poseen propiedades anti proliferativas sobre líneas cancerosas aun en aquellas que se encuentran resistentes a los fármacos utilizados habitualmente, debido a la rápida proliferación de las células cancerosas, estas requieren de niveles altos de energía, para poner en funcionamiento su bomba mediada por P-gluco proteína, que le permite mantenerse activa, por lo tanto, las acetogeninas pueden alterar la función mitocondrial a través del bloqueo mitocondrial complejo I. (15)

➤ **Aplicación medica:**

Este tipo de vegetal es muy rico en vitaminas B<sup>1</sup>, B<sup>2</sup> y B<sup>3</sup> y de hierro, calcio y fósforo, además mediante estudios se ha demostrado que son “anti-helmínticos, antitumorales, y anti-parasitarios”. (16)

#### **4.8 Extracto:**

Extracto es una sustancia, esencia o principio activo obtenida mediante métodos fitoquímicos a partir de un vegetal o animal, haciendo uso de menstruos apropiados o solventes orgánicos como el agua, éter entre otros para la separación del mismo mediante técnicas como maceración, per-coloración e infusión. (17)

##### **4.8.1 Métodos de obtención de extractos:**

- a. Maceración: proceso solido - líquido que consisten en la obtención de sustancias a partir de un vegetal; en un recipiente opaco con un disolvente líquido, dejándole reposar el tiempo optimo a temperatura ambiente en un lugar fresco y oscuro, luego se tamiza y la parte líquida es donde se encuentran los principales analitos o esencia. (6)
- b. Percolación: el extracto fluido es un extracto hidro-alcohólico cuya metodología es la percolación que consiste en empacar la droga vegetal previamente humectada en un percolador en la cual contiene un regulador para controlar el goteo. Se dice que por cada gramo de droga vegetal se obtiene 1 ml de extracto alcohólico. (8)
- c. Infusión: la droga se extrae con agua caliente, pero sin someterla a ebullición o con agua fría. (4)

#### **4.9 Células linfoideas o normales:**

Células que se encuentran conformando el sistema inmune cuya función primordial es proteger al individuo de agentes extraños como las bacterias virus hongos, etc. (18)

#### **4.10 Células Cancerígenas**

##### **Definición:**

El cáncer es una patología determinada por el crecimiento descontrolado de células inmaduras las mismas que no cumplen con un ciclo biológico normal debido a que se encuentra afectado su ADN celular y por lo tanto no mueren a diferencia de una célula normal que se caracteriza por un: crecimiento biológico y estar continuamente

restaurando este tipo de células normales, con la finalidad de mantener equilibrado el organismo. (18)

El cáncer dependiendo de sus células de origen se llegaría a dar su nombre, al existir un crecimiento descontrolado llega a formar un acumulamiento o masa de células inmaduras denominada tumor benigno o maligno, denominándose este último como cáncer, sin embargo, no todos los cánceres llegan a formar tumores como la “leucemia, la misma, que es una patología originada en la médula ósea o en la sangre”. (18)

#### **4.10.1 Cáncer de pulmón**

El cáncer de pulmón es un tipo de cáncer que se origina en las células que se encuentran revistiendo al pulmón como son los “bronquios, bronquiolos y alveolos”, el mismo que puede llegar a ser diseminado por todo el organismo produciéndose así una metástasis. De acuerdo a su observación microscópica se puede clasificar en:

- Cáncer de pulmón microcítico o de células pequeñas: es un tipo de cáncer que suele desarrollarse en los bronquios el cual toma su nombre debido al tamaño de las células que se observan en el microscopio además este tipo de cáncer se suele denominar; “cáncer de células en grano de avena, carcinoma de células avenoides y carcinoma indiferenciado de células pequeñas.” (18)
- Cáncer de pulmón no microcítico o de células no pequeñas: se origina igualmente en células epiteliales del pulmón el mismo que puede denominarse de acuerdo a observaciones histopatológicas como cáncer escamocelular y no escamoso o adenocarcinoma. (18)

#### **4.11 Cultivo celular:**

Es el estudio in vitro de células originarias de un órgano o tejido: normal o tumoral en medios de cultivo con las condiciones de crecimiento fisiológicas, bioquímicas y genéticas mediante técnicas de laboratorio de tal manera que se genere un hábitat similar al de origen y puedan desarrollarse y mantenerse en suspensión o monocapa durante 24 horas. (19)

#### 4.11.1 Tipos de cultivo celular.

- *Cultivo primario*: se define como la obtención directamente de células de un tejido o suspensión celular disgregadas por métodos enzimáticos o mecánicos, las cuales, se proliferan de manera limitada ya que al unirse entre ellas la confluencia se detiene y por esta razón es necesario realizar un pase o subcultivos a un nuevo soporte sólido que cuenta con las condiciones de crecimiento adecuadas. Los cultivos primarios pueden ser de dos tipos: (20)
- *Cultivo en monocapa*: permite el crecimiento celular al adherirse al sustrato en un soporte sólido para iniciar la proliferación de casi todas las células a excepción de las hematopoyéticas maduras, sin embargo, su confluencia se detiene cuando estas entran en contacto. (19)
- *Cultivo en suspensión*: Crecimiento de células capaces de proliferar sin necesidad de anclarse encontrándose dispersas en el medio de cultivo, alcanzando su confluencia cuando los nutrientes son insuficientes y el número de células es grande, es decir después de un periodo de adaptación. (21)
- *Cultivos continuos o líneas celulares*: son células genética y morfológicamente diferentes provenientes de tumores u obtenidas a partir de un cultivo primario con capacidad ilimitada de multiplicación bajo condiciones adecuadas de crecimiento, se caracteriza por no inhibir su proliferación cuando estas entran en contacto, además por lo tanto permiten el crecimiento celular ilimitado. (22)
- *Cepa celular*: obtención de células con propiedades específicas a partir de un cultivo celular mediante técnicas de selección o separación celular física. (21)

#### 4.12 Medio de cultivo:

Medios artificiales o naturales que contienen componentes purificados o de soluciones los cuales cuentan con las condiciones físico - químicas necesarias para favorecer el crecimiento celular. (23)



#### **4.12.1 Clasificación de los medios de cultivo:**

Según la naturaleza de sus constituyentes se clasifican en:

- *Medio esencial mínimo (MEM):* Constituido por sales como bicarbonato de sodio el cual permite crecimiento celular como los fibroblastos. (24)
- *Medios de crecimiento:* Medio que cuenta con los requerimientos necesarios para el crecimiento celular, como por ejemplo el RPMI.
- *Medios Selectivos:* Cuenta con los requerimientos nutritivos necesarios para el desarrollo o crecimiento de las células.
- *Medios de Congelación:* Medio que permite la conservación a temperaturas bajas las células, el cual esta suplementado con DMSO al 10%. (25)

#### **4.12.2 Factores de crecimiento celular**

- Humedad.
- Temperatura.
- Ph.
- Osmolaridad.
- Tensión superficial. (26)

#### **4.13 Criopreservación**

Proceso en el cual células, tejidos, órganos o individuos completos son congelados a muy bajas temperaturas, generalmente entre  $-80^{\circ}\text{C}$  y  $-196^{\circ}\text{C}$  (el punto de ebullición del nitrógeno líquido) para disminuir las funciones vitales de una célula o un organismo y poderlo mantener en condiciones de vida suspendida por mucho tiempo. (27)

#### **4.14 Potencial Hidrógeno:**

Es la concentración de iones hidrogeno en una solución el mismo que es un indicador para determinar cantidad de acidez como de alcalinidad de una sustancia. (28)

#### **4.15 Viabilidad celular:**

Es el procedimiento que permite realizar el conteo de células vivas, mediante la tinción de sus membranas con una solución (azul de tripán), que determinan el rompimiento de la integridad de su membrana y en una cámara de Neubauer, a través, de un microscopio óptico se realiza el conteo. (29)

## 5 MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Tipo de estudio:

La presente investigación fue de diseño Experimental – Prospectiva.

### 5.2 Muestra:

- Línea celular de cáncer pulmón A-549.
- Extracto acuoso de *Annona cherimola* pH ácido.

### 5.3 Área de Estudio:

La presente investigación se realizó en la ciudad de Loja, en el Laboratorio de cultivo celular del centro de biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.

### 5.4 Técnicas y Procedimientos:

#### ➤ Fase pre – analítica

- Certificado de aprobación para la participación en él macroproyecto *Amaranthus hybridus* que desarrolló la investigación: “Evaluar el efecto citotóxico de las hojas de *Annona cherimola* en líneas celulares cancerígenas”. **(Anexo 1)**
- Línea celular A-549 de la casa comercial ATCC (Colección de cultivos de tipo americano). **(Anexo 2)**
- Elaboración de registro para la viabilidad y proliferación celular. **(Anexo 3)**
- Elaboración de protocolos para el mantenimiento de la línea celular A-549:
  - Preparación de Medio de congelación.
  - Criocongelación celular.
  - Descongelación celular. **(Anexo 4)**
- Preparación del extracto acuoso en diferentes concentraciones. **(Anexo 5)**

➤ **Fase analítica:**

Los protocolos y técnicas utilizados en la presente investigación fueron elaborados por los investigadores con la ayuda de personas entendidas en el estudio e investigaciones realizadas en otros países, los cuales se fueron elaborando a medida que el trabajo investigativo iba avanzando, realizando ensayos previos.

- Preparación del medio de cultivo RPMI (Roswell Park Memorial Institute) completo y medio de cultivo con pH ácido. **(Anexo 6)**
- Preparación de Controles positivos. **(Anexo 7)**
- Obtención de células linfoides por medio de la Técnica de FICOLL HYPaque: consiste en la separación de células mononucleares o linfocitos mediante centrifugación por gradiente de densidad de otros elementos de la sangre periférica. **(Anexo 8)**

Ensayos en el laboratorio de Cultivo de cultivo celular del centro de biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.

- Tripzinización de células A-549 (pases o subcultivos): técnica utilizada para el desprendimiento de las células del medio de cultivo RPMI, mediante el uso de la tripsina para posteriormente realizar los pases o subcultivos. **(Anexo 9)**
- Calcular la cantidad de células para colocar en cada pocillo. **(Anexo 10)**
- Proliferación Celular: esta técnica nos permite valorar el comportamiento celular a través de la observación microscópica de células confluentes las mismas que expresan multiplicación, crecimiento y desarrollo celular. **(Anexo 11)**
- Viabilidad celular: determinación de células vivas y muertas en una muestra total mediante la tinción con azul de tripán el cual es un coloide que tiñe o colorea las membranas degeneradas de las células, para posteriormente colocar en la cámara de Neubauer, observar en el microscopio óptico, y proceder a contar el número de células (muertas / vivas) presentes en cada campo visual. **(Anexo 12).**

**Control positivo:**

- Cultivo de células A-549 más fármaco utilizado en la actualidad (Cisplatino) en medio RPMI en pH ácido.

**Control negativo:**

- Cultivo de células A-549 sin extracto en medio RPMI en pH ácido.

**Evaluación de citotoxicidad:**

- Extracto Acuoso, más células normales, en medio RPMI en pH ácido.

**➤ Fase post- analítica:**

- Certificación de haber realizado las prácticas en los laboratorios de cultivo celular del centro de biotecnología de la Universidad Nacional de Loja. **(Anexo 13)**
- **Registros y cálculo celular:** se sacó el promedio celular (muertas/V) de la línea celular A549 y de los linfocitos frente al extracto, al medicamento y al medio de cultivo RPMI pH ácido.
- **Análisis estadístico:** se realizó a través del programa estadístico SAS con las pruebas: ADEVA (si hay significancia entre tratamientos de distintas variables), DUNCAN (para ver si existe significancia entre grupos, haciendo comparaciones múltiples entre ellos) y T ESTUDENT (se utiliza para verificar si existe diferencia entre las medias de los grupos más significativos). **(Anexo 14.)**

**5.5 PLAN DE TABULACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.**

Los resultados obtenidos se tabularon con el programa EXCEL para posteriormente representarlos mediante tablas y gráficas de frecuencia, paralelamente se realizó la correspondiente interpretación de los resultados obtenidos

## 6. RESULTADOS

**Resultados para el primer objetivo:** Determinar el grado de proliferación de la línea celular de cáncer de pulmón.

**Tabla 1**

1.1 Proliferación de células A-549\* frente al extracto acuoso de las hojas de *Annona cherimola* en medio de cultivo\*\* con pH ácido\*\*\*

Proliferación Extracto acuso	Tiempo		
	6 horas	36horas	72 horas
Concentrado	0%	74,4%	68,2%
Dilución 1:10	0%	71,9%	61,1%
Dilución1:50	0%	80,5%	64,7%

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

**Autor:** Mayra Alexandra Medina Lanche

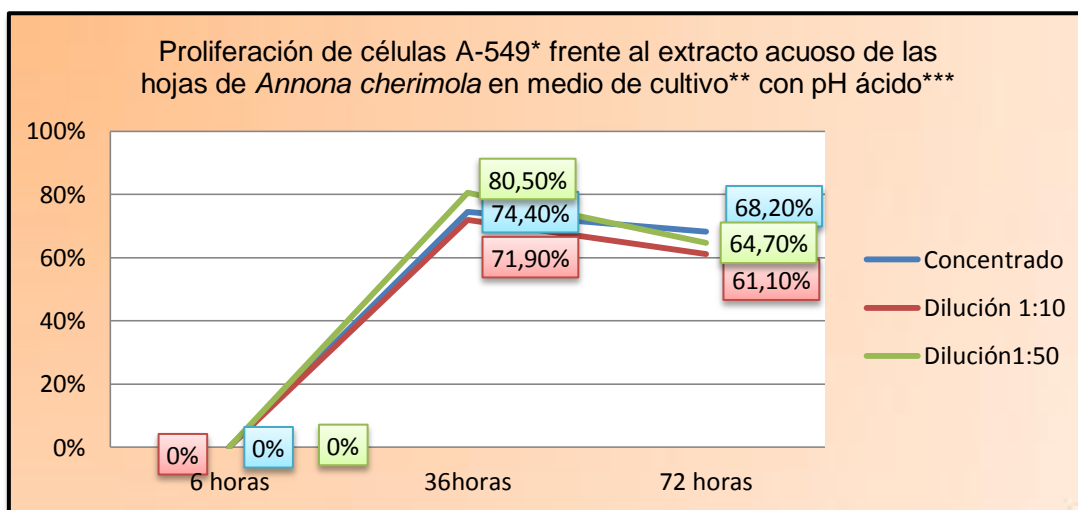
**Leyenda:**

\* Línea celular de cáncer de pulmón humano.

\*\* Medio RPMI 1640

\*\*\* pH: 6.8 - 6.9

**Gráfico 1.1**



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

**Autor:** Mayra Alexandra Medina Lanche

**Leyenda:**

\* Línea celular de cáncer de pulmón humano

\*\* Medio RPMI 1640

\*\*\* pH: 6.8 - 6.9

**Interpretación:**

De acuerdo a lo observado en la tabla N°1 del total de células vivas se determinó una confluencia de 0 % a las 6 horas, 74,40% a las 36 horas y 68,20 % a las 72 horas en el cultivo del extracto concentrado; 0 % a las 6 horas, 71,90 % a las 36 horas y 61,10% a las 72 horas de incubación en el cultivo diluido 1:10; 0 % a las 6 horas, 80,5 % a las 36 horas y 64,70 % 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 1.2**

1.2 Proliferación de células A-549\* frente al cisplatino en medio de cultivo\*\* con pH ácido\*\*\*

Proliferación	Tiempo		
	6 Horas	36 Horas	72 Horas
<b>Cisplatino Concentrado</b>	0%	31,2%	11,4%
<b>Dilución 1:10</b>	0%	69,6%	30,8%
<b>Dilución 1:50</b>	0%	72,7%	50%

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

**Autor:** Mayra Alexandra Medina Lanche

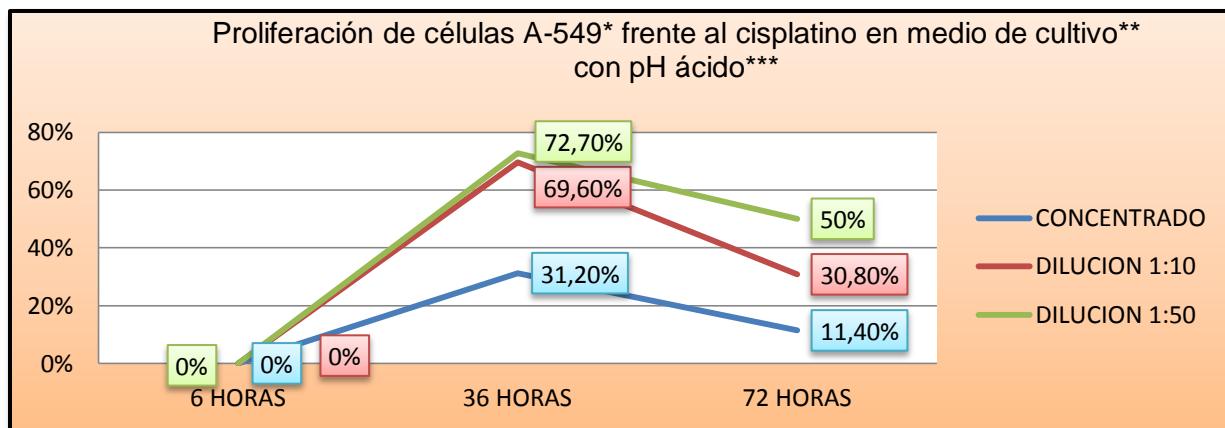
**Leyenda:**

\* Línea celular de cáncer de pulmón humano

\*\* Medio RPMI 1640

\*\*\* pH: 6.8 - 6.9

**Gráfico 1.2**



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

**Autor:** Mayra Alexandra Medina Lanche

**Leyenda:**

\* Línea celular de cáncer de pulmón humano

\*\* Medio RPMI 1640

\*\*\* pH: 6.8 - 6.9



**Interpretación:**

De acuerdo a lo observado en la tabla 2 del total de células vivas se determinó una confluencia de 0 % a las 6 horas, 31,20% a las 36 horas y 11,40% a las 72 horas en el cultivo del medicamento concentrado; 0 % a las 6 horas, 69,60 % a las 36 horas y 30,80% a las 72 horas de incubación en el cultivo diluido 1:10; 0 % a las 6 horas, 72,70 % a las 36 horas y 50% 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 1.3**

1.3 Proliferación de células A-549\* en medio de cultivo\*\* con pH ácido\*\*\*

**Fuente:** Ensayo realizado en el Laboratorio de cultivo de células de la Universidad

Proliferación pH ácido	Tiempo		
	6 horas	36horas	72 horas
Concentrado	0%	73%	70,6%

Nacional de Loja.

**Autor:** Mayra Alexandra Medina Lanche

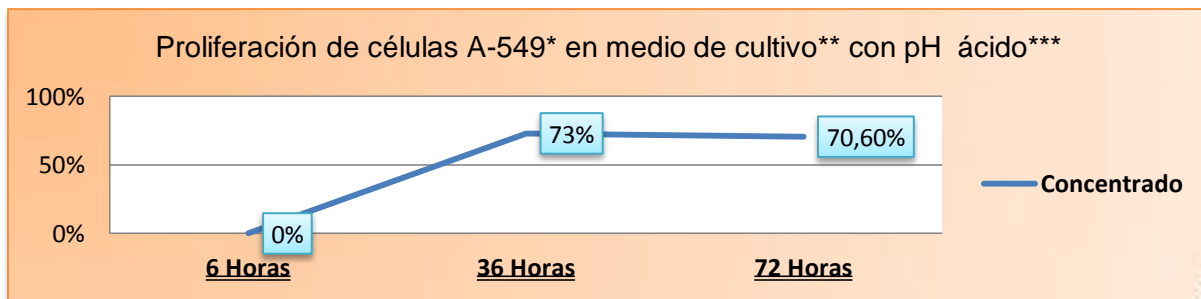
**Leyenda:**

\* Línea celular de cáncer de pulmón humano

\*\* Medio RPMI 1640

\*\*\* pH: 6.8 - 6.9

**Gráfico 1.3**



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

**Autor:** Mayra Alexandra Medina Lanche

**Leyenda:**

\* Línea celular de cáncer de pulmón humano

\*\* Medio RPMI 1640

\*\*\* pH: 6.8 - 6.9

**Interpretación:**

De acuerdo a lo observado en la tabla N°3 del total de células vivas A 549 en medio de cultivo concentrado se determinó una confluencia de 0 % a las 6 horas, 73% a las 36 horas y 70,60 % a las 72 horas. Demostrando que existe una proliferación mayor a las 36 horas y disminuyendo a las 72 horas.

**Resultados para el segundo objetivo:** Determinar la viabilidad celular de cáncer de pulmón.

**Tabla 2**

2.1 Extracto acuoso de las hojas de *Annona cherimola* en medio en cultivo\*\* con pH ácido frente a células A-549\*

Extracto acuoso de las hojas de <i>Annona cherimola</i> en medio en cultivo** con pH ácido frente a células A-549*				
Horas	Concentrado	Diluido 1:10	Diluido 1:50	Control negativo (A549 + RPMI)
6	13,6 %	11,8 %	15,5 %	10,3 %
12	14,2 %	19,3 %	17,7 %	16,3 %
24	22,1 %	18,9 %	24 %	15,7 %
36	23,6 %	23,5 %	21,4 %	27,4 %
48	39,3 %	31 %	27,6 %	24 %
60	31,6 %	33,4 %	43,3 %	26,6 %
72	34,4 %	34,6 %	38,6 %	33 %

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

**Autor:** Mayra Alexandra Medina Lanche

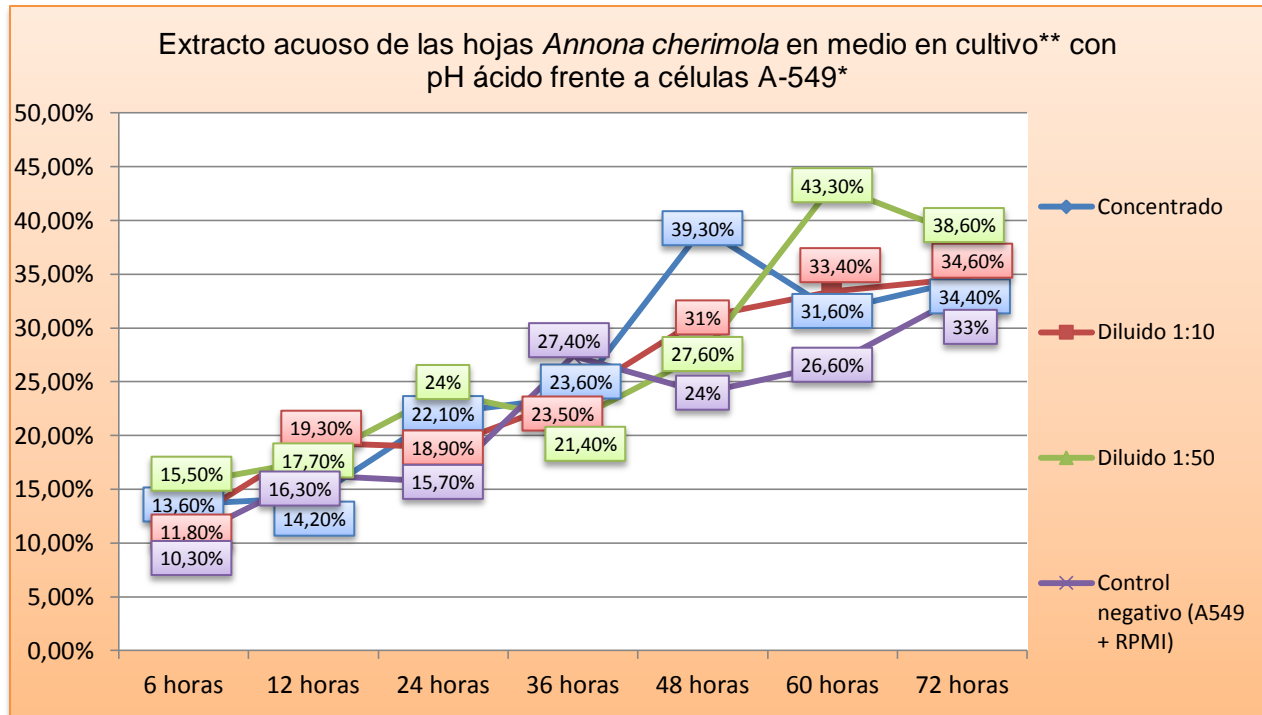
**Leyenda:**

\* Línea celular de cáncer de pulmón humano

\*\* Medio RPMI 1640

\*\*\* pH: 6.8 - 6.9

**Gráfico 2.1**



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

**Autor:** Mayra Alexandra Medina Lanche

**Leyenda:**

\* Línea celular de cáncer de pulmón humano

\*\* Medio RPMI 1640

\*\*\* pH: 6.8 - 6.9

**Interpretación:**

De acuerdo a lo observado en la gráfica podemos deducir que la mayor muerte celular se encuentra en el extracto diluido 1:50 hallándose en un 43,3%, durante las 60 horas de incubación disminuyéndose la misma a las 72 horas. Por otro lado apreciamos que existen un 33% de muerte celular a las 72 horas frente al medio de cultivo el cual actúa como control negativo.

**Tabla 2.2**

2.2 Células A-549\* frente al cisplatino en medio de cultivo\*\* con pH ácido\*\*\*

Células A-549* frente al cisplatino en medio de cultivo** con pH ácido***				
Horas	Concentrado	Diluido 1:10	Diluido 1:50	Control negativo (a 549 + RPMI)
6	23,8 %	15,2 %	13 %	10,3 %
12	25,3 %	22,3 %	20,2 %	16,3 %
24	38,3 %	21,9 %	20,4 %	15,7 %
36	65,8 %	29,5 %	32,3 %	22 %
48	70,4 %	40 %	37,4 %	24,2 %
60	77,7 %	50,9 %	43,9 %	26,6 %
72	89,2 %	69,4 %	53,3 %	33 %

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

**Autor:** Mayra Alexandra Medina Lanche

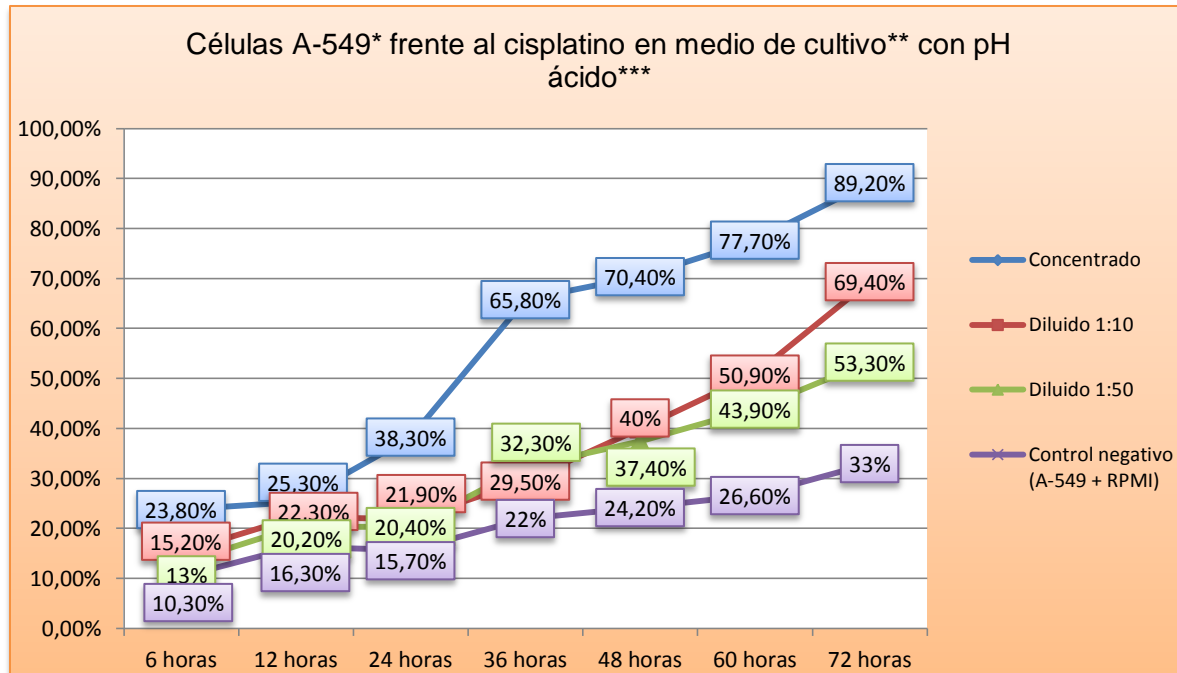
**Leyenda:**

\* Línea celular de cáncer de pulmón humano

\*\* Medio RPMI 1640

\*\*\* pH: 6.8 - 6.9

**Gráfico 2.2**



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

**Autor:** Mayra Alexandra Medina Lanche

**Leyenda:**

\* Línea celular de cáncer de pulmón humano

\*\* Medio RPMI 1640

\*\*\* pH: 6.8 - 6.9

**Interpretación:**

De acuerdo a los resultados obtenidos del cultivo de células tumorales frente al medicamento antitumoral “Cisplatino”, en el cultivo concentrado se encontró un 89,2% de muerte celular, mientras que en una concentración diluida 1:10 existe un 69,4%, en las 72 horas de incubación de estos cultivos, demostrando así su efectividad antitumoral.

**Tabla 2.3**

2.3 Cultivo de células normales\* frente al extracto acuoso de hojas de *Annona cherimola* en un medio de cultivo\*\* con pH ácido\*\*\*

Cultivo de células normales* frente al extracto acuoso de hojas de <i>Annona cherimola</i> en un medio de cultivo** con pH ácido***			
Horas	Concentrado	Diluido 1:10	Diluido 1:50
6	1,9 %	0,5 %	0 %
12	3,4 %	2,7 %	2,0%
24	4,3 %	3,0%	3,0 %
36	5,9 %	5,2 %	4,2 %
48	9,6 %	5,7 %	5,3 %
60	11,4 %	8,5 %	8,9 %
72	15,8 %	10,9 %	11,3 %

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

**Autor:** Mayra Alexandra Medina Lanche

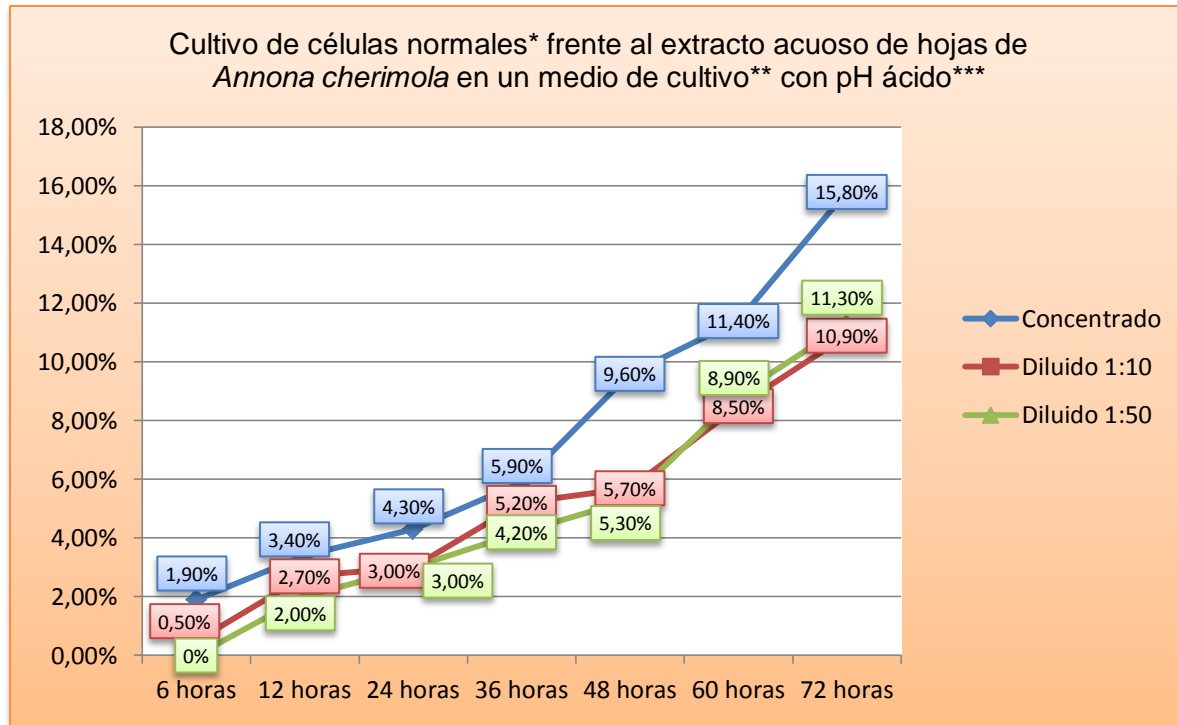
**Leyenda:**

\* Células linfocitarias.

\*\* Medio RPMI 1640

\*\*\* pH: 6.8 - 6.9

**Gráfico 2.3**



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

**Autor:** Mayra Alexandra Medina Lanche

**Leyenda:**

\* Células linfocitos.

\*\* Medio RPMI 1640

\*\*\* pH: 6.8 - 6.9

**Interpretación:**

Conforme a los resultados obtenidos se demuestran en la gráfica siguiente que el extracto acuoso de las hojas de *Annona cherimola* concentrado frente a los linfocitos de sangre periférica, produce una baja actividad citotóxica de un 15,8%, seguido de un 11,3% de muerte celular de extracto diluido 1:10 a las 72 horas de incubación.



**Tabla 2.4**

2,4 Comparación del efecto citotóxico del extracto acuoso (concentrado) y antitumoral\* (concentrado) sobre células A-549 en medio de cultivo\*\* con pH ácido\*\*\*

Comparación del efecto citotóxico del extracto acuoso (concentrado) y antitumoral* (concentrado) sobre células A-549 en medio de cultivo** con pH ácido***							
Horas	6	12	24	36	48	60	72
<b>Extracto</b>	13,4 %	14,2 %	22,1 %	23,6 %	39,3 %	31,6 %	34,4 %
<b>Cisplatino</b>	23,8 %	25,3 %	38,3 %	65,8 %	70,4 %	77,7 %	89,2 %

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

**Autor:** Mayra Alexandra Medina Lanche

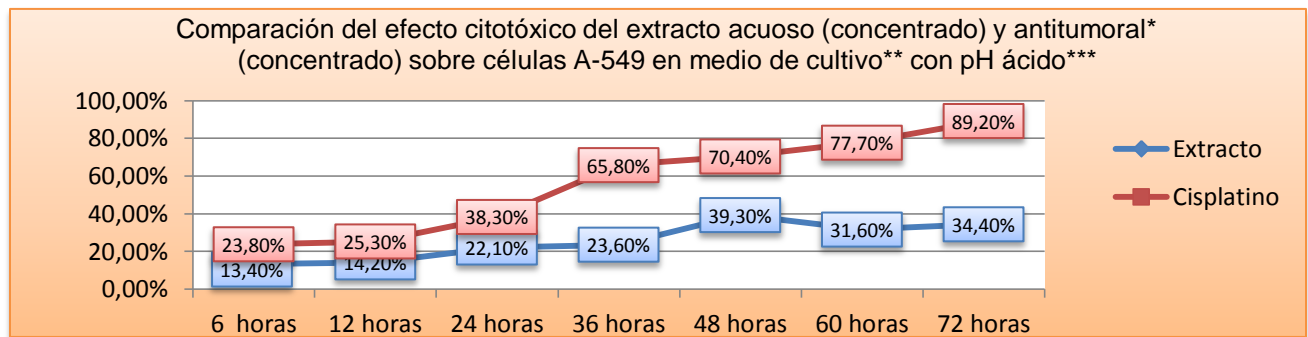
**Legenda:**

\* Cisplatino.

\*\* Medio RPMI 1640

\*\*\* pH: 6.8 - 6.9

**Gráfico 2.4**



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

**Autor:** Mayra Alexandra Medina Lanche

**Legenda:**

\* Cisplatino.

\*\* Medio RPMI 1640

\*\*\* pH: 6.8 - 6.9

**Interpretación:**

De acuerdo a los resultados obtenidos en relación a la actividad citotóxica del extracto acuoso de las hojas de *Annona cherimola* y el medicamento antitumoral Cisplatino, se demostró que efectivamente este produce mayor muerte celular de un 89,2% en relación al extracto en un 34,6% a 72 horas de incubación.

## 7. DISCUSIÓN

En el presente estudio hemos evaluado el efecto citotóxico de las acetogeninas, que se encuentran presentes, en el extracto acuoso, de las hojas de *Annona cherimola*, en diferentes concentraciones, en una línea celular de cáncer de pulmón A-549, en un medio de cultivo con pH ácido , además, cultivamos las células A-549 frente al cisplatino, para valorar la actividad citotóxica del medicamento en relación al extracto, mediante, la técnica de viabilidad celular, que consiste, en determinar el porcentaje de células vivas y muertas, con, la tinción de azul de tripán, en una cámara de Neubauer, a través, de un microscopio óptico, cada 6 horas durante 4 días, obteniéndose los siguientes resultados de muerte celular: 34,4% el extracto y 84,2% el cisplatino frente a la línea tumoral A-549, mientras que, el extracto frente a las células normales o mononucleares, alcanza, un 15,8% de muerte celular, en relación al cisplatino que provoca muerte de células normales y tumorales en iguales proporciones.

Un estudio realizado en Perú, por parte de los investigadores: Ángel Quispe, David Zavala, José Rojas, Margarita Posso, y Abraham Vaisberg, en el 2006, determinó, el efecto citotóxico selectivo in vitro de muricin H, siendo, una acetogenina, presente en la *Annona muricata* comúnmente conocida como Guanábana, perteneciente, a la familia de las Annonaceae, en diferentes concentraciones, frente a una línea celular de cáncer de pulmón H-460 y 3T3 (fibroblastos normales de ratón), empleándose 5-Fluorouracilo como control positivo del estudio, con el cálculo del índice de selectividad, que comprobó, el índice de citotoxicidad de cada muestra, por lo tanto, si el valor es  $>1$  la sustancia es más citotóxica para las células tumorales, que para las células normales, si es  $<1$  demuestra lo contrario, obteniéndose, los siguientes resultados: 102,6 para muricin H que supera ampliamente el valor a 1 (más citotóxico para las células tumorales), a diferencia de 5-fluorouracilo que solo alcanza un valor de 0,63 (más citotóxico para las células normales); de manera que, al comparar la metodología empleada por Quispe, A. et al; con nuestro estudio, parecería haber coincidencias en lo que se refiere a valorar, su efecto citotóxico de las acetogeninas, obteniéndose resultados altos, frente a líneas tumorales y disminuidos en células normales, sin embargo, difieren con los nuestros, ya que, empleamos otra técnica de cálculo, distinto

control positivo, nuestro estudio no fue selectivo y empleamos una especie diferente de la familia de las Anonáceas, además, el efecto citotóxico del control positivo (cisplatino) en nuestro estudio, superó, la actividad citotóxica del extracto acuoso de las hojas *Annona cherimola*. (30)

Quispe, A. et al. en Perú, en el año 2009, ha evaluado la actividad citotóxica de las acetogeninas, en extracto etanólico de las semillas de *Annona cherimola* sobre líneas tumorales: MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano), ME-180 (carcinoma epidermoide de cérvix), K-562 (leucemia mieloide crónica), y 3T3 (fibroblastos normales de ratón), en diferentes concentraciones, utilizando, Cisplatino y 5-fluorouracilo, como controles positivos, adquiriéndose, los siguientes resultados, calculados por índices de selectividad: MCF-7= 2,17; ME-180 =2,39 y K-562= 6,07; sin embargo, cisplatino y 5-fluorouracilo alcanzaron los siguientes índices de selectividad: 0,06 y 0,07 respectivamente, logrando, que el efecto citotóxico, de las semillas del extracto etanólico de *Annona cherimola*, supere los niveles de citotoxicidad de 5-fluorouracilo y cisplatino, medicamentos quimioterapéuticos comúnmente empleados, de tal manera, que al parecer, esta investigación, guarda concordancia con nuestra investigación, enfocada a comprobar, el efecto citotóxico de las acetogeninas presentes en la *Annona cherimola* y uno de los controles positivos (cisplatino) empleado; no obstante, cabe recalcar, que en nuestro estudio usamos: extracto acuoso de hojas de *Annona cherimola*, además, difiere en su metodología, líneas celulares, técnica de cálculo y 5-fluorouracilo como control positivo; aunque, en nuestra investigación, no se han obtenido resultados que superen los niveles de citotoxicidad del cisplatino, los datos obtenidos son importantes, puesto que en la actualidad se sigue aun empleando el cisplatino en el tratamiento quimioterapéutico de cáncer de pulmón, por tal motivo, es importante continuar investigando in vitro los principios activos de las diferentes partes de la *Annona cherimola* y sus efectos frente a las células cancerígenas y normales. (3)

## 8. CONCLUSIONES:

- El extracto acuoso de las hojas de *Annona cherimola* en diferentes concentraciones frente a la línea tumoral de cáncer de pulmón ha permitido desarrollar un grado de proliferación diferente al cisplatino, consiguiéndose la mayor proliferación celular a las 36 horas de incubación y disminuyéndose a las 72 horas de incubación, debido a que la actividad citotóxica de las acetogeninas presentes en él, que inhibe la proliferación celular.
- Las células A-549 y mononucleares frente al extracto alcanzan una viabilidad celular significativa ya que el efecto citotóxico de las acetogeninas es mayor en las células tumorales de pulmón que en las normales, mientras que, al ser ensayadas con el medicamento quimioterapéutico cisplatino efectivamente la muerte celular es mayor en células normales y tumorales en relación al efecto citotóxico del extracto.

## 9. RECOMENDACIONES:

- De acuerdo a los resultados obtenidos, se sugieren, seguir realizando investigaciones empíricas en las diferentes partes de la *Annona cherimola*, como son: tallos, raíces, frutos o flores, ya que aún, no se han realizado, investigaciones experimentales frente a líneas celulares tumorales, que determinen la actividad citotóxica de las acetogeninas presentes en estos elementos, y para que posteriormente, se elaboren fármacos en base a las acetogeninas, los cuales, lleguen a emplearse como complemento al tratamiento quimioterapéutico o remplazo al cisplatino.
- Se sugiere tomar como referencia científica a este estudio experimental, para investigaciones enfocadas a evaluar la actividad citotóxica, de ciertas, plantas medicinales en distintas líneas celulares tumorales, para que, posteriormente puedan ensayarse in vivo en especies con similar organismo al ser humano y así evaluar los posibles efectos que puedan llegar a desarrollarse.

## 10. BIBLIOGRAFÍA:

- 1 Organización Mundial de la Salud. Apps.who.int. [En línea].; 2013 [citado 2015 Junio 4. Disponible en: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/95008/1/9789243506098\\_spa.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/95008/1/9789243506098_spa.pdf).
- 2 González Vega ME. CHIRIMOYA (*Annona cherimola* Miller), FRUTAL TROPICALY SUB-TROPICAL DE VALORES PROMISORIOS. redacly. 2013 Julio-septiembre; 34(3).
- 3 Quispe Mauricio D, Callacondo Riva D, Rojas Camayo J, Zavala Curzo D, Posso Rivera M, Vaisber Wolach A. Efecto citotóxico de las semillas de *Annona cherimola* en cultivos de cáncer de cérvix, mama y leucemia mieloide crónica. Scielo. 2009; 26(3).
- 4 Barahona V. dspace.esepoch.edu.ec. [En línea].; 2013 [citado 2015 Julio 2. Disponible en: <http://dspace.esepoch.edu.ec/bitstream/handle/123456789/2453/56T00321.pdf?sequence=1>.
- 5 World Health Organization. Traditional medicine: definitions. [En línea].; 2015 [citado 2015 agosto 18. Disponible en: <http://www.who.int/medicines/areas/traditional/definitions/en/>.
- 6 Fundación de Religiosos para la salud. fundacionfrs.es. [En línea].; 2012 [citado 2015 Agosto 13. Disponible en: [http://www.fundacionfrs.es/archivos/manual\\_plantas\\_medicinales\\_v2.pdf](http://www.fundacionfrs.es/archivos/manual_plantas_medicinales_v2.pdf).
- 7 Avello M&CI. Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. Scielo. 2010; 138.
- 8 Bueno J. Biosalud. [En línea]. [citado 2015 Julio 19. Disponible en: <https://www.biosalud.org/archivos/noticias/4311Fitoterapia.pdf>.

- 9 Lincoln T, Zeiger E. Fisiología vegetal. I ed.: PLANT PHYSIOLOGY, THIRD EDITION; 2006.
- 10 Martínez Solís I. Manual de Fitoterapia. Barcelona España: Masson; 2007.
- 11 Lock de Ugaz o. bvsde.paho.org. [En línea]. [citado 2015 Septiembre 4. Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/texcom/manualesMEC/fitoterapia/cap4.pdf>.
- 12 García A, Pérez A, Urruía C. Metabolismo secundario de plantas.. Reduca (Biología). 2009; 2(3).
- 13 Castro J. mag.gob.cr. [En línea].; 2007 [citado 2015 julio 6. Disponible en: <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/a00109.PDF>.
- 14 García - Aguirre & col. EVALUACIÓN CITOTÓXICA IN VITRO DE ACETOGENINAS AISLADAS DE *Annona cherimolia* Mill. [En línea]. [citado 2015 Junio 2. Disponible en: [https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CBwQFjAAahUKEwilhf-I653IAhXQr4AKHfBHC5U&url=http%3A%2F%2Fwww.respyn.uanl.mx%2Fespeciales%2F2007%2Fee-07-2007%2Fdocumentos%2Ftrabajos%2Flibres%2F27\\_garcia-aguirre\\_y\\_col.pdf&usg=AFQjCNG4](https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CBwQFjAAahUKEwilhf-I653IAhXQr4AKHfBHC5U&url=http%3A%2F%2Fwww.respyn.uanl.mx%2Fespeciales%2F2007%2Fee-07-2007%2Fdocumentos%2Ftrabajos%2Flibres%2F27_garcia-aguirre_y_col.pdf&usg=AFQjCNG4).
- 15 Xiaolin Zi, University of California Irvine, United States of America. <http://journals.plos.org/>. [En línea].; 2012 [citado 2015 junio 4. Disponible en: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0047049>.
- 16 Ramírez yc. Composición química y actividad larvívica del aceite esencial de *Annona cherimola* Mill. de los Andes venezolanos contra el mosquito *Aedes aegypti* (L). *Fac Farm*. 2012; 53(2): p. 2-3.
- 17 Caldas A. [dspace.ucuenca.edu.ec](http://dspace.ucuenca.edu.ec). [En línea]. [citado 2015 junio 7. Disponible en: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/2468/1/tq1111.pdf>.

- 18 American Cancer Society. [www.cancer.org](http://www.cancer.org). [En línea].; 2014 [citado 2015 Marzo 14. Disponible en: <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdepulmonmicrocitococelulas/guiadetallada/cancer-de-pulmon-microcitico-celulas-pequenas-what-is-what-is-small-cell-lung-cancer>.
- 19 Segretin ME. [javeriana.edu.co](http://www.javeriana.edu.co). [En línea]. [citado 2015 junio 4. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/cultivos.htm>.
- 20 Segretin ME. [argenbio.org](http://www.argenbio.org). [En línea]. [citado 2015 junio 5. Disponible en: <http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/Cultivos%20celulares%20I%20Euge.pdf>.
- 21 Manarin R. [En línea].; 2015 [citado 2015 junio 3. Disponible en: <https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=0CCIQFjABahUKEwilk4Cyj5IAhUljw0KHZJDDxk&url=http%3A%2F%2Fwww.fbioyf.unr.edu.ar%2Fvirtual%2Fmod%2Fresource%2Fview.php%3Fid%3D10192&usq=AFQjCNH90yDzTByawGSx8c01-7sd3bk39w&sig2=zX2GdAZA>.
- 22 [ehu.eus](http://www.ehu.eus). [En línea]. [citado 2015 mayo 23. Disponible en: [http://www.ehu.eus/biofisica/juanma/mbb/pdf/cultivo\\_celular.pdf](http://www.ehu.eus/biofisica/juanma/mbb/pdf/cultivo_celular.pdf).
- 23 [cultek.com](http://www.cultek.com). [En línea]. [citado 2015 Julio 8. Disponible en: [http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Cultivos%20Celulares/Aplica\\_Cultivos\\_Celulares\\_2007.pdf](http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Cultivos%20Celulares/Aplica_Cultivos_Celulares_2007.pdf).
- 24 Sigmaaldrich. [En línea]. [citado 2015 Agosto 30. Disponible en: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/classical-media-salts/mem-media.html#top>.
- 25 [innoprot.com](http://www.innoprot.com). [En línea]. [citado 2015 Agosot 30. Disponible en: [http://www.innoprot.com/es\\_productos.asp?idsf=61&id=15&idp=304](http://www.innoprot.com/es_productos.asp?idsf=61&id=15&idp=304).



- 26 Santambrosio E. frro.utn.edu.a. [En línea].; 2009 [citado 2015 Agosto 30. Disponible en: [http://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5\\_anio/biotecnologia/practicol.pdf](http://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_anio/biotecnologia/practicol.pdf).
- 27 laplace.us.es. [En línea].; 2009 [citado 2015 Agosto 30. Disponible en: [http://laplace.us.es/cryobiotech/index.php?option=com\\_content&view=article&id=13:concepto-de-criopreservacion-y-conceptos-relacionados&catid=8:introduccion&Itemid=38](http://laplace.us.es/cryobiotech/index.php?option=com_content&view=article&id=13:concepto-de-criopreservacion-y-conceptos-relacionados&catid=8:introduccion&Itemid=38).
- 28 Villa D. Mi ciencia quimica. [En línea].; 2011 [citado 2015 Agosto 27. Disponible en: <http://micienciaquimicas.blogspot.com/2011/12/potencial-de-hidrogeno.html>.
- 29 Rivera M. Viabilidad y conteo celular. [En línea].; 2012 [citado 2015 Agosto 30. Disponible en: <http://es.slideshare.net/uscbio225/viabilidad-y-conteo-celular>.
- 30 Quispe A, Zavala D, Rojas J, Posso M, Vaisberg A. EFECTO CITOTÓXICO SELECTIVO IN VITRO DE MURICIN H (ACETOGENINA DE *Annona muricata*) EN CULTIVOS CELULARES DE CÁNCER DE PULMÓN. Scielo. 2006; 23(4).

## 11. ANEXOS:

### Índice de anexos

1	Certificado de aprobación para la participación en él macroproyecto. ....	45
2	Línea celular A-549 de la casa comercial ATCC.....	46
3	Registro para la viabilidad celular:.....	49
4	Elaboración de ensayos o protocolos para el mantenimiento de la línea celular A-549:.....	50
5	Preparación del extracto acuoso en diferentes concentraciones. ....	52
6	Preparación del medio de cultivo rpmi (roswell park memorial institute) completo y medio de cultivo con ph ácido .....	53
7	Preparación de controles positivos.....	54
8	Obtención de células linfoides por medio de la técnica de ficoll hypaque .	55
9	Tripsinización de células A-549 (pases o subcultivos).....	56
10	Calcular la cantidad de células para colocar en cada pocillo .....	57
11	Proliferación celular:.....	58
12	Protocolo de viabilidad celular:.....	59
13	Certificado de haber realizado las prácticas en los laboratorios de cultivo celular del centro de biotecnología de la universidad nacional de loja.....	60
14	Análisis estadístico.....	61
15	Fotorelatoria.....	67

**ANEXO 1**

**CERTIFICADO DE APROBACIÓN PARA LA PARTICIPACIÓN EN ÉL  
MACROPROYECTO.**

---



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

Loja, 28 de mayo del 2015

Dr.  
Miguel Marín Gómez, Mg Sc.  
DIRECTOR DEL LABORATORIO DE CULTIVO CELULAR.  
A petición verbal de parte interesada:

**CERTIFIC O:**

Que la Srta. MAYRA ALEXANDRA MEDINA LANCHE, estudiante del VIII módulo de la carrera de Laboratorio Clínico y con cédula de identidad número 1105199077 fue aceptada parte del grupo de estudiantes para que participe en la realización de un macroproyecto sobre *Amaranthus hybridus* para desarrollar la investigación "Evaluar el efecto citotóxico de las hojas de *Annona cherimola* en líneas celulares cancerígenas", el mismo formará parte del trabajo final de investigación que deben realizar previo a la obtención del título de Licenciada de 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 MgSc.  
DIRECTOR DEL PROYECTO.

## ANEXO 2

### LÍNEA CELULAR A-549 DE LA CASA COMERCIAL ATCC.



Product Code:

**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™)

American Type Culture Collection  
P.O. Box 1549  
Manassas, VA 20108 USA  
[www.atcc.org](http://www.atcc.org)

800.538.6597 or 703.365.2700  
Fax: 703.365.2750  
Email: [Tech@atcc.org](mailto:Tech@atcc.org)

Or contact your local distributor

Page 1 of 3

#### 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 hypotriploid 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(6)t(1;6) (q11;q27); ?del(6) (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 submersed 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 vessel containing the complete growth medium be placed into the incubator for at least 15 minutes to allow the medium to reach its normal pH (7.0 to 7.6). pH (7.0 to 7.6).



# 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™)

American Type Culture Collection  
PO Box 1549  
Manassas, VA 20108 USA  
[www.atcc.org](http://www.atcc.org)

800.638.6597 or 703.365.2700  
Fax: 703.365.2750  
Email: [Tech@atcc.org](mailto:Tech@atcc.org)

Or contact your local distributor

- Incubate the culture at 37°C in a suitable incubator. A 5% CO<sub>2</sub> 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% CO<sub>2</sub> 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 cm<sup>2</sup> flask. Incubate at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> in air atmosphere until cells are ready to be subcultured.



### Subculturing Procedure

Volumes used in this protocol are for 75 cm<sup>2</sup> flask; proportionally reduce or increase amount of dissociation medium for culture vessels of other sizes. Coming® 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 6.0 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 10<sup>3</sup> and 1 x 10<sup>4</sup> viable cells/cm<sup>2</sup>. Do not exceed 7 x 10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup>.
- Incubate cultures at 37°C.

Interval: Maintain cultures at a cell concentration between 6 X 10<sup>3</sup> and 6 X 10<sup>4</sup> cell/cm<sup>2</sup>.

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-X.



### 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](http://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



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](http://www.atcc.org)

Additional information on this culture is available on the ATCC web site at [www.atcc.org](http://www.atcc.org).  
© ATCC 2014. All rights reserved. ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection. [10/30]

American Type Culture Collection  
PO Box 1549  
Manassas, VA 20108 USA  
[www.atcc.org](http://www.atcc.org)

800.638.6597 or 703.365.2700  
Fax: 703.365.2750  
Email: [Tech@atcc.org](mailto:Tech@atcc.org)

Or contact your local distributor

**ANEXO 3:**

**REGISTRO PARA LA VIABILIDAD CELULAR:**

**ENSAYO DE:** .....

**FECHA:**.....**HORA:**.....**RESPONSABLE:**.....

**6 – 72 HORAS**

<b>A 549 + EXTRACTO 1</b> V: M:	<b>A 549 + EXTRACTO 2</b> V: M:	<b>A 549 + EXTRACTO 3</b> V: M:	<b>A 549 + CISPLATINO 1</b> V: M:	<b>A 549 + CISPLATINO 2</b> V: M:	<b>A 549 + CISPLATINO 3</b> V: M:
V: M:	V: M:	V: M:	V: M:	V: M:	V: M:
V: M:	V: M:	V: M:	V: M:	V: M:	V: M:
<b>LH + EXTRACTO 1</b> V: M:	<b>LH + EXTRACTO 2</b> V: M:	<b>LH + EXTRACTO 3</b> V: M:		<b>A 549 CON MC</b> V: M:	
V: M:	V: M:	V: M:		V: M:	
V: M:	V: M:	V: M:		V: M:	

**Registro para la viabilidad celular:**

<b>Proliferación Tiempo ( horas)</b>	<b>CONFLUENCIA</b>	<b>CONFLUENCIA 1:10</b>	<b>CONFLUENCIA 1:50</b>
6 HORAS			
36 HORAS			
72 HORAS			

## **ANEXO 4:**

### **ELABORACIÓN DE ENSAYOS O PROTOCOLOS PARA EL MANTENIMIENTO DE LA LÍNEA CELULAR A-549:**

#### ***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

#### ***Criocongelación***

1. Hacer procedimientos de tripsinización.
2. Resuspender el pellet de obtenido de células en 1 ml de medio de cultivo de congelación.
3. Colocar en un criovial.
4. Realizar el conteo de la línea celular que se va a criogenizar.
5. Rotular cada criovial y colocarlo a congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas.
6. Luego de transcurrir las 24 horas colocar los crioviales en el tanque de nitrógeno líquido, indicando con claridad cuáles van a ser ubicados en cada canastilla.
7. Todos los días revisar si la cantidad de nitrógeno líquido está en la cantidad correcta.

#### ***Descongelación celular***

1. Encender cabina de bioseguridad y esterilizar 15 minutos antes de usar, de igual manera el baño maría a  $37^{\circ}\text{C}$
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  $37^{\circ}\text{C}$  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  $1.5 \times 10^6$  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 CO<sub>2</sub>.
11. Cambiar el medio de cultivo al día siguiente para eliminar posibles restos de DMSO y células muertas.

## ANEXO 5

### PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO EN DIFERENTES CONCENTRACIONES.

#### *Extracto acuoso*

- *Solución concentrada (Extracto 1):* Pesar 1 mg de extracto y disolver en 1 ml de medio de cultivo completo.
- *Solución de extracto 2 (1:10):* Tomar 100 ul de la solución 1 de extracto y agregar 900 ul del medio de cultivo completo.
- *Solución de Extracto 3 (1:50):* Tomar 20 ul de la solución de extracto 1 y agregar 980 ul de medio de cultivo completo.

## ANEXO 6:

### PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO RPMI (ROSWELL PARK MEMORIAL INSTITUTE) COMPLETO Y MEDIO DE CULTIVO CON PH ÁCIDO

#### **Medio de cultivo RPMI completo**

1. Atemperar medio de cultivo RPMI completo, Suero bovino fetal, penicilina/estreptomicina y anfotericina B.
2. En un matraz colocar 5 ml de suero bovino fetal
3. 0,5 ml de penicilina
4. 0,5 de anfotericina B
5. 44 ml de RPMI incompleto
6. 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:

- $V1 * N1 = V2 * N2$

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

$$50 * 1 = 10ml / 5$$

- |   |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"><li>- V1: quiero preparar</li><li>- N1: concentración que quiero preparar</li><li>- V2: lo que quiero calcular</li><li>- N2: La mayor concentración del HCL que es 5N</li></ul> |
|---|

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 acido torna de color amarillo al medio, un pH neutro es de color anaranjado y un pH alcalino se torna color fucsia.

## ANEXO 7:

### PREPARACIÓN DE CONTROLES POSITIVOS

1. Se realiza las diluciones en pocillos de 24, no olvidar trabajar las células previa tripsinización para que se suelten y realizar el conteo antes de empezar las diluciones.
2. Para las diluciones se parte de la proporción 1mg/ml; Al contar las células se debe hacer el cálculo del porcentaje de V y porcentaje de muertas
3. Se debe realizar cálculo para sacar el total de células que se van a usar diluidas en medio de cultivo. Ej: Tengo 40'420.000 en 10 ml cuanto serán en 8'000.000 que necesito diluir el medicamento (se refiere a la cantidad de células que voy a poner por cada dilución de medicamento) tomando en cuenta que es por duplicado, entonces necesito 1980ml (2ml) de células y agregar 8 ml de medio RPMI completo para completar la dilución a 10 ml.
4. Es decir por cada ml tengo 1'000.000. de células.
5. Rotular los pocillos a usarse y colocar 1 ml de células con el medio de cultivo que corresponde según los cálculos a 1'000.000, así para cada pocillo con medicamento por duplicado.
6. Para el pulmón (A549) el cisplatino en las siguientes proporciones :
  - **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.
7. Mezclar despacio e incubar durante 24 horas para observan la muerte celular.

## **ANEXO 8:**

### **OBTENCIÓN DE CÉLULAS LINFOIDEAS POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE FICOLL HYPaque**

#### ***Técnica de Fycoll Hypaque:***

1. Extraer 5ml de sangre venosa en un tubo tapa verde que contiene heparina.
2. Se coloca en un tubo Falcón 4 ml de PBS o solución salina, a este tubo se le adiciona 4 ml de sangre heparinizada.
3. En otro tubo se colocan 4 ml de Reactivo Hystopaque y se le adicionan los 4 ml de sangre diluida con la solución de PBS. Este procedimiento se lo debe realizar cuidadosamente tratando de incorporar la sangre muy despacio por las paredes de tubo
4. Centrifugar a 2000 rpm durante 15 minutos.
5. Extraer 1ml de los linfocitos que se encuentran en la interfase es decir en la parte media de la separación. Al fondo se encuentran los granulocitos y hematíes. Al centro las células mononucleares donde están los linfocitos B y T y encima se encuentra el plasma.
6. Una vez colocados los linfocitos en otro tubo falcón, agregarle 1 ml de PBS y centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos.
7. Eliminar el sobrenadante y Resuspender con 2 ml de medio de cultivo RPMI completo.
8. Realizar el conteo de las células con 20 ul de las mismas y 20 ul de azul de tripano, en una cámara de Neubauer a través de un microscopio.

## **ANEXO 9:**

### **TRIPSINIZACIÓN DE CÉLULAS A-549 (PASES O SUBCULTIVOS).**

1. Eliminar todo el contenido de medio de cultivo RPMI de la botella de cultivo falcón.
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. Realizar la técnica de viabilidad mediante el método de tinción de azul de tripán.

## **ANEXO 10**

### **CALCULAR LA CANTIDAD DE CÉLULAS PARA COLOCAR EN CADA POCILLO**

#### **Línea celular A-549:**

- Una vez realizados los contajes de las líneas celulares en el caso del extracto acuoso no existe solvente para la disolución del extracto por lo tanto se necesitaron 10 500000 cel/pocillo resuspendidas en 500 ul de medio de cultivo
- Se coloca los 500 ul del medio con 500.000 células en cada uno y luego se añaden los extractos y medicamentos como controles positivos en diferentes concentraciones
- Se procede a incubar las placas de cultivo en la incubadora de CO<sub>2</sub> al 5% y con humedad del 98%

## ANEXO 11

### PROLIFERACIÓN CELULAR:

- 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.
- Posteriormente se contaron las células V en la cámara de Neubauer que presentaban la forma típica de elongación, la misma que representa la confluencia.
- De las células V contadas se calculó el porcentaje de confluencia para evaluar el grado de proliferación.
- Realizamos los cálculos siguientes:

$$\text{Confluencia} = \frac{\text{número de células elongadas} * 100}{\text{total de células vivas}}$$



## **ANEXO 12**

### **PROTOCOLO DE VIABILIDAD CELULAR:**

#### ***Contaje de células con azul de tripano (viabilidad celular)***

1. Se realiza el contaje de las células tanto muertas como V para evaluar así de esta manera la viabilidad y citotoxicidad celular.
2. En placas de cultivo de 96 pocillos se colocan 20 ul 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 ul de azul de tripano y cargar en la cámara de Neubauer para su contaje.
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 13

### CERTIFICADO DE HABER REALIZADO LAS PRÁCTICAS EN LOS LABORATORIOS DE CULTIVO CELULAR DEL CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA.



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

Loja, 28 de mayo del 2015

Dr.  
Miguel Marín Gómez, Mg Sc.  
DIRECTOR DEL LABORATORIO DE CULTIVO CELULAR.  
A petición verbal de parte interesada:

#### CERTIFICO:

Que la Srta. MAYRA ALEXANDRA MEDINA LANCHE, estudiante del VIII módulo de la carrera de Laboratorio Clínico y con cédula de identidad número 1105199077, realizó sus prácticas en laboratorio de cultivos celulares (ensayos de citotoxicidad) como parte de su tesis, el 21, 22, 23 y 24 de mayo en el horario 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 MgSc.  
DIRECTOR DEL PROYECTO.

**ANEXO 14.**

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

**EXTRACTO**

**“ADEVA”**

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CME</b>	<b>FC</b>	<b>FT</b>
<b>Tratamiento</b>	27	8410.179524	311.488131	21.64	1.72
<b>Repetibilidad</b>	2	15.234286	7.617143	0.53	
<b>Error EX</b>	54	777.219048	14.392945		
<b>Error TOT</b>	83	9202.632857			

**COEFICIENTE DE CORRELACIÓN:**

<b>Coeficiente de correlación</b>	<b>Coeficiente variación</b>	<b>Valor medio</b>
0.915544	14.91526	25.43571

**“DUNCAN”:**

GRUPO DUNCAN	MEDIA	R	TRATAMIENTO
A	45.333	3	A549_ext3_72
A	43.333	3	A549_ext3_60
A	41.600	3	A549_ext1_72
A	41.167	3	A549_ext1_60
A B	39.267	3	A549_ext1_48
B C	34.600	3	A549_ext2_72
B C D	33.433	3	A549_ext2_60
B C D	32.967	3	test_72
C D	31.033	3	A549_ext2_48
DE	27.567	3	A549_ext3_48
DEF	26.567	3	test_60
EFG	24.167	3	test_48
EFG	23.967	3	A549_ext3_24
EFG	23.600	3	A549_ext1_36
EFG	23.533	3	A549_ext2_36
EFG	23.433	3	test_36
EFGH	22.133	3	A549_ext1_24
EFGH	21.367	3	A549_ext3_36
FGHI	19.333	3	A549_ext2_12
GHIJ	18.900	3	A549_ext2_24
GHIJ	17.733	3	A549_ext3_12
HIJK	16.267	3	test_12
HIJK	15.700	3	test_24
HIJK	15.533	3	A549_ext3_6
IJK	14.167	3	A549_ext1_12
IJK	13.400	3	A549_ext1_6
JK	11.800	3	A549_ext2_6
K	10.300	3	test_6

**“STUDENT”**

media	TC	TT
0.0857143	0.04	2,16

**CISPLATINO:****“ADEVA”**

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CME</b>	<b>FC</b>	<b>FT</b>
<b>Tratamiento</b>	27	37246.74988	1379.50925	116.10	1.72
<b>Repetibilidad</b>	2	37.19452	18.59726	1.57	
<b>Error EX</b>	54	641.62548	11.88195		
<b>Error TOT.</b>	83	37925.56988			

**COEFICIENTE DE CORRELACIÓN:**

<b>Coeficiente de correlación</b>	<b>Coeficiente variación</b>	<b>Valor medio</b>
0.983082	9.574742	36.00119

**“DUNCAN”:**

GRUPO DUNCAN	MEDIA	R	TRATAMIENTO
A	89.200	3	A549_cis1_72
B	77.667	3	A549_cis1_60
C	70.400	3	A549_cis1_48
C	69.400	3	A549_cis2_72
C	65.767	3	A549_cis1_36
D	53.300	3	A549_cis3_72
D	50.867	3	A549_cis2_60
E	43.933	3	A549_cis3_60
E F	40.033	3	A549_cis2_48
E F G	38.267	3	A549_cis1_24
F G	37.367	3	A549_cis3_48
GH	32.967	3	test_72
GHI	32.333	3	A549_cis3_36
H I J	29.467	3	A549_cis2_36
I JK	26.567	3	test_60
JK	25.333	3	A549_cis1_12
JK	24.167	3	test_48
JK	23.800	3	A549_cis1_6
KL	22.300	3	A549_cis2_12
KLM	22.000	3	test_36
KLM	21.867	3	A549_cis2_24
KLMN	20.367	3	A549_cis3_24
KLMN	20.167	3	A549_cis3_12
LMNO	16.267	3	test_12
MNO	15.700	3	test_24
NO	15.233	3	A549_cis2_6
O	13.000	3	A549_cis3_6
O	10.300	3	test_6

**“STUDENT”**

MEDIA	TC	TT
20.1857143	4.48	2.16

## LINFOCITOS

### “ADEVA”

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CME</b>	<b>FC</b>	<b>FT</b>
<b>Tratamiento</b>	27	5900.419048	218.534039	33.67	1.72
<b>Repetibilidad</b>	2	0.733571	0.366786	0.06	
<b>Error EX</b>	54	350.473095	6.490243		
<b>Error TOT</b>	83	6251.625714			

### COEFICIENTE DE CORRELACIÓN:

<b>Coeficiente de correlación</b>	<b>Coeficiente variación</b>	<b>Valor medio</b>
0.943939	25.84517	9.857143

**“DUNCAN”:**

<b>GRUPO DUNCAN</b>	<b>MEDIA</b>	<b>R</b>	<b>TRATAMIENTO</b>
A	32.967	3	test_72
B	26.567	3	test_60
B	24.167	3	test_48
B	22.767	3	test_36
C	16.533	3	test_24
C	16.267	3	test_12
CD	15.767	3	A 549_lin1_72
CDE	14.333	3	A 549_lin3_72
DEF	11.400	3	A 549_lin1_60
EF	10.900	3	A 549_lin2_72
EFG	10.300	3	test_6
FGH	9.600	3	A 549_lin1_48
FGHI	8.867	3	A 549_lin3_60
FGHI	8.500	3	A 549_lin2_60
GHIJ	5.867	3	A 549_lin1_36
GHIJ	5.700	3	A 549_lin2_48
HIJK	5.300	3	A 549_lin3_48
HIJK	5.167	3	A 549_lin2_36
IJ KL	4.300	3	A 549_lin1_24
IJ KL	4.167	3	A 549_lin3_36
JKL	3.433	3	A 549_lin1_12
JKL	3.000	3	A 549_lin2_24
JKL	3.000	3	A 549_lin3_24
JKL	2.733	3	A 549_lin2_12
JKL	1.967	3	A 549_lin3_12
JKL	1.900	3	A 549_lin1_6
KL	0.533	3	A 549_lin2_6
L	0.000		A 549_lin3_6

**“STUDENT”**

<b>MEDIA</b>	<b>TC</b>	<b>TT</b>
13.9142857	12.03	2,16



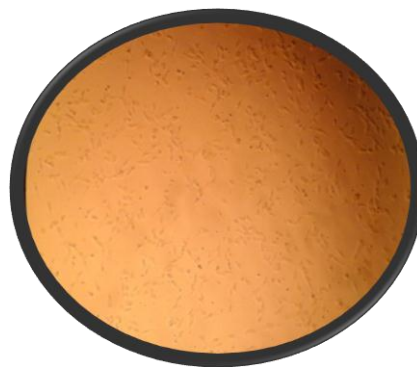
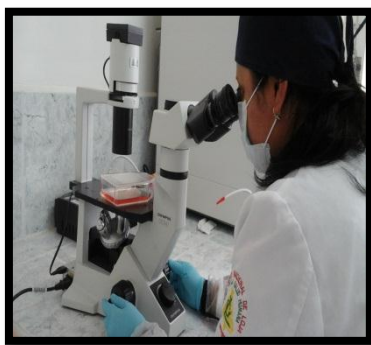
## ANEXO 15

### FOTORELATORIA

### INCUBACIÓN CELULAR



### OBSERVACIÓN DE CRECIMIENTO CELULAR EN EL MICROSCOPIO DE INVERSIÓN



### FASE ANALÍTICA.

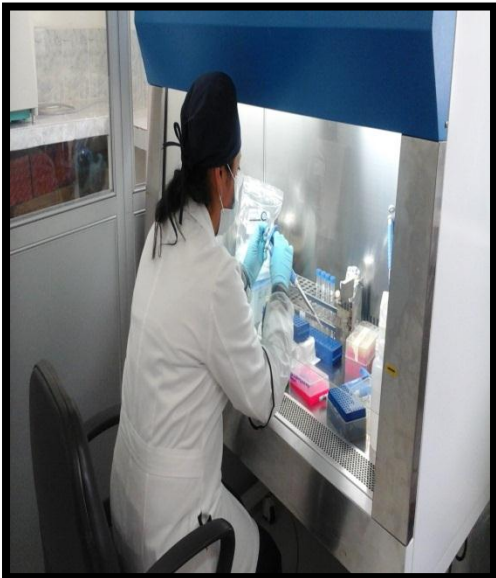
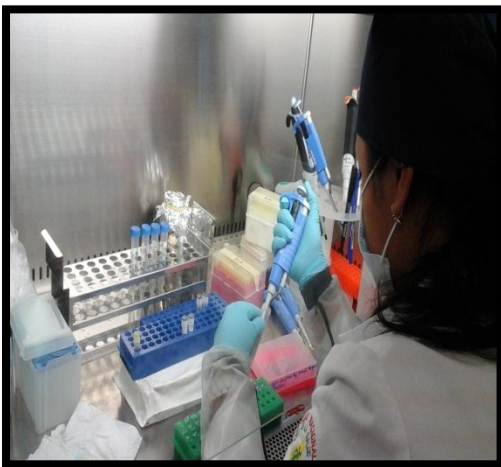
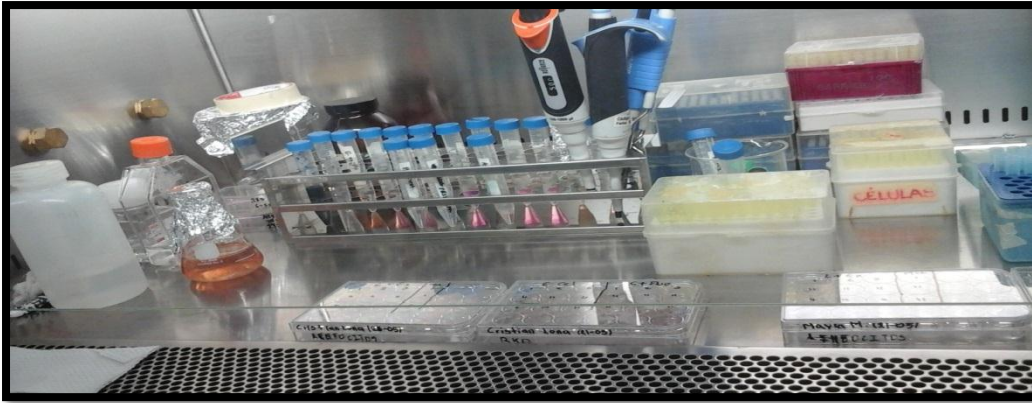
### MEDIO DE CULTIVO



### TÉCNICA FICOLL HYPaque



# PROCESOS DE CULTIVO CELULAR



## ÍNDICE

CONTENIDOS	Págs.
Certificación.....	ii
Autoría.....	iii
Carta de Autoría.....	iv
Dedicatoria.....	v
Agradecimiento.....	vi
1 Título.....	1
2 Resumen.....	2
Summary.....	3
3 Introducción.....	4
4 Revisión de Literatura.....	7
4.1 Medicina Tradicional.....	7
4.2 Plantas Medicinales.....	7
4.3 Fitomedicina.....	7
4.4 Fitofármaco.....	8
4.5 Metabolitos a nivel vegetal.....	8
4.5.1 Metabolitos primarios.....	8
4.5.2 Metabolitos secundarios.....	10
4.6 Conceptualización de <i>Annona cherimola</i> .....	13
4.7 Características Generales.....	13

4.8	Extracto.....	16
4.8.1	Métodos de obtención de extractos.....	16
4.9	Células linfoideas o normales.....	16
4.10	Células Cancerígenas.....	16
4.10.1	Cáncer de pulmón.....	17
4.11	Cultivo celular:.....	17
4.11.1	Tipos de cultivo celular.....	18
4.12	Medio de cultivo.....	18
4.12.1	Clasificación de los medios de cultivo.....	19
4.12.2	Factores de crecimiento celular.....	19
4.13	Criopreservación.....	19
4.14	Potencial Hidrógeno.....	19
4.15	Viabilidad celular.....	20
5	Materiales y Métodos.....	21
6	Resultados.....	24
7	Discusión.....	36
8	Conclusiones.....	38
9	Recomendaciones.....	39
10	Bibliografía.....	40
11	Anexos.....	44
	Índice.....	69