



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

ÁREA DE LA SALUD HUMANA

CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

**“EFECTO CITOTÓXICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS
DE ANNONA CHERIMOLA EN UNA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER
DE COLON HUMANO EN MEDIO DE CULTIVO CON PH NEUTRO”**

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

AUTORA

KAREN PRISCILA LOJAN MEDINA

DIRECTORA

DRA. MARICELA DEL ROSARIO LÓPEZ MOROCHO, MG. SC.

Loja- Ecuador

2015

CERTIFICACIÓN

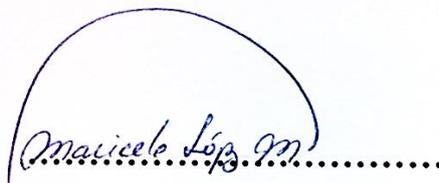
DRA. MARICELA DEL ROSARIO LÓPEZ MOROCHO, Mg. Sc.

DIRECTORA DE TESIS

CERTIFICA:

Que la tesis titulada “**EFECTO CITOTÓXICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE ANNONA CHERIMOLA EN UNA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE COLON HUMANO EN MEDIO DE CULTIVO CON PH NEUTRO**” es presentada y elaborada por la Sra. Karen Priscila Lojan Medina, previo a la obtención del título de Licenciada en Laboratorio Clínico, ha sido elaborada, corregida y orientada bajo mi dirección y una vez revisada autorizo su presentación, defensa, y exposición, ante el tribunal correspondiente.

Atentamente:



DRA. MARICELA DEL ROSARIO LÓPEZ MOROCHO, Mg. Sc.

DIRECTORA DE TESIS

AUTORÍA

Yo **Karen Priscila Lojan Medina**, estudiante de la carrera de Laboratorio Clínico del Área de La Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja, declaro libre y voluntariamente ser la autora intelectual del presente trabajo de tesis, así como de los conceptos, ideas, metodología, resultados, discusiones, conclusiones y recomendaciones vertidas en el presente trabajo investigativo son de mi absoluta y total autoría, adjudicándome la total responsabilidad del criterio ideológico de la misma.

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

- **AUTORA:** Karen Priscila Lojan Medina
- **FIRMA:** 
- **NÚMERO DE CÉDULA:** 1105140840
- **FECHA:** 14 de Diciembre de 2015.

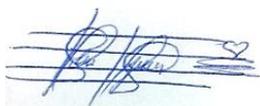
CARTA DE AUTORIZACIÓN

Yo, **KAREN PRISCILA LOJAN MEDINA**, declaro ser la autora de la tesis titulada “EFECTO CITOTÓXICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE ANNONA CHERIMOLA EN UNA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE COLON HUMANO EN MEDIO DE CULTIVO CON PH NEUTRO”.

Como requisito para optar al grado de Licenciada en Laboratorio Clínico, autorizo al sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos, muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional (RDI):

- Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el RDI, en las redes de información del país y del exterior, con los cuales tengan convenio la Universidad.
- La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia de la tesis que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja a los 14 días del mes de diciembre de 2015, firma la autora:

- **Firma:** 
- **Autora:** Karen Priscila Lojan Medina
- **Cédula:** 1105140840
- **Dirección:** Av. 8 de diciembre y Psje. María Bella
- **Teléfono:** 072 541915
- **Celular:** 0985823951
- **Correo electrónica:** lojankaren@gmail.com

DATOS COMPLEMENTARIOS

- **Directora de Tesis:** Dra. Maricela del Rosario López Morocho, Mg. Sc.
- **Tribunal de Grado:**
 - **Presidenta:** Lic. Glenda Alfarita Rodríguez León, Mg. Sc.
 - **Vocal:** Lcda. Carmen Alejandra Ullauri González, Mg. Sc.
 - **Vocal:** Lcda. María del Cisne Lojan González, Mg. Sc.

AGRADECIMIENTO

Al término de mis estudios universitarios me permito agradecer de manera principal a Dios por ser el dueño de mi existencia y llenarme de bendiciones todos los días; gracias por darme fuerzas, por tu compañía, por iluminar mi mente, mi corazón y por permitirme culminar esta etapa de mi vida.

A mi familia porque hacen mi vida especial, a mi esposo Juan y mi hijo Sebastián por ser el motor de mi vida, por todo su amor infinito, comprensión, paciencia y apoyo incondicional.

A mi madre Narcisa por ser mi ejemplo a seguir, a mis hermanas Magaly y Gaby mi sobrina Jazmín y a mi cuñado Carlos, por no dejarme desfallecer nunca y acompañarme con su infinito amor y comprensión ante todos los tropiezos a lo largo de mi carrera.

A todo el personal administrativo de la carrera de Laboratorio Clínico del Área de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja los cuales con su apoyo y entereza me supieron guiar hacia la culminación de mis estudios universitarios convirtiéndome en una profesional ética, con conocimientos amplios y aptos para aportar a la sociedad.

Agradezco también al Doctor Miguel Marín Director del Macroproyecto de Investigación del Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja el cual me dio la oportunidad de formar parte del personal elegido para tan majestuoso proyecto que conjunto con la ayuda de la Licenciada Carmen Pineda nos ayudaron a culminar el proyecto con éxito.

A la Doctora Maricela López M., quién con su paciencia, profesionalismo, y conocimientos, me supo dirigir en el asesoramiento de la presente tesis, brindándome su apoyo incondicional y asesoría hasta la culminación final de la misma. Gracias infinitas a todos.

Karen Lojan Medina

DEDICATORIA

Con todo cariño y amor incondicional dedico el esfuerzo del presente trabajo de tesis:

En primer lugar a mi Dios, que por su infinita misericordia y sublime amor me supo guiar y darme la fortaleza necesaria para seguir en pie frente a todas las circunstancias que se me presentaron para lograr alcanzar cada una de mis metas propuestas.

A mi esposo, amigo y confidente Juan, por su paciencia, comprensión, y amor infinito e incondicional, el cual supo sobrellevar paso a paso cada peldaño de mis estudios universitarios, además de ayudarme con la crianza de mi adorado hijo Juan Sebastián motor principal y responsable de la culminación y dedicatoria de la presente tesis.

Por último pero no menos importante a mi madre Narcisa, hermanas Magaly y Gaby, mi sobrina Jazmín, mi cuñado Carlos y a todo el resto de mi familia ya que gracias a su apoyo, compañía, consejos y amor, han sido un soporte esencial en cada logro realizado durante toda mi carrera.

Karen Lojan Medina

1. TÍTULO

“EFECTO CITOTÓXICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE ANNONA
CHERIMOLA EN UNA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE COLON HUMANO EN
MEDIO DE CULTIVO CON PH NEUTRO”

2. RESUMEN

La investigación experimental abarca temas nuevos e innovadores que ayudan a la búsqueda de métodos eficaces, económicos y naturales para el tratamiento de enfermedades, así como en el caso del cáncer de colon, en la que el organismo produce un exceso de células anormales en crecimiento y multiplicación; invadiendo los tejidos circundantes del intestino grueso, hasta su unión con el recto, produciendo a largo plazo, metástasis por vía linfática o hemática dando lugar a tumores en otros órganos. Se desarrolló la presente investigación experimental y prospectiva realizando estudios acerca del efecto citotóxico del extracto etanólico de las hojas de *Annona Cherimola* en líneas celulares de cáncer de colon en medio de cultivo con pH neutro. En el presente estudio investigativo se aplicó técnicas como procesos de tripsinización e incubación para subcultivar y mantener las células tumorales, además de realizar procedimientos de viabilidad celular mediante tinción con azul de tripano, y observación en la cámara de Neubauer, a la vez la determinación de la proliferación celular mediante la observación de la confluencia de las células tumorales, procedimientos por los cuales obtuvimos resultados de viabilidad celular demostrando un porcentaje de muerte celular de las líneas tumorales de cáncer de colon del 88.1% con el extracto etanólico a mayor concentración a las 72 horas, en cuanto al grado de proliferación celular se obtuvo resultados del 17% con el extracto concentrado a las mismas horas, los cuales evidencian que si se obtuvo muerte celular y menor confluencia en las células tumorales, logrando así determinar el efecto citotóxico que produjo el extracto etanólico de las hojas de la *Annona Cherimola* en las células tumorales utilizadas, sin embargo se deja aún la puerta abierta a investigaciones posteriores que ayuden a determinar de mejor manera el efecto citotóxico de todos los componentes de esta planta en los distintos tipos de cáncer.

Palabras clave: *Cáncer, Annona Cherimola, extracto, citotóxico.*

SUMMARY

The experimental investigation covers new and innovative themes that help finding more effective, economic and natural methods to treat some diseases as well as in the case of colon cancer, in which the body produces an excess of unusual cell growth and multiplication; invading the surrounding tissues of the large intestine, to its junction with the rectum, causing long term metastasis via the lymphatic or hematic leading to tumors in other organs. So we focus on developing the present experimental and conducting prospective research studies of cytotoxic effect of etanolic extract from the leaves of Annona Cherimola cell lines of colon cancer in culture medium with neutral pH. In this research study techniques applied as trypsinization and incubation processes for subculturing and maintaining tumor cells, in addition to methods of cell viability by trypan blue staining and observation in a Neubauer chamber, while determining cell proliferation by observing the confluence of tumor cells, procedures by which we obtained results of cell viability demonstrating the percentage of cell death of the tumor cell lines of colon cancer of 88.1% with the ethanol extract at highest concentration at 72 hours in the degree of cell proliferation we obtained results of 17% with the concentrated extract at the same times, which show that if we obtained cell death and lower confluence in tumor cells, thus achieving determine the cytotoxic effect produced by the ethanol extract the leaves of Annona Cherimola in tumor cells used, however the door open to further research that will help better determine the cytotoxic effect of all components of this plant in various types of cancer is still left.

Key Words: Cancer, Annona Cherimola, extract, experimental cytotoxic.

3. INTRODUCCIÓN

El cáncer de colon es una enfermedad producida por células malignas localizadas en la porción intermedia y más larga del intestino grueso alcanzando el recto y ano. El colon, junto con el recto (porción final del intestino grueso), es el lugar donde se almacenan las heces antes de ser expulsadas al exterior a través del ano. Al encargarse de esta labor, acumula sustancias de desecho, por lo que es un lugar propicio para la aparición del cáncer (Abad, 2009).

El cáncer de colon ocupa el 3er lugar en incidencia y el 4to en mortalidad a nivel mundial. La tasa de incidencia de cáncer de colon en América Latina está estimada en 9 casos x 100.000 habitantes. En el Ecuador el cáncer es un problema importante de Salud Pública. En 1980, 6 de cada 100 defunciones fueron provocadas por cáncer de colon; en 2010, ese porcentaje subió a 16 casos, se estima que en nuestro territorio cada año se diagnostican 20.000 casos nuevos de cáncer. De éstos la mayor parte son diagnosticados en Quito y Guayaquil. Loja es una de las provincias con mayor incidencia de enfermedades oncológicas del país. Las condiciones de vida, particularmente la alimentación, son parte de los factores que contribuyen para que las enfermedades oncológicas en especial el cáncer de colon se propague (Dr. Lupera H. - 2013).

Según el Registro de SOLCA Núcleo de Loja, los principales tipos de cáncer en la provincia son: el de estómago, piel, cuello uterino, mama y el de próstata, encontrándose el cáncer de colon en un porcentaje de 1,3% con un total de 48 casos en mujeres, a diferencia del sexo masculino con un porcentaje del 1,2% con un total de 39 casos en el periodo 2005- 2009 (SOLCA- registro).

El presente trabajo investigativo se realizó en los laboratorios de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja con el objetivo de conocer el efecto citotóxico del extracto etanólico de las hojas de *Annona Cherimola* en líneas celulares de cáncer de colon en medio de cultivo con pH neutro, además de determinar la viabilidad y proliferación celular, realizando procedimientos entre los cuales constan ensayos de tripsinización para los subcultivos de células tumorales, previas a la utilización en el ensayo de viabilidad celular en el cual se aplicó

el extracto etanólico concentrado y diluido en 1:10, 1:50 en la suspensión de células en medio de cultivo RPMI completo con pH neutro, además se realizó procedimientos de viabilidad celular mediante técnicas de tinción con azul de tripán para la observación al microscopio y conteo celular en la cámara de Neubauer, además de la observación en el microscopio de la confluencia de las células tumorales observando así la proliferación celular.

Procedimientos por los cuales se obtuvieron valores de viabilidad celular en un porcentaje de muerte de células tumorales de un 88.1% con el extracto etanólico en medio de cultivo con pH neutro a mayor concentración en las 72 horas.

En cuanto a la proliferación celular se observó un porcentaje de 0% de confluencia a las 6 horas en todas las concentraciones utilizadas del extracto etanólico en medio de cultivo con pH neutro, debido a que las células se encuentran recién suspendidas con el extracto utilizado, por lo que a las 36 horas se observó un aumento significativo de células en multiplicación y crecimiento dando un porcentaje del 35.3% con el extracto concentrado, en cuanto a las 72 horas, las células ya no confluyen debido al transcurso del tiempo y acción del extracto, observándose así que en el extracto concentrado existe una disminución del porcentaje en un 17%, de confluencia producida en las células RKO (es una línea celular de carcinoma de colon poco diferenciada desarrollada por Michael Brattain) se logró así determinar el efecto citotóxico del extracto de las hojas de la Annona Cherimola demostrando que si existió muerte celular y por ende disminución de la confluencia de las mismas ya que no permitió que se sigan multiplicando.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Cáncer de Colon o Colorrectal (CCR)

Es el tumor maligno o neoplasia que procede de las células de la mucosa del intestino grueso y de sus glándulas, apareciendo sobre un pólipo existente en la mucosa del colon, que por diversas circunstancias evoluciona a tumor maligno. El colon o intestino grueso es el último tramo del tubo digestivo, posee una longitud aproximada de 1,5 metros y se extiende desde el final del intestino delgado hasta el ano (AECC – 2015).

Puede diseminarse de tres maneras:

4.1.1 Crecimiento local: se produce principalmente al crecer en profundidad invadiendo todas las capas que forman la pared del tubo digestivo, desde la mucosa hasta la serosa pasando por la capas submucosa y muscular. Una vez que el tumor traspasa toda la pared del intestino puede invadir cualquier órgano, bien abdominal o bien a distancia (AECC – 2015).

4.1.2 Diseminación linfática: El colon posee una rica red de vasos linfáticos que permiten el drenaje de la linfa a múltiples regiones ganglionares. La diseminación por esta vía se realiza de forma ordenada, afectando primero a los ganglios más próximos y, posteriormente, a los más alejados (AECC – 2015).

4.1.3 Diseminación hematológica: Las células tumorales pasan al torrente circulatorio y a través de la sangre se diseminan preferentemente hacia el hígado, pulmón, hueso y cerebro (AECC – 2015).

4.2 Factores de Riesgo

Existen una serie de factores de riesgo bien establecidos como son: edad superior a 50 años, existencia de tumores benignos previos, colitis ulcerosa o granulomatosa y predisposición hereditaria. Alrededor del 75% aparecen en individuos sin factores de predisposición conocidos, dando lugar a los cánceres de colon llamados esporádicos. En el restante 25% existen antecedentes familiares, pero solo un 10% aproximadamente se relacionan con un componente hereditario sugerente de una contribución genética (Bonilla – 2009)

4.3 Medicina Tradicional

La medicina tradicional es todo el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales (OMS – 2015). La medicina tradicional, también se conoce como: complementaria, alternativa, popular, blanda, marginal, no oficial, no ortodoxa y no convencional. Es un hecho que en las últimas décadas, se ha difundido ampliamente a nivel global, incluidos los países desarrollados. es la suma total de conocimientos, técnicas y procedimientos basados en las teorías, las creencias y las experiencias indígenas de diferentes culturas, sean o no explicables, utilizados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas y mentales (UMSA – 2011).

4.4 Fitofármacos

En las últimas dos décadas, la industria farmacéutica internacional ha abierto una novedosa línea de productos, basada en extractos estandarizados de especies vegetales el contenido del principio activo del extracto ha sido analizado y cuantificado. Esta tendencia, responde a la búsqueda de medicamentos naturales por parte de los consumidores. Hoy en día, se puede palpar un compromiso creciente en cuanto a: la investigación, el desarrollo, la innovación, la producción y comercialización de medicamentos basados en los extractos estandarizados de especies vegetales. En sí, la fitoterapia es la ciencia que estudia el uso de plantas medicinales y las incorpora en formas farmacéuticas (fitofármacos), cuya calidad, seguridad y eficacia están garantizadas, teniendo en cuenta las características de las drogas vegetales y extractos. La calidad, la seguridad y la eficacia, se determinan a través de análisis químicos, físicos y microbiológicos. Algunos elementos a tomar en durante los análisis son: características organolépticas, porcentaje de humedad, pH, viscosidad, variación de peso, llenado de volumen, y otras (Cea R. – 2013).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), define a los fitofármacos, como: productos obtenidos por procesos tecnológicamente adecuados, empleando exclusivamente materias primas vegetales, con finalidad profiláctica, curativa, paliativa o para fines de diagnóstico. Se caracteriza por el conocimiento de su eficacia y de los riesgos de su uso, así como para la

reproducibilidad y la constancia de su calidad. La investigación científica es la única forma de comprobar que los productos fitoterapéuticos sean prescritos por los médicos y tengan el equivalente al de los productos que se obtienen a través de síntesis química (Cea R. – 2013).

4.5 Metabolitos a Nivel Vegetal

Son metabolitos primarios de las plantas los compuestos químicos que intervienen en los procesos mencionados como son: la fotosíntesis, la respiración, el transporte de solutos, la translocación, la síntesis de proteínas, la asimilación de nutrientes, la diferenciación de tejidos, y en general la formación de carbohidratos, lípidos y proteínas que intervienen en estos procesos o son parte estructural de las plantas, los aminoácidos destinados a la formación de proteínas, los nucleótidos, los azúcares, los acilglicéridos. El concepto de metabolitos primarios fue creado en contraposición al de "metabolitos secundarios de las plantas", que no cumplen un rol directo en la supervivencia de la planta y por lo tanto su ausencia no es letal para ésta, aunque sí cumplen importantes roles de defensa, atracción de polinizadores, entre otros (Zeiguer E.; & Lincoln T. – 2015).

4.6 Principios Activos

Los principios activos son los ingredientes de los medicamentos herbarios que tienen actividad terapéutica. En el caso de los medicamentos herbarios cuyos principios activos hayan sido identificados, se debe normalizar su preparación, si se dispone de métodos analíticos adecuados, para que contengan una cantidad determinada de ellos. Si no se logra identificar los principios activos, se puede considerar que todo el medicamento herbario es un solo principio activo (OMS – 2015).

4.7 Annona Cherimola

Fruto del chirimoyo, árbol perteneciente a la familia Annonáceas, nombre común de una familia formada por más de 2.000 especies, en su mayor parte árboles y arbustos tropicales. Normalmente es una fruta redondeada de forma acorazonada, de color verde claro con hoyos que se asemejan a huellas digitales o a las escamas de un reptil. Su pulpa es cremosa, formando ligeros grumos de aspecto gelatinoso que alberga diversas semillas de color negro brillante que se desprenden con bastante facilidad. Su sabor es dulce, parecido al de la fresa y la frambuesa, con un fino aroma a canela. Los tamaños del fruto más comunes van desde los 70 a los 85 milímetros y más (Raiseb – 2006).

4.8 Origen

La chirimoya (*Annona cherimola*) tiene su origen en los valles interandinos de Perú y Ecuador, situados entre los 1 500 y 2 000 msnm. El centro de origen donde han recogido material genético diversos investigadores ha sido el Perú que ha efectuado hace muchos años trabajos de selección. La chirimoya es un fruto de clima subtropical, cuyo crecimiento y fructificación natural son óptimos cuando la temperatura media anual está comprendida entre los 14°C y 24°C. El requerimiento en clima es que sea fresco, relativamente seco y con pocas fluctuaciones de temperatura (Raiseb – 2006).

4.9 Taxonomía y Morfología

- **Familia:** *Annonaceae*.
- **Género:** *Annona*.
- **Especie:** *Annona cherimola*.
- **Sistema radicular:** superficial y ramificado, pudiendo originar dos o tres pisos o planos de raíces a diferentes niveles, aunque poco profundos.
- **Hojas:** árbol caducifolio, pero en zonas con invierno suave se hace perennifolio o al menos mantiene las hojas hasta la primavera siguiente (perennifolio facultativo). Hojas ovales, en disposición alterna, con peciolo corto y nerviación regular, recubiertas por el envés de una pelosidad aparente (Castro J. – 2007).

4.10 Propiedades y Beneficios

El valor nutricional de la chirimoya, es muy rico el 75% de su composición es agua, el resto es hidratos de carbono (glucosa y fructosa), fibra, calorías debido a su contenido de azúcar. Contiene también:

- Gran cantidad de carbohidratos, donde se encuentra fructosa y glucosa en mayor cantidad.
- Tiene un buen contenido de vitaminas A, C, las cuales ayudan a fortalecer las defensas y es un buen antioxidante.
- Contiene una buena cantidad de Potasio, que nos ayuda con la contracción muscular y la prevención de calambres.
- Tiene una buena cantidad de fibra, la que ayuda a tener una buena motilidad intestinal.
- Minerales como; el Magnesio, Fósforo, Calcio y Hierro.

- Niacina, Riboflavina, Tiamina, Ácido fólico, Ácido ascórbico. Antioxidantes (Instituto Vital – 2011).
- Transmite y genera el impulso nervioso y la actividad muscular.
- Combate el Colesterol.
- Es útil en problemas de tránsito intestinal, estreñimiento (gran poder laxante).
- Hipertensión, Cardiovasculares.
- Controla los niveles de azúcar en sangre.
- Favorece la formación de glóbulos rojos blancos, piel, vista, dientes, huesos, colágeno.
- También es Antibacteriano, Antiparasitario, Anti espasmódico. Astringente, Febrífugo, Hipotenso, Sedativo, Estomacal y Vasodilatador.
- Es utilizada para combatir los estados de ansiedad, depresión nerviosismo y tensión.
- Es eficaz contra los parásitos internos y los gusanos.
- Regula la presión arterial alta (Instituto Vital – 2011).

En algunos países además de la acción anti cancerígena tienen diferentes usos ancestrales y tradicionales: En Brasil (acción analgésica, antirreumática y anti febrífuga), Haití (astenia, gripe y anti espasmosmodica), México (bronquial y anti diarreico), Panamá (dispepsias y alergias), Venezuela (afecciones hepáticas) y Malasia (afecciones reumáticas) (Instituto Vital – 2011).

La siguiente tabla muestra una lista de la cantidad de los principales nutrientes de la chirimoya por cada 100 gramos:

NUTRIENTE	CANTIDAD	NUTRIENTE	CANTIDAD
Grasas saturadas	0,20 g.	Grasas monoinsaturadas	0,10 g.
Adenina	0 mg.	Grasas poliinsaturadas	0,30 g.
Agua	81,60 g.	Guanina	0 mg.
Cafeína	0 mg.	Grasa	0,70 g.
Calorías	72,50 kcal.	Luteína	0 ug.
Carbohidratos	14,10 g.	Proteínas	1,25 g.
Colesterol	0 mg.	Purinas	0 mg.
Fibra insoluble	0 g.	Quercetina	0 mg.
Fibra soluble	0 g.	Teobromina	0 mg.
Fibra	2,40 g.	Zeaxantina	0 ug.

4.11 Las Acetogeninas de Annonaceae

Las acetogeninas (ACG) de la familia Annonaceae son metabolitos secundarios considerados como el grupo más potente de inhibidores del complejo I mitocondrial. Estas moléculas muestran un efecto antiproliferativo sobre líneas celulares cancerosas, aun en aquellas con multi-resistencia a las drogas, por lo que pudieran ser relevantes en el desarrollo de nuevos fármacos antineoplásicos (Adelina M.; Rosa A.; & Mercedes L. – 2009).

Estructuralmente, la mayoría de las acetogeninas poseen una cadena alifática de 35 ó 37 átomos de carbono con uno, dos o tres anillos tetrahidrofuránicos (THF) adyacentes o no, así como sustituyentes oxigenados (hidroxilos, cetonas y epóxidos) localizados a lo largo de ésta. En uno de sus extremos presentan un anillo lactónico metil sustituido, α , β insaturado, en ocasiones saturado como cetolactona. También se han descrito compuestos con dobles enlaces en la cadena alifática, compuestos con anillos tetrahidropirano (THP) así como lineales. Las ACG poseen una fuerte actividad inhibitoria sobre la proliferación de las líneas celulares neoplásicas. Se las considera como uno de los grupos de inhibidores más potentes del complejo I mitocondrial (Adelina M.; Rosa A.; & Mercedes L. – 2009).

En los estudios sobre el complejo I utilizando partículas submitocondriales, se ha observado que las ACG naturales o sus derivados semisintéticos pueden retener su actividad inhibitoria a pesar de introducir modificaciones en su molécula. La variación estereoquímica de las unidades tetrahidrofurano, de los grupos hidroxilos que los flanquean, del tipo de lactona terminal o de las substituciones en los grupos a lo largo de la cadena alifática no parecen ser restrictivas para su actividad. El complejo I mitocondrial tiene un papel importante en la síntesis de ATP a partir de las moléculas reducidas que se producen en el metabolismo central celular y se especula que debido a la rápida proliferación de las células cancerosas, éstas requieren de niveles altos de energía, por lo que pudieran ser más sensibles a su descenso y presentar cambios fisiológicos importantes (Adelina M.; Rosa A.; & Mercedes L. – 2009).

4.12 Líneas Celulares

Los científicos han desarrollado metodologías para aislar células y obtener poblaciones celulares homogéneas, que luego pueden ser incluso mantenidas y multiplicadas *in vitro* (“en vidrio” = en recipientes especiales, en el laboratorio). Los cultivos celulares son esenciales en la investigación científica, ya que permiten estudiar los procesos que ocurren en las células, y

en diversas aplicaciones de la biotecnología, como la producción de moléculas de interés industrial, ingeniería de tejidos, etc. (Segretín – 2010).

La mayoría de las células animales y vegetales aisladas pueden vivir, multiplicarse, e incluso presentar ciertas propiedades diferenciales, si se las cultiva en placas de plástico y con medios de cultivo adecuados. Así, las células pueden ser observadas continuamente bajo el microscopio o analizadas bioquímicamente, para estudiar los efectos del agregado o remoción de moléculas específicas, como hormonas o factores de crecimiento. Además, se pueden estudiar las interacciones entre células, cultivando en la misma placa más de un tipo celular. Cuando los experimentos se realizan con cultivos celulares, se los denomina ensayos “in vitro” (“en material de laboratorio”), para diferenciarlos de aquellos que se llevan a cabo en organismos completos, o experimentos “in vivo” (“en organismo viviente”) (Segretín – 2010).

Existen distintos tipos de líneas celulares entre las cuales constan las siguientes:

- **Línea celular continua:** Línea celular que ha demostrado posibilidades de ser subcultivada in vitro por lo menos 70 veces (≥ 70 subcultivos) indefinidamente.
- **Línea celular finita:** Línea celular que tiene un número limitado de posibles subcultivos (alrededor de 50)
- **Líneas celulares diploides:** El 75% de la población celular tiene igual cariotipo que las células normales de la especie de origen.
- **Líneas celulares heteroploides:** Tienen menos del 75% de las células con cromosomas diploides (Brito – 2012)

4.13 Líneas Celulares Comunes

4.13.1 Líneas celulares humanas

- HeLa (cáncer cervical)
- Hep-G2 (cáncer de hígado)
- DU145 (cáncer de próstata)
- Lncap (cáncer de próstata)
- MCF-7 (cáncer de mama)
- MDA-MB-438 (cáncer de mama)
- PC3 (cáncer de próstata)
- T47D (cáncer de mama)

- THP-1 (leucemia mieloide aguda)
- U87 (glioma)
- SHSY5Y células de neuroblastoma humano, clonadas a partir de mieloma múltiple
- Saos-2 cells (cáncer óseo)

4.13.2 RKO (línea celular de cáncer de colon)

RKO es una línea celular de carcinoma de colon poco diferenciado desarrollado por Michael Brattain. Se puede utilizar como la línea celular de control para investigar los efectos de algunos ensayos con la misma en parámetros celulares. Las RKO células carecen de receptores nucleares, esta es la línea celular de sus padres (isogénico) de RKO -E6 (ATCC CRL - 2578) y la RKO - A545-1 (ATCC CRL - 2579) (ATCC - 2014).

4.14 Cultivos Celulares

Los cultivos se establecen principalmente a partir de suspensiones celulares generadas por disgregación de tejidos. A diferencia de las bacterias, la mayoría de las células que forman parte de tejidos no pueden vivir en suspensión, y requieren una superficie sólida sobre la cual crecer y multiplicarse. Este soporte generalmente es la base de una placa o frasco de plástico, aunque a veces los requerimientos son más complejos y el plástico debe antes recubrirse con componentes de la matriz extracelular (sustancia que rodea y contiene a las células en los tejidos, y con la cual interactúan), como por ejemplo el colágeno y la laminina (Segretín – 2010).

4.14.1 Cultivos primarios

Se denominan así a aquellos cultivos preparados directamente a partir de un tejido u órgano. Pueden iniciarse con o sin fraccionamiento previo para separar los distintos tipos celulares. En estos cultivos las células están vivas, conservan sus características originales y su proliferación es limitada. Pueden ser removidas del recipiente de cultivo para formar cultivos secundarios (Segretín – 2010).

4.14.2 Cultivos secundarios

En estas condiciones las células suelen multiplicarse hasta cubrir la superficie del recipiente de cultivo, formando una monocapa (capa de una célula de espesor). Como consecuencia del

contacto entre las células se detiene temporalmente su proliferación, hasta que se las subcultiva a un recipiente con medio fresco. Así, podrán subcultivarse durante semanas o meses. En este estadio, las células frecuentemente mostrarán distintas propiedades según su origen. Por ejemplo, los fibroblastos (células que sintetizan fibras y mantienen la matriz extracelular del tejido de muchos animales) secretarán colágeno, las células derivadas de tejido muscular esquelético se fusionarán para generar fibras musculares con capacidad contráctil espontánea, las células nerviosas extenderán prolongaciones (axones) eléctricamente excitables que podrán conectarse (establecer sinapsis) con otras células nerviosas, las células epiteliales formarán largas capas con varias propiedades de un epitelio intacto (figura 4). Gracias a que estos fenómenos ocurren en cultivo, es posible estudiarlos con diferentes metodologías, a veces no aplicables a tejidos intactos (Segretín – 2010).

4.14.3 Cultivos continuos o líneas celulares

La mayoría de las células de los vertebrados dejan de dividirse luego de un determinado número de divisiones en cultivo, por un proceso llamado senescencia celular. Por ejemplo, los fibroblastos humanos normales se dividen solamente entre 25 y 40 veces en cultivo, antes de detenerse. En estas células, así como en muchas otras, la capacidad limitada de proliferación es el resultado de un acortamiento progresivo de los telómeros (porción de ADN que se encuentra en los extremos de los cromosomas). En las células somáticas (todas las células que no son células sexuales) se encuentra “apagado” el gen que codifica para la enzima telomerasa, que se encarga de mantener la integridad de los telómeros; como consecuencia, los telómeros se acortan en cada división celular. A los fibroblastos humanos se los puede forzar a proliferar indefinidamente si se les provee el gen que codifica para la telomerasa; así, pueden propagarse como una línea celular “inmortalizada”. Pero como se mencionó, no todas las células humanas se immortalizan de la misma manera. Algunas células, a pesar de que sus telómeros permanezcan largos, pueden frenar sus divisiones celulares como consecuencia de la activación de mecanismos denominados “puntos de control” (check points) del ciclo celular. Para immortalizar estas células, hay que lograr la inactivación de los check-points. Una forma de hacerlo es introducir ciertos “oncogenes” (genes promotores del cáncer) que pueden obtenerse de virus que causan cáncer, como algunas cepas del virus del papiloma humano, adenovirus, etc. (Segretín – 2010).

4.15 Medios de Cultivo

Para el cultivo celular se utilizan placas con medios líquidos que contienen pequeñas cantidades de una serie de moléculas necesarias para la supervivencia y multiplicación celular: sales, glucosa, aminoácidos y vitaminas. Además, la mayoría de los medios incluyen una mezcla poco definida de macromoléculas adicionadas bajo la forma de suero fetal bovino o equino, o extracto crudo de embriones de pollo. Dichos medios se utilizan en la actualidad para los cultivos de rutina, y por lo tanto es difícil saber qué macromoléculas requiere un determinado tipo celular para funcionar y multiplicarse (Pietrasanta L., & Birderling C. - 2011).

Como consecuencia, se han desarrollado numerosos medios químicamente definidos, denominados “libres de suero”, que poseen, además de las pequeñas moléculas mencionadas, varias proteínas específicas necesarias para la supervivencia y proliferación, como los factores de crecimiento. Así, gracias a estudios que buscaban establecer las condiciones mínimas de cultivo para un comportamiento celular adecuado, se descubrieron muchas moléculas de señalización extracelulares esenciales para la supervivencia, desarrollo y proliferación de determinados tipos celulares (Pietrasanta L., & Birderling C. - 2011).

Los medios de cultivo son generalmente tamponados para mantener un pH alrededor de 7,4 y tienen, además, indicadores de pH, como el rojo fenol, que cambian de color a medida que aparecen catabolitos ácidos como resultado del metabolismo celular. Suelen agregarse también antibióticos y antimicóticos para impedir la contaminación con microorganismos (Pietrasanta L., & Birderling C. - 2011).

Los cultivos crecen usualmente en contenedores de plástico o vidrio con una superficie apropiada para la adhesión celular, y se mantienen en una estufa a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂, 95% aire (Pietrasanta L., & Birderling C. - 2011).

4.15.1 Suero Bovino Fetal (SFB)

El suero fetal bovino (SFB) es un producto único de gran importancia en la ciencia, especialmente en los campos de la medicina y de la biotecnología. El SFB es un subproducto derivado del faenamiento de vacas preñadas (Quiminet – 2015).

Los medios de cultivo contienen normalmente SFB (u otros tipos de sueros animales), y el producto se utiliza en varios campos de aplicación, como por ejemplo investigación de cáncer, toxicología, diagnóstico, producción de vacunas, investigación de células madres (troncales),

y en la producción de proteínas, como interferón, anticuerpos monoclonales, factor humano de coagulación VIII, etc (Quiminet – 2015).

El SFB es el único medio universal aplicable para el cultivo y proliferación in vitro y en la producción biológica de células animales. Aunque la composición, los efectos y las interacciones exactas de todos los componentes de SFB tienen todavía que ser esclarecidas (descubiertas), los componentes principales pueden ser resumidos a continuación:

- Proteínas necesarias para la adherencia de las células a la matriz de soporte
- Enzimas y Hormonas proteicas
- Factores específicos de promoción del desarrollo celular
- Factores de inhibición del desarrollo celular
- Hormonas no proteicas
- Lípidos esenciales para el desarrollo, diferenciación y multiplicación celular
- Minerales
- Metabolitos y nutrientes
- Sustancias con capacidad de tampón (buffer)
- Inhibidores de proteasas
- Ligantes
- Inactivantes de materiales tóxicos

El SFB es un ingrediente esencial en la formulación de medios de cultivo celular utilizados en la investigación y en la producción de productos biológicos, incluyendo células madre (troncales) y otras aplicaciones innovadoras (Quiminet – 2015).

4.15.2 Medio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute)

El medio Roswell Park Memorial Institute, comúnmente conocida como RPMI, es una forma de instrumento utilizado en el cultivo de células y cultivo de tejidos. Tradicionalmente se ha utilizado para el crecimiento de células humanas linfoides. Este medio contiene una gran cantidad de fosfato y está formulado para su uso en una atmósfera de dióxido de carbono 5%. Hay una variedad de medios similares en la serie de RPMI, como RPMI 1640 (TecMed Chile – 2011).

RPMI-1640 es un medio de cultivo que fue desarrollado por Moore et al. en el Roswell Park Memorial Institute, de ahí el acrónimo RPMI. La formulación se basa en el medio RPMI-1630 que utiliza un sistema amortiguador de bicarbonato y variaciones en las cantidades de aminoácidos y vitaminas. Es un medio que ha sido usado para el cultivo de leucocitos humanos normales y neoplásicas,

y ha demostrado una amplia aplicabilidad para apoyar el crecimiento de muchos tipos de células en cultivo, incluyendo frescos linfocitos humanos (TecMed Chile – 2011).

Es una mezcla de sales enriquecida con aminoácidos y otros componentes esenciales para el crecimiento celular. Actúa como una solución nutritiva en cultivo celular, se destina al cultivo de células humanas y de otros animales. Este medio es distribuido deshidratado, en polvo o como líquido. La presentación en polvo tiene la ventaja de mantenerse estable por más de 24 meses cuando conservado bien cerrado y refrigerado (TecMed Chile – 2011).

Probado en por lo menos tres linajes celulares diferentes, siendo siempre determinados su pH y osmolaridad. Cada lote es liberado solo si está dentro de los límites adecuados, además de promover un óptimo crecimiento celular (TecMed Chile – 2011).

4.15.3 Recipientes para el cultivo de células

Existen numerosos contenedores y recipientes para cultivar células y tejidos, dependiendo de las características de las células a cultivar y de la escala deseada. Cuando se cultivan células para hacer experimentos, se hacen cultivos a pequeña escala. En esta escala, las células se multiplican en frascos que tienen una base de 25 a 175 cm². (Pietrasanta L., & Birderling C. - 2011).

En un recipiente típico de 175cm² pueden obtenerse aproximadamente 107 células adheridas, y unas 108 células cuando se trata de líneas que crecen en suspensión. En las botellas de cultivo estándares no es posible producir cantidades mayores de células, dada la cantidad de tiempo insumida para los repetidos pasajes necesarios a medio fresco, la demanda de espacio en un incubador (que controla la composición de gases, la temperatura y la humedad del entorno) y el costo de los insumos (Pietrasanta L., & Birderling C. - 2011).

Una vez que las células llegan a confluencia (forman una monocapa que cubre todo el recipiente de cultivo), el cultivo se divide en nuevos cultivos de menor cantidad de células que pueden seguir reproduciéndose (Pietrasanta L., & Birderling C. - 2011).

Para lograrlo, la muestra es tratada con diversas enzimas proteolíticas (como tripsina y colagenasas) que degradan las proteínas de la matriz extracelular; y también se utilizan agentes (como el EDTA -ácido etilendiaminotetraacético-) que secuestran al ión calcio, del cual depende la adherencia celular. De esta forma, y mediante una suave agitación, se obtiene una

suspensión celular de la cual se pueden hacer diluciones (Pietrasanta L., & Birderling C. - 2011).

4.16 Fluorouracilo

El fluorouracilo (5-FU) es una pirimidina fluorada que pertenece a la clase de los antimetabolitos antineoplásicos. Difiere del uracilo en un átomo de flúor añadido en la posición 5. Desde hace muchos años, el 5-fluoruracilo se utiliza en combinación con otros fármacos en el tratamiento de muchos tumores sólidos, incluyendo los tumores de mama, cánceres colorectales y cáncer de cabeza y cuello. La toxicidad y eficacia del fluorouracilo depende de la forma de administración, siendo muy alta la variabilidad entre pacientes y la vía y forma de administración. Así, por ejemplo, en el tratamiento del cáncer colorectal, la administración en infusión continua proporciona mejores resultados antitumorales que la misma dosis administrada en un bolo, con menores efectos hematológicos tóxicos (ANMAT – 2013).

4.16.1 Mecanismo de acción: El fluorouracilo es un antimetabolito que inhibe la timidilato sintasa y, por lo tanto interfiere con la síntesis del RNA y del DNA

- **Efectos sobre el RNA:** para incorporarse al RNA, el fluorouracilo se debe transformar en monofosfato de fluorouracilo, lo que se puede producir de dos maneras:
 - Mediante la transferencia directa de una ribosa desde el fosforibosilpirofosfato al 5-fluoruracilo, transferencia que es catalizada por la acido-orótico-fosforibosiltransferasa.
 - Adición de una ribosa al 5-fluoruracilo mediante la uridina-fosforilasa para formar la fluorouridina. Esta experimenta seguidamente una fosforilización con uridina kinasa para ocasionar el monofosfato de fluoruracilo. Este último experimenta dos fosforilizaciones secuenciales a través de la pirimidina monofosfato kinasa y pirimidina difosfato kinasa, respectivamente. El trifosfato de fluoruracilo es entonces incorporado al RNA, bloqueando la actividad del ADN y su síntesis (ANMAT – 2013).
- **Efectos sobre el DNA:** El fluorouracilo puede ser transformado en fluorodeoxiuridina mediante la acción de la timidina fosforilasa y luego a fluorodeoxiuridina monofosfato a través de la timidina kinasa. Alternativamente, la fluorodeoxiuridina monofosfato puede formarse indirectamente mediante la conversión de la fluoruridina difosfato a fluorodeoxiuridina difosfato y luego a fluorodeoxiuridina monofosfato. Esta última es

capaz de formar un enlace covalente, firme pero reversible con la timidilato sintasa en presencia de metilentetrahidrofolato. La ligazón de la fluorodeoxiuridina monofosfato a la timidina sintasa bloquea la síntesis del timidinilato a partir del uracilo. Como el timidinilato es el precursor de la timidina trifosfato, uno de los cuatro deoxiribonucleótidos necesarios para la síntesis de DNA, su deficiencia ocasiona la depleción del trifosfato de timidina y, la interrupción de la síntesis de DNA.

- **Citotoxicidad:** Durante las primeras 24 h de exposición al 5-fluoruracilo, se observa una citotoxicidad en la fase S del ciclo celular, probablemente debida a los efectos del fármaco sobre el DNA. A las 24 horas, la citotóxicidad tiene lugar en la fase G-1, probablemente a consecuencia de la incorporación del 5-FU en el RNA. La selectividad del 5-fluoruracilo hacia las células en división rápida se debe a que las concentraciones de timidilato sintasa son 20 veces mayores en las células en división que en las células no proliferantes (ANMAT – 2013).

4.16.2 Farmacocinética: El 5-fluoruracilo se puede administrar tópica o parenteralmente. Debido a su absorción digestiva muy baja y variable, este fármaco no se administra por vía oral. Después de la aplicación tópica de 1 g de 5-fluoruracilo sobre la piel, se absorbe aproximadamente el 6% de la dosis. El fármaco se distribuye ampliamente por todo el organismo, cruzando la barrera hematoencefálica y produciendo concentraciones significativas en el líquido cefalorraquídeo que se mantienen durante varias horas. También se distribuye en el líquido pleural y ascítico (ANMAT – 2013).

El 5-fluorouracilo exhibe una farmacocinética no lineal, a medida que aumentan las dosis intravenosas, disminuye la captación hepática, aumenta la biodisponibilidad y la AUC, y se reduce el aclaramiento. Este comportamiento es debido a una saturación de los procesos de metabolización del fármaco. Una pequeña cantidad de 5-fluoruracilo es transformada en metabolitos activos (fluoruridina trifosfato y fluorodeoxiuridina monofosfato) en los diferentes tejidos. El resto (un 85% aproximadamente) es catabolizado mediante la dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD) a una dihidropirimidina. Esta enzima (la DPD) está presente en todo el organismo, incluyendo el hígado, la mucosa intestinal y los leucocitos periféricos. Al exhibir un ritmo circadiano y estar presente de forma muy variable, ocasiona unos niveles plasmáticos de 5-fluoruracilo impredecibles. En algunos individuos, la ausencia o los bajos niveles de la dihidropirimidina deshidrogenasa, hace que el 5-fluoruracilo sea muy tóxico, incluso en dosis bajas (ANMAT – 2013).

Después de la administración intravenosa de 5-fluoruracilo, la semi-vida de eliminación es de 16 minutos (entre 8 y 20 minutos) y es dosis-dependiente. A diferencia del fármaco nativo, los nucleótidos intracelulares fluoruridina trifosfato y fluorodeoxiuridina monofosfato tienen semi-vidas muy prolongadas.

El fluoruracilo sin alterar y sus metabolitos son eliminados primariamente a través de la bilis y de la orina.

El 5-fluoruracilo se ha administrado intra-arterialmente mediante infusión en la vena hepática. En estas condiciones, el 19-50% de la dosis experimenta un metabolismo de primer paso y los niveles plasmáticos alcanzados son del 12 al 52% de los que se obtienen con la misma dosis por vía intravenosa (ANMAT – 2013).

También se puede administrar el 5-fluoruracilo por vía intraperitoneal. La ventaja de esta administración consiste en que el fármaco es absorbido primariamente a través de la circulación portal, pasando a través del hígado antes de alcanzar la circulación sistémica (ANMAT – 2013).

4.17 American Type Culture Collection (ATCC)

La ATCC es una organización privada sin fines de lucro en la biotecnología cuyo campo cuya misión se centra en la adquisición, la autenticación, la producción, la conservación, el desarrollo y la distribución de referencia estándar de microorganismos, líneas celulares y otros materiales para la investigación en las ciencias de la vida. Fundada en 1914 como la American Type Culture Collection (Colección de Tipos de Cultivos Americanos) y originalmente incorporada por los científicos en 1925 para servir como centro de depósito y distribución mundial de cultivos de microorganismos, ATCC se ha convertido en el líder mundial en la investigación y experiencia en el desarrollo para identificar, caracterizar, conservar y distribuir una amplia gama de líneas celulares y microbiológicas. Aparte de mantener el biorepositorio, un programa y un equipo de desarrollo de productos, ATCC también compite por subsidios federales, los contratos y se involucra en alianzas y colaboraciones con instituciones académicas y empresas privadas (Flannigan B; Samson R; Miller J. - 2010).

4.18 Obtención de Extractos

4.18.1 Extracto Etanólico

Para la obtención de los extractos etanólicos se secaron las hojas de las plantas a la sombra, luego se pulverizaron en licuadora y se maceraron 100 g de las mismas en 400 ml de etanol (96%) por 2 semanas. La solución se filtró en 4 capas de gasa y se colocó en un evaporador rotatorio. El alcohol fue separado por destilación y el extracto puro obtenido fue envasado en un frasco ámbar y colocado en un refrigerador (4 °C) para su posterior uso (Quevedo, O., Crozzoli, R. & Perichi, G. – 2010).

4.19 Técnicas

4.19.1 Medición de la Proliferación Celular

La estimación de la capacidad proliferativa de los tumores y de la expresión del fenómeno apoptótico, no es una cuestión insignificante. Existe una correlación entre apoptosis y proliferación en tejidos sanos, pero también en tumores. Una mayor tasa de proliferación se ha asociado con peor pronóstico en la mayoría de los tumores, y una peor respuesta a los tratamientos oncológicos con quimioterapia y radioterapia. Así mismo, el porcentaje basal de células apoptóticas o la capacidad de inducir la muerte celular por diversos tratamientos, han demostrado un relevante papel pronóstico y predictivo de respuesta a tratamientos oncológicos.

Existen diversas técnicas para estimar la extensión de la expresión de estos fenómenos en los tumores (Lara P., Navarro D., & Saez M. - 2010).

Así, en laminillas diagnósticas, teñidas con hematoxilina eosina, azul de tripán, etc. puede realizarse el recuento de mitosis y células apoptóticas, lo que permitirá información aproximada de acerca de estos fenómenos en un paciente concreto (Lara P., Navarro D., & Saez M. - 2010).

Sin embargo, las células proliferativas, no siempre están en mitosis, y por otra parte hay células apoptóticas, en las que aún no se han hecho visibles los cambios morfológicos que requieren su diagnóstico. De esta forma se utilizan técnicas de inmunohistoquímica, que en principio permitirían mejorar estos aspectos de detección, a la vez que podrían hacer más objetiva su evaluación (Lara P., Navarro D., & Saez M. - 2010).

La inmunotinción permite detectar todas las células en ciclo celular, por lo que podría ser una buena medida de la fracción de crecimiento. Los ensayos TUNEL, que marcan la incorporación de bases nitrogenadas en el DNA fragmentado permitirían detectar precozmente la apoptosis (Lara P., Navarro D., & Saez M. - 2010).

Sin embargo, estas técnicas de inmunohistoquímica permiten la evaluación de un número limitado de células. La utilización de citometría de flujo favorece el análisis de miles de células en espacios de tiempo corto. Tanto la proliferación, estimada a partir del porcentaje de células en fase S, como la apoptosis estimada mediante la tinción con yoduro de propidio y annexina V, son técnicas adecuadas de medida. Es posible realizar técnicas más complejas de biología molecular o hibridación in situ (Lara P., Navarro D., & Saez M. - 2010).

4.19.2 Viabilidad Celular

En Biología Celular es común el encontrarse con la necesidad de conocer el número de células presentes en un volumen dado; por ejemplo, cuando se realizan cultivos celulares se precisa saber cuántas células se encuentran en un momento con respecto al número de células que inicialmente se sembraron. En tales casos se requiere de un instrumento que permita contar directamente, o bien, calcular la concentración celular en un medio. Para resolver el problema de conteo celular, se ha optado, en algunos casos, por calibrar sistemas espectrofotométricos, cuyo fundamento se basa en las propiedades de absorción de la luz por parte de las células; sin embargo, tales sistemas son poco exactos y los resultados que se obtienen son difíciles de repetir. Una alternativa a este problema es el contar directamente el número de células presentes en un volumen conocido. Esto puede resultar un gran trabajo considerando el tamaño de algunas células, sin embargo, la cámara de Neubauer permite contar células de distintos tamaños de manera muy práctica (Pietrasanta L., & Birderling C. - 2011).

4.19.3 Azul de Tripán

El azul Tripán es una molécula coloreada de gran peso molecular que sólo es capaz de entrar en las células que tienen la membrana alterada. Por tanto una célula viva en perfecto estado se observará incolora mientras que una célula muerta o muy alterada se observará azul. De este modo se puede determinar la viabilidad celular, es decir, el número de células vivas dependiendo del número de células azules que vean en la cámara de Neubauer (Arenas N. – 2009).

4.19.4 Penicilina/estreptomicina (antibióticos y antifúngicos)

Participan como inhibidores del crecimiento de los contaminantes evitando el crecimiento de contaminantes en el cultivo, por lo que es, que se necesario suplementar con sustancias antibióticas de diferente espectro de acción el medio de cultivo siendo estrictamente controlada para evitar efectos nocivos sobre el cultivo (TecMed Chile – 2011).

4.19.5 Tripsinización, pase de células, cambios de medio, mantenimiento

La tripsina es una enzima que rompe los enlaces de las proteínas mediante hidrólisis. Es producida en el páncreas y activada en el duodeno. En cultivos celulares de células adherentes se usa para despegar las células de la superficie de crecimiento (placas de cultivo) y poder tenerlas en suspensión. Si tenemos las células mucho tiempo en tripsina, esta daña las células, para ello debemos inhibirla usando medio de cultivo, porque este contiene suero (FBS) que inhibe la acción de la tripsina (TecMed – 2011).

La tripsinización es una técnica que permite separar las células de su soporte mediante una enzima, la tripsina, que rompe las uniones de las células al soporte de un cultivo, así como las uniones entre las células de un tejido. Este proceso debe realizarse con cuidado ya que la tripsina también es capaz de destruir las células por digestión total. Cuando las células se hayan separado deben añadirse a una placa con medio o suero. En el suero hay moléculas que inhiben a la tripsina, parando la reacción impidiendo así la destrucción de las células (Arenas N. – 2009).

La mayoría de líneas celulares doblan en cultivo en 24-48h, cuando las condiciones de crecimiento son adecuadas. De esta manera, el número de células se multiplica en cualquier cultivo en unos pocos días, ocupando toda la superficie de la placa (en el caso de células adherentes), y empobreciendo el medio al consumirse los nutrientes y acumularse productos de deshecho en éste. Es por esto que si se desea mantener una línea en cultivo por más de unos pocos días, de manera periódica hay que reponer nutrientes y eliminar productos de degradación. Como normal general, cuando no se disminuye la densidad de células, se cambian 2/3 del medio cada 2-3 días; al dejar 1/3 del medio antiguo, si bien se arrastran productos de deshecho, también se mantienen sustancias producidas por las células y secretadas al medio que son positivas para su crecimiento (en cierta manera, las células no se sienten “solas” en el cultivo, como lo harían con un medio completamente nuevo, lo que induciría una parada o retraso en su crecimiento). Los cambios de medio pueden hacerse con una frecuencia

ligeramente flexible, aumentando ésta al aumentar la densidad de células. Es fácil observar cómo el pH del medio tiende a acidificarse más rápidamente (se torna naranja-amarillento) cuando la densidad es elevada, al aumentar los productos de deshecho liberados (Ramos M.; Gómez A.; - 2008).

4.19.6 Medios de congelación

Dependiendo de la disponibilidad de suero, las células se pueden congelar en los siguientes medios: DMEM completo, DMEM con 20% suero, o en 100% suero, en cualquier caso suplementados con 10% di-metil-sulfóxido (DMSO), como agente crioprotector. El DMSO es bastante tóxico a esta concentración, habiendo células que lo soportan peor que otras. En cualquier caso, hay que minimizar el tiempo que las células pasan a temperatura ambiente en presencia de DMSO. Por ello, es conveniente enfriar las células a 4 °C cuando se preparan para congelar. Al descongelar, diluir las células (que están en medio de congelación conteniendo DMSO) con DMEM completo, centrifugar y resuspender en DMEM completo cuanto antes (Ramos M.; Gómez A.; - 2008).

4.19.7 Congelación y Descongelación

La congelación de células ha de hacerse partiendo de una suspensión de células en suero 10% DMSO, a una densidad tal que, cuando vayan a ser sembradas adquieran inmediatamente la densidad adecuada para su óptimo crecimiento. Una cifra bastante estándar es una densidad de 1 millón de células / ml, congeladas en alícuotas de 1ml. Tras preparar esta suspensión y separar en alícuotas, las células se enfrían a 4 °C y posteriormente se congelan a -20 °C 24h, -70 °C, 24h y -170 °C, indefinidamente. Si se dispone de un recipiente aislante, que permite una bajada de temperatura gradual, las células se pueden poner directamente a -70 °C 24h. Si se requiere sólo conservar las células unas pocas semanas (1-2 meses), se pueden guardar a -70 °C. Para descongelar células, pasar las células -70 °C a un recipiente con hielo seco (-70 °C). Una vez que todo el material y medios estén preparados, descongelar las células transfiriéndolas del hielo seco a un baño a 37 °C, agitando el criotubo en el agua con la mano hasta su completa descongelación. Rociar etanol abundantemente, transferir las células a un tubo con 10 ml medio completo, centrifugar 5 min a 700 rpm (centrífuga de mesa, temperatura ambiente [room temp., RT]), descartar sobrenadante, resuspender células en el 6 volumen de medio adecuado y transferir a su placa de cultivo a la densidad adecuada. Colocar placa en incubador con 95% humedad y 5% CO₂.

4.19.8 Técnica de Ficoll Hypaque

La técnica de Ficoll hypaque es una técnica de centrifugación por gradiente de densidad para separar Células Mononucleares de Sangre Periférica (CMSP) de otras células de la sangre. Durante la centrifugación se van formando varias capas, el sedimento que está formado principalmente por granulocitos y eritrocitos ha migrado a través de la gradiente de densidad que es mayor al del ficoll hypaque, encima estaría otra capa que sería el ficoll hypaque que es menos denso, y encima estaría otra capa fina opalescente que serían las CMSP, finalmente sobre esa capa estaría las plaquetas y el plasma que con futuros lavados se estarían removiendo para tratar de obtener solo los linfocitos (Manrique E. – 2011).

4.19.9 Recuento de células: cámara de Neubauer

La cámara de Neubauer tiene la apariencia de un portaobjetos grueso; en una cara tiene una placa muy delgada de metal grabada con dos cuadrículas muy finas de medidas definidas, y separadas una de otra por una ranura. El fondo de la cámara del campo central es usualmente 0,1 mm más bajo (= profundidad cámara) que ambos campos adyacentes. Entre campo central el cubreobjetos que se coloca sobre la misma existe por tanto una ranura de 0,1 mm. La limitación lateral del volumen a contar se establece mediante la cuadrícula de recuento. De esta manera, es posible conocer el volumen de muestra celular que se coloca en la cámara, y sólo es necesario contar el número de células presentes en ese volumen. La concentración de la suspensión de células estará dada entonces por la cantidad de células contadas sobre el volumen de la cuadrícula (superficie contada * profundidad de la cámara) (Pietrasanta L., & Birderling C. - 2011).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Tipo de estudio

La presente investigación fue de diseño Experimental – Prospectiva.

5.2 Área de estudio

Se realizó con líneas celulares de cáncer de colon RKO (Línea celular de carcinoma de colon poco diferenciado desarrollado por Michael Brattain), (**Anexo 1**) en los laboratorios del centro de biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.

5.3 Muestra

Se utilizaron 12'000.000 de células de líneas celulares de Cáncer de colon RKO

5.4 Técnicas y procedimientos

5.4.1 Fase preanalítica

Se realizó el oficio dirigido al Dr. Miguel Marín Director del Proyecto para permitir y otorgar el certificado de participación del Macroproyecto “Efecto Citotóxico del Extracto Etanólico de las Hojas de Anona Cherimola en Líneas Celulares de Cáncer de Colon” (**Anexo N° 2**)

- Ensayos realizados para el mantenimiento de las células tumorales de cáncer de colon RKO.
- Preparación de medio de cultivo RPMI 1640 (Es una mezcla de sales enriquecida con aminoácidos y otros componentes esenciales para el crecimiento celular) completo con pH neutro. (**Anexo N° 3**)
- Preparación de medio de cultivo de congelación (**Anexo N° 3**)
- Subcultivos para mantenimiento y multiplicación de células RKO (tripsinización: es una técnica permite separar las células de su soporte mediante un enzima, la tripsina, que rompe las uniones de las células al soporte de un cultivo, así como las uniones entre las células de un tejido) (**Anexo N° 4**)
- Criocongelación (**Anexo N° 5**)
- Descongelación (**Anexo N° 6**)

- Elaboración de pruebas previas a la realización del ensayo para la estandarización de protocolos (**Anexo N° 7**)

5.4.2 Fase analítica

Se siguió el protocolo estandarizado con los siguientes procedimientos:

- Preparación de medio de cultivo RPMI completo para pH neutro(**Anexo N° 8**)
- Tripsinización de células RKO (**Anexo N° 4**)
- Técnica de Ficoll Hypaque (técnica de centrifugación por gradiente de densidad para separar Células Mononucleares linfocitos de Sangre Periférica) (**Anexo N° 9**)
- Para colocar las células en cada pocillo (cálculos) - líneas celulares (en el caso del extracto etanólico) (**Anexo N° 10**)
- Preparación de extractos en diferentes concentraciones - extracto etanólico (**Anexo N° 11**)
- Preparación de controles positivos – fluorouracilo (**Anexo N° 12**)
- Conteo de células con azul de tripano (viabilidad celular) (**Anexo N° 13**)
- Protocolo de proliferación celular (**Anexo N° 14**)

5.4.3 Fase postanálitica

- Se realizaron los cálculos correspondientes a la viabilidad celular con el porcentaje de vivas y muertas (**Anexo N° 15**)
- Se realizaron los cálculos correspondientes a la proliferación celular mediante el conteo de células confluentes (**Anexo N° 14**)

5.4.4 Controles

5.4.4.1 Positivos:

- Línea celular de cáncer de colón RKO más el fármaco fluorouracilo

5.4.4.2 Negativos:

- Línea celular tumoral RKO sin extracto
- Control guía DMSO

5.5 Análisis Estadístico

- Para el desarrollo de la presente se utilizó el programa estadístico SAS Statistical Analysis System (Sistema de Análisis Estadístico)

6. RESULTADOS

PROLIFERACIÓN CELULAR

TABLA N° 1

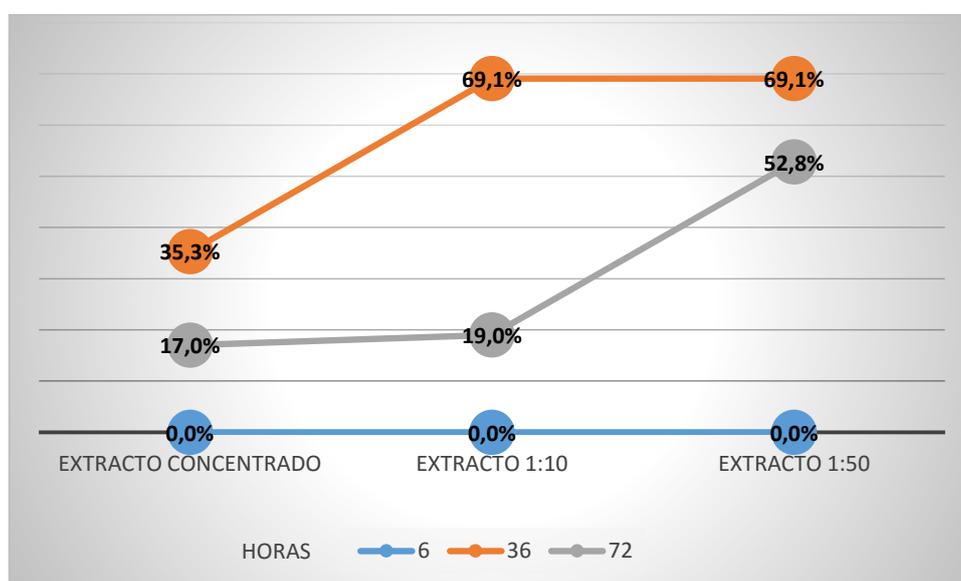
Confluencia de las células RKO con el extracto etanólico en medio de cultivo con pH neutro a diferentes concentraciones

Tiempo (horas)	CONFLUENCIA %		
	Extracto concentrado	Extracto 1:10	Extracto 1:50
6 h	0 %	0 %	0 %
36 h	35,3 %	69.1 %	69.1 %
72 h	17 %	19 %	52.8 %

Fuente: Datos de los laboratorios del centro de biotecnología de la Universidad Nacional de Loja
Elaborado por: Lojan Medina Karen Priscila

GRÁFICA N° 1

Confluencia de las células RKO con el extracto etanólico en pH neutro a diferentes concentraciones



Fuente: Datos de los laboratorios del centro de biotecnología de la Universidad Nacional de Loja
Elaborado por: Lojan Medina Karen Priscila

Interpretación: La presente gráfica representa un porcentaje de 0% de confluencia a las 6 horas en todas las concentraciones debido a que las células se encuentran recién suspendidas con el extracto y estas se multiplican cada 24 horas; por ende a las 36 horas se observa un aumento significativo de células en multiplicación y crecimiento dando un porcentaje del 35.3% con el extracto concentrado, a su vez con extracto diluido 1:10 el 69.1% y con extracto diluido 1:50 el 69.1%; en el caso de las 72 horas las células ya no confluyen debido al

transcurso de las horas y acción de los extractos, observando que en el extracto concentrado existe un porcentaje del 17%, a diferencia del extracto 1:10 con el 19% y extracto 1:50 con el 52.8% de la confluencia de células RKO. Como podemos observar la proliferación de las células ha disminuido en porcentaje con el extracto concentrado a diferencia de las demás concentraciones a las 72 horas, lo que demuestra el efecto citotóxico que produce el extracto etanólico en medio de cultivo con pH neutro de las hojas de la *Annona Cherimola* en las células RKO ya que no permite que sigan proliferándose.

TABLA N° 2

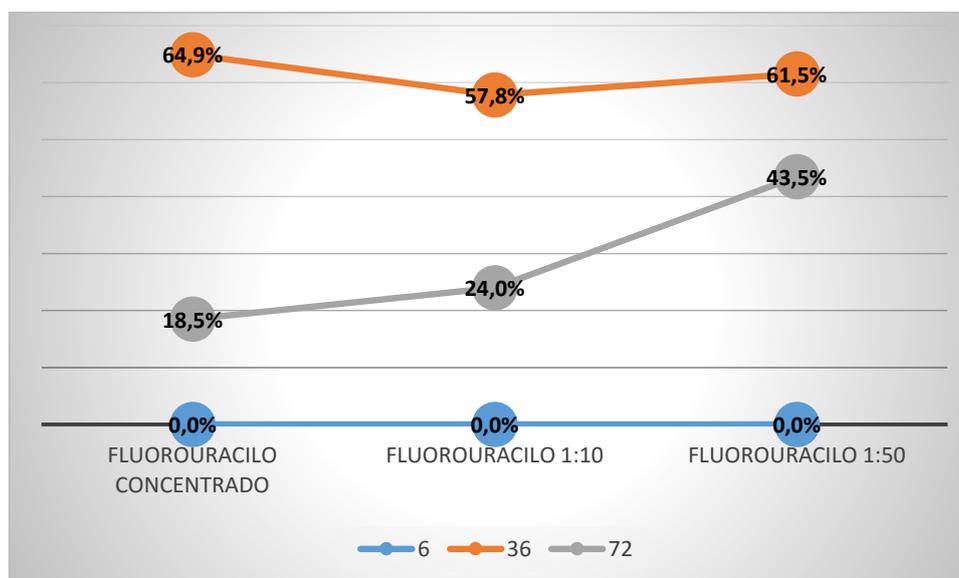
Confluencia de las células RKO con el fármaco fluorouracilo a diferentes concentraciones

Tiempo (horas)	CONFLUENCIA %		
	Fluorouracilo concentrado	Fluorouracilo 1:10	Fluorouracilo 1:50
6 h	0 %	0 %	0 %
36 h	64,9 %	57,8 %	61,5 %
72 h	18,5 %	24 %	43,5 %

Fuente: Datos de los laboratorios del centro de biotecnología de la Universidad Nacional de Loja
Elaborado por: Lojan Medina Karen Priscila

GRÁFICA N° 2

Confluencia de las células RKO con el fármaco fluorouracilo a diferentes concentraciones



Fuente: Datos de los laboratorios del centro de biotecnología de la Universidad Nacional de Loja
Elaborado por: Lojan Medina Karen Priscila

Interpretación: La presente gráfica representa un porcentaje de 0% de confluencia a las 6 horas en todas las concentraciones debido a que las células se encuentran recién suspendidas con el medicamento fluorouracilo y estas se multiplican cada 24 horas; por ende a las 36 horas se observa un aumento significativo de células en multiplicación y crecimiento dando un porcentaje del 64,9% con el fluorouracilo concentrado, a su vez con fluorouracilo diluido 1:10 el 57,8% y con fluorouracilo diluido 1:50 es del 43,5%; en el caso de las 72 horas las células ya no confluyen debido al transcurso de las horas y acción del fármaco, observando que en el fluorouracilo concentrado existe un 18,5%, en fluorouracilo 1:10 el 24% y fluorouracilo 1:50 el 43,5% de la confluencia producida de células RKO. Como podemos observar la proliferación de las células ha disminuido en porcentaje con el fluorouracilo concentrado, a diferencia de las

demás concentraciones del medicamento a las 72 horas, lo que demuestra que en comparación con el efecto citotóxico que produce el extracto etanólico en medido de cultivo con pH neutro de las hojas de la *Annona Cherimola* en las células RKO es similar al del fármaco fluorouracilo ya que los porcentajes son similares entre ellos, y al igual que el extracto no permite que las células tumorales sigan proliferando, así se demuestra el efecto del extracto en comparación con el fluorouracilo.

INTERPRETACION DE CONFLUENCIA %:

- No hay: 0%
- Baja: < 50%
- Alta: > 50%

VIABILIDAD CELULAR

TABLA N° 3

Extracto etanólico en medico de cultivo con pH neutro a diferentes concentraciones y su respectivo control negativo, en cada hora determinada

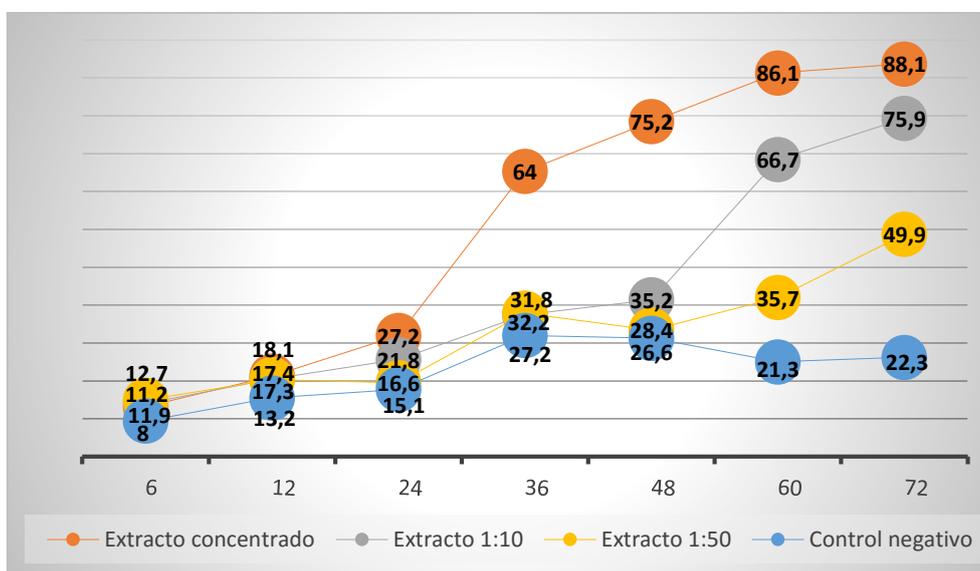
Horas Control	Extracto concentrado	Extracto 1:10	Extracto 1:50	Control negativo
6	11.2	11.9	12.7	8.0
12	18.1	17.4	17.3	13.2
24	27.2	21.8	16.6	15.1
36	64.0	31.8	32.2	27.2
48	75.2	35.2	28.4	26.6
60	86.1	66.7	35.7	21.3
72	88.1	75.9	49.9	22.3

Fuente: Datos de los laboratorios del centro de biotecnología de la Universidad Nacional de Loja

Elaborado por: Lojan Medina Karen Priscila

GRÁFICA N° 3

Extracto etanólico con pH neutro a diferentes concentraciones y sus respectivos controles negativos, en cada hora determinada



Fuente: Datos de los laboratorios del centro de biotecnología de la Universidad Nacional de Loja

Elaborado por: Lojan Medina Karen Priscila

Interpretación: La presente grafica nos indica los ensayos realizados de los extractos en las diferentes concentraciones, a distintas horas, observando que en las 72 horas ocurre mayor muerte celular demostrándose en porcentajes del 88,1% del extracto etanólico a mayor concentración, en relación con el extracto 1:10 con el 75,9% y extracto 1:50 con el 49,9% lo

que indica que el efecto del extracto etanólico a mayor concentración tiene mayor efecto citotóxico en relación a los demás concentraciones de los extractos. Se puede observar que en el transcurso de las primeras horas existe un menor porcentaje de células muertas ya que en el extracto concentrado a las 6 horas hay solo un 11.2 % de células muertas demostrando así que hay mayor efecto citotóxico en el transcurso del tiempo y a mayor concentración del extracto. En cuanto al control negativo presenta un porcentaje de muerte celular en un 22.3% a las 72 horas mientras que a las 6 horas existe un 8.0%, indicando que hay menor citotoxicidad, ya que como control negativo no se utilizó el extracto etanólico y las células solo se encontraban suspendidas con el medio de cultivo RPMI completo con pH neutro, así nos ayudó a verificar y validar los resultados obtenidos de viabilidad celular con el extracto etanólico en medio de cultivo con pH neutro de las hojas de *Annona Cherimola* en líneas celulares de cáncer de colon.

7. DISCUSIÓN

El cáncer es una enfermedad en la que el organismo produce un exceso de células en crecimiento y división exagerada, invadiendo tejidos circundantes, produciendo metástasis ya sea por vía linfática o hemática hacia otros órganos cercanos al afectado. El cáncer de colon es una enfermedad que se desarrolla debido a que la mucosa del colon contenida en un pólipo existente, evoluciona por diferentes causas hasta convertirse en células malignas que se localizan en toda la extensión del colon desde la porción intermedia hacia el recto y ano, convirtiéndose en un tumor maligno (AECC – 2015).

El presente trabajo investigativo de tipo experimental y prospectivo se realizó en los laboratorios de biotecnología de la Universidad Nacional de Loja, dónde se determinó el efecto citotóxico del extracto etanólico de las hojas de *Annona Cherimola* en células tumorales RKO en medio de cultivo con pH neutro, este estudio se llevó a cabo mediante el desarrollo de técnicas analíticas de viabilidad celular mediante tinciones con azul de tripán, observación al microscopio en la cámara de Neubauer, procedimientos de proliferación celular tras la observación de la confluencia de las células tumorales en el microscopio, obteniendo así resultados de viabilidad celular del extracto etanólico en medio de cultivo con pH neutro, en diferentes concentraciones, donde se observó muerte celular del 88,1% del extracto a mayor concentración, en relación con el extracto 1:10 con el 75,9% y extracto 1:50 con el 49.9% a las 72 horas . En cuanto a la proliferación celular se obtuvo un porcentaje de 0% de confluencia a las 6 horas en todas las concentraciones del extracto debido a que las células se encuentran recién tripsinizadas; por ende a las 36 horas se observa un aumento significativo de células en multiplicación y crecimiento dando un porcentaje del 35.3% con el extracto concentrado, a su vez con extracto diluido 1:10 el 69.1% y con extracto diluido 1:50 es del 69.1%; a las 72 horas las células ya no confluyen debido al transcurso de las horas y acción del extracto etanólico, observando que en el extracto concentrado existe un 17%, en extracto 1:10 el 19% y extracto 1:50 el 52.8% de la confluencia producida en las células RKO.

Un estudio realizado en el Departamento de Microbiología, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú 2009, acerca del efecto citotóxico del extracto etanólico de semillas de *Annona Cherimola* en las líneas celulares MCF-7(adenocarcinoma de mama humano), ME-

180 (carcinoma epidermoide de cervix), K562 (leucemia mieloide crónica) y 3T3 (fibroblastos normales de ratón). Las líneas MCF-7, ME-180, K562 y 3T3, fueron expuestas a cuatro concentraciones del extracto etanólico de semillas de *Annona Cherimola* 0,125, 0,031, 0,008, 0,002mg/ml, asimismo a diferentes concentraciones de 5-fluorouracilo (5-FU) 0,01563, 0,00391, 0,00098, 0,00024mg/ml y Cisplatino 0,00250, 0,00063, 0,00016, 0,00004mg/ml como controles positivos. Se hallaron los porcentajes de crecimiento en 48 horas. Se mostraron los siguientes resultados: cáncer de cervix (ME-180) en un 9,4, para adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) un 6,6, para leucemia mieloide crónica K562 un 2,2 y 29,5 para los fibroblastos de ratón, brindando así alentadores resultados para las células tumorales debido a su alta citotoxicidad, no observándose de la misma manera en el caso de las células normales como es el 3T3 con alto porcentaje de citotoxicidad. En el caso del medicamento ensayado en este estudio fluorouracilo se encontró para adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) un 3,4, para leucemia mieloide crónica K562 un 3,8 y 0,2 para los fibroblastos de ratón mostrándose así que el medicamento no es citotóxico para las células normales 3T3.

Mediante otro estudio realizado en el Laboratorio de Investigación del Departamento de Farmacología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y de la Facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Peruana Cayetano Heredia en el año 2006, se evaluó el efecto citotóxico selectivo *in vitro* de Muricin H. (acetogenina de *Annona muricata*) en cultivos celulares de cáncer de pulmón y fibroblastos de ratón, se mostraron los siguientes resultados: para cáncer de pulmón (H460) de <0.06 y para los fibroblastos de ratón (3T3) de 6.16 brindando así no tan buenos resultados para las células tumorales debido a su baja citotoxicidad considerándose >1 citotóxico para células tumorales según el método de concentración inhibitoria mediante el análisis de regresión lineal, no observándose de la misma manera en el caso de las células normales como es el 3T3 con alto porcentaje de citotoxicidad. En el caso del medicamento ensayado en este estudio fluorouracilo se encontró para cáncer de pulmón (H460) de 0,46 y para fibroblastos (3T3) 0.29. Mientras que los índices de selectividad para muricin H fue de >102.6 y para fluorouracilo de 0.63 en donde se demostró la acción citotóxica selectiva *in vitro* del Muricin H ya que este tuvo mayor efecto citotóxico para la línea H460 y menor para la línea 3T3 en relación con el fluorouracilo.

Cabe recalcar que los métodos utilizados en ambos estudios difieren al trabajo realizado en esta investigación, ya que en el presente estudio se desarrollaron procedimientos de viabilidad y proliferación celular representado sus resultados en porcentajes, los cuales determinaron que

existe un alto grado de efecto citotóxico del extracto etanólico de las hojas de *Annona Cherimola* frente a las líneas celulares de cáncer de colon RKO en medio de cultivo con pH neutro, por ende al comparar los resultados con las investigaciones encontradas se pueden apreciar resultados favorables, ya que en el caso del efecto citotóxico de las semillas de la planta de la *Annona Cherimola* si produjeron citotoxicidad en las distintas líneas celulares que fueron ensayadas, en cuanto al estudio analizado de las acetogeninas de la *Annona Muricata* también se encontraron resultados positivos ya que estas si poseen efectos citotóxicos frente a las líneas celulares de cáncer de pulmón.

Se debe mencionar que no se han encontrado estudios con técnicas similares al de nuestro trabajo ya que por ser un tema nuevo y de investigación experimental, no se han realizado aun estudios similares con los que podamos comparar nuestros resultados, sin embargo se lo ha comparado con el efecto citotóxico que producen las semillas de la misma planta y el efecto de las acetogeninas de la *Annona Muricata*, cuyos resultados son igualmente favorables en comparación con el presente trabajo investigativo.

8. CONCLUSIONES

Al término del presente trabajo investigativo y tras alcanzar los objetivos propuestos llegamos a las siguientes conclusiones:

- En cuanto a la proliferación celular se concluye que el extracto etanólico concentrado frente a las células RKO en medio de cultivo con pH neutro, causa efecto citotóxico en las células tumorales al no permitir su proliferación, en un 17% de confluencia a las 72 horas del ensayo.
- Se ha logrado concluir, que en los ensayos realizados de viabilidad celular se observó que hay mayor citotoxicidad en el transcurso del tiempo y a mayor concentración del extracto a las 72 horas, demostrando así el efecto del extracto etanólico ya que produjo un alto porcentaje de muerte celular en un 88,1% de muerte de las líneas celulares RKO.

9. RECOMENDACIONES

Al término del presente trabajo investigativo y tras alcanzar los objetivos propuestos se generan las siguientes recomendaciones:

- Se debe continuar realizando investigaciones posteriores donde se pueda estudiar las distintas partes de la planta de la Annona Cherimola como son el tallo, las semillas, raíz etc. para de esta manera conocer qué acción citotóxica presentan dichas partes.
- Es importante recomendar para futuras investigaciones que se logre obtener el principio activo de las hojas de Annona Cherimola para así obtener de mejor manera los compuestos que provocan muerte de células tumorales.
- Se recomienda en futuras investigaciones poder aplicar otros métodos más sensibles y específicos tales como las pruebas de ensayos colorimétricos de cuantificación espectrofotométrica, técnicas de biología molecular, inmunohistoquímica, etc. para la realización de los procedimientos de todas las técnicas utilizadas en el presente trabajo investigativo.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abad A. (2009). *Lo Que Hay Que Saber Sobre el Cáncer de Colón y el Recto*. Barcelona - España: Marge Medica Books.
- Adelina M., Rosa A., & Mercedes L. (2009). *Las acetogeninas de Annonaceae: efecto antiproliferativo en líneas celulares neoplásicas*. 2015, de Universidad de Santiago de Chile Chile Sitio web citado en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85611265004>
- Arias L. (2012). *El Cáncer de Estómago tiene más incidencia*. 2015, de edición impresa El Comercio Sitio web citado en: <http://edicionimpresa.elcomercio.com/es/0511310064875e6b-a607-486e-8ff0-344fc56c13f5>
- Asociación Española Contra el Cáncer (2015). *Anatomía Colon*. 2015, de Sobre el Cáncer Sitio web citado en: <https://www.aecc.es/SobreElCancer/CancerPorLocalizacion/cancerdecolon/Paginas/Cancerdecolon.aspx>
- Basilia C. (2009). *Determinación de la Concentración y Viabilidad Celular*. 2015, de Reportes de Química Sitio web citado en: <http://reportesparaestudiantesdequimica.blogspot.com/2009/10/determinacion-de-la-concentracion-y.html>
- Betés M. (2008). *Factores pronósticos del cáncer colorrectal*. 2015, de Scielo Sitio web citado en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S0212-71992008000700001&script=sci_arttext
- Brito L. (2012). *Aspectos Básicos Sobre el Manejo y Preservación de Cultivos Celulares*. 2015, de Instituto Nacional Rengel Departamento de Cultivo Celular Sitio web citado en: <http://www.paho.org/hq/dmdocuments/2010/L%20Brito%20INHRR.pdf>
- Bonilla F. (2009). *Nuevas Vías para el Tratamiento y Control del Cáncer de Colon*. 2015, de Asociación Española Contra el Cáncer (AECC) Sitio web citado en: https://www.aecc.es/Investigacion/Fundaci%C3%B3n%20Cient%C3%ADfica/quhacemos/Documents/Proyecto_colon/Dr_Felix_Bonilla.pdf
- Bullet B. (2012). *Viabilidad Celular*. 2015, de Analisis Quimico Sitio web citado en: <http://es.scribd.com/doc/93418777/9-VIABILIDAD-CELULAR#scribd>

- Castro J. (2007). *Cultivo de la Annona Cherimola*. 2015, de Ministerio de Agricultura y ganaderia Sitio web citado en: <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/a00109.pdf>
- Carper J. (1994). *Los Alimentos Medicina Milagrosa*. Bogota Colombia: Norma.
- Centro de Biotecnología. (2014). *Cultivo Celular*. 2015, de MediaWiki Sitio web citado en: http://es.wikipedia.org/wiki/Cultivo_celular
- Cea R. (2013). *Fitofarmacos*. 2015, de ministerio de Economía El Salvador Sitio web citado en: <http://www.dbbe.fcen.uba.ar/contenido/objetos/Cea2013.pdf>
- Dr. Acuña M. (2013). *Cáncer de Colon*. 2015, de *Oncología Guías Diagnósticas* Sitio web citado en: http://www.hgm.salud.gob.mx/descargas/pdf/area_medica/onco/guias/cancer_Colon.pdf
- Dr. Lupera H. (2013). *Ecuador: de cada 100 tipos de Cáncer registrados, tres se producen en niños y jóvenes*. 2015, de La Hora Sitio web citado en: <http://www.lahora.com.ec/index.php/noticias/show/1101515272#.VL0uadKG-E4>
- Diaz E., & Garcia R. (2006). *Avances en el Tratamiento Quimioterapico del Cáncer Colorrectal Metástasico: De la Nada a la esperanza*. España: Madrid.
- Fernández E., & García J. (2012). *Viabilidad Celular*. 2015, de Universidad de Granada Sitio web citado en: <http://histologia.ugr.es/index.php/docencia/postgrado/estructura/mod-met/c-viabilidad>
- Ferri F. (2006). *Ferri consultor Claves Diagnosticas y de Tratamiento*. Madrid España: Elsevier
- Garcia L., & Sancho M. (2005). *Cáncer Colorrectal Hereditario: De la genomica a la cirugia*. Madrid: Editorial.
- Instituto Vital. (2011). *La chirimoya, Propiedades, Beneficios, Cáncer*. 2015, de Vida OK Sitio web citado en: <http://vidaok.com/la-chirimoya-propiedades-beneficios-cancer/>
- Infoagro. (2011). *El cultivo del chirimoyo*. 2015, de Infoagro Sitio web citado en: http://www.infoagro.com/frutas/frutas_tropicales/chirimoyo.htm
- Jason M. (2012). *La Chirimoya Pelea contra el Cáncer*. 2015, de Salud Milenio Sitio web citado en: <http://saludmilenio.blogspot.com/p/la-chirimoya-pelea-contra-el-cancer.html>

- Lara P., Navarro D., & Saez M. (2010). *Proliferación Tumoral*. 2015, de BioCancer Centro de Ciencias de la Salud Universidad de Las Palmas de Gran Canaria Instituto Canario de Investigación del Cáncer (ICIC) Sitio web citado en: <http://www.biocancer.com/journal/236/proliferacion-tumoral>
- Lorenzo P., Moreno A., Leza J., Moro M., & Portales A. (2008). *Velázquez, Farmacología Básica y Clínica*. Madrid: Panamericana.
- Madrid. Unidad Editorial, Revistas. (2009). *Enfermedades: Cáncer de Colon*. 2015, de El mundo.es Sitio web citado en: <http://www.dmedicina.com/enfermedades/cancer/cancer-de-colon-1>
- Macarulla T., Elez E., & Capdevela J. (2008). *Cancer de Colón y Recto*. Editorial: Amat.
- Martin E. (2014). *La Batalla Contra el Cáncer*. Mexico: Palibrio.
- Moreu M. (2010). *Los beneficios de la Chirimoya*. 2015, de Pulevasalud Sitio web citado en: http://www.pulevasalud.com/ps/contenido.jsp?ID=56987&TIPO_CONTENIDO=Articulo&ID_CATEGORIA=104919
- Mogrovejo M. (2009). *Medicina Natural: La chirimoya*. 2015, de Medicina Natural Sitio web citado en: <http://mednatura.sagradafamilia.blogspot.com/2009/08/la-chirimoya.html>
- Murray M., Birdsall T., Joseph E., & Reilly P. (2010). *La Curación del Cáncer: Métodos Naturales*. Boston: Robin Book.
- Ortego J. Alcedo J. Cebrián C. & Palacios M. (2015). *Papel del Patólogo Frente al Carcinoma Colorrectal*. 2015, de Boletín Oncológico Sitio web citado en: <http://www.boloncol.com/boletin-14/papel-del-patologo-frente-al-carcinoma-colorrectal.html#diaghistop>
- Pietrasanta L., & Birderling C. (2011). *Tópicos en Biofísica Molecular*. 2015, de Departamento de Biofísica Molecular Sitio web citado en: http://users.df.uba.ar/catalina/TBM/TBM_lab04.pdf
- Quispe M., Callacondo D., Rojas J., Zavala D., Posso C., Abraham J., & Wolach V. (2009). *Efecto citotóxico de las semillas de Annona cherimola en cultivos de cáncer de cérvix, mama y leucemia mieloide crónica*. 2015, de Scielo Revista Peruana de Biología Sitio web citado en:

http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172009000300003

- Raiseb P. (2006). *La Chirimoya*. 2015, de Agronegocios Sitio web citado en: <http://www.agronegociosperu.org/tema/tem012.htm#.VNBFadKG-E5>
- Robbins M. (2010). *Patología Humana* Madrid - España: Elsevier
- Segretín M. (2010). *Los cultivos celulares y sus aplicaciones I (cultivos de células animales)*. 2015, de ArgenBio Sitio web citado en: <http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/Cultivos%20celulares%20%20Euge.pdf>
- Sociedad de Lucha contra el Cáncer, SOLCA – Loja (2014) Registro Hospitalario y de Tumores.
- Taberero J. (2007). *Cáncer Colorrectal*. España: Arán.
- UMSA. (2011). *Medicina Tradicional*. 2015, de Bolivia Bvs Sitio web citado en: <http://pueblosindigenas.bvsp.org.bo/php/level.php?la=es&component=50&item=3>
- Zhang X. (2015). *Medicina tradicional definiciones*. 2015, de OMS Sitio web citado en: http://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/

11. ANEXOS

Anexo N° 1

Nombre: RKO-E6 **Descripción:** Carcinoma de colon humano

Morfología: Epitelial

ECACC: ATCC: CRL-2578 **Nivel de bioseguridad:** 2

Medio de cultivo: Eagle's MEM + 10% Suero bovino fetal

Procedimiento de subcultivo: Dividir los cultivos confluentes (70-80%) desde 1:4 hasta 1:10, usando tripsina (0,25%)-EDTA (0,03%) para despegarlas de la monocapa. No agitar ni golpear el frasco mientras se están despegando. Se incuban a 37°C y 5% de CO₂. Cambiar el medio cada 2-3 días.

Cariotipo: **N° de pase:**

Producto celular:

Expresión antigénica:

Referencias: 51463: Smith ML, et al. Involvement of the p53 tumor suppressor in repair of u.v.-type DNA damage. *Oncogene* 10: 1053-1059, 1995. PubMed: 7700629
 51464: Smith ML, et al. Antisense GADD45 expression results in decreased DNA repair and sensitizes cells to u.v.-irradiation or cisplatin. *Oncogene* 13: 2255-2263, 1996. PubMed:8950993
 53331: Bhat MK, et al. Tumor suppressor p53 is a negative regulator in thyroid hormone receptor signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 272: 28989-28993, 1997. PubMed:9360971
 53390: Kesis TD, et al. Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3988-3992, 1993. PubMed: 8387205

Comentarios: La RKO-E6 es una línea celular generada desde la línea RKO de carcinoma de colon por transfección con pCMV-E6 usando Lipofectin. Las células contienen el oncogen E6 del HPV integrado de forma estable bajo el control de un promotor de citomegalovirus. El oncogen HPV E6 produce una disminución en los niveles y funciones del p53. La interrupción de la función normal del p53 en las células RKO de carcinoma de colon humano con esta oncoproteína da como resultado una disminución de la reparación del daño en el DNA inducido por U.V. Las RKO-E6 pueden emplearse junto con las RKO parentales en la investigación de los efectos de la disminución del p53 en la transcripción y apoptosis.

Anexo N° 2



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

Loja, 28 de mayo de 2015

Doctor.

Miguel Marín Gómez, Mg. Sc,

DIRECTOR DEL LABORATORIO DE CULTIVO CELULAR

A petición verbal de la interesada:

CERTIFICO:

Que la Sra. **Karen Priscila Lojan Medina**, estudiante del **VIII MÓDULO** de la Carrera de **LABORATORIO CLÍNICO**, con cédula de identidad 1105140840 fue aceptada para ser parte del grupo de estudiantes para que participe en la realización del proyecto "**Evaluar el efecto citotóxico de las hojas de Annona cherimola en líneas celulares cancerígenas**", el mismo que forma parte del trabajo final de investigación que debe realizar el estudiante previo a la obtención del título de Licenciada en Laboratorio Clínico.

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

Atentamente.

.....
Dr. Miguel Marín Gómez Mg, Sc.
DIRECTOR DEL PROYECTO

Anexo N° 3**PREPARACION DE MEDIO DE CULTIVO RPMI COMPLETO**

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

MEDIO DE CONGELACION

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

Anexo N° 4

TRIPSINIZACIÓN DE CÉLULAS (PASES O SUBCULTIVOS)

- Eliminar todo el contenido de medio de la botella
- Agregar 5 ml de medio de cultivo incompleto, dejar unos minutos y sacar completamente
- Agregar 2 ml de tripsina al 0,25%, especial para el cultivo, con esto las células comienzan a desprenderse.
- Mantener moviendo dando golpes suaves a la botella, si no se sueltan las células se pueden incubar unos minutos a 37°C
- 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.

Anexo N° 5**CRIOCONGELACIÓN**

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

Anexo N° 6

DESCONGELACIÓN CELULAR

- Encender cabina de bioseguridad y esterilizar 15 minutos antes de usar, de igual manera el abañero a 37°C
- Tener listo el medio de cultivo RPMI completo e incompleto, el tubo falcón
- Extraer del tanque de nitrógeno líquido el criovial que deseemos con la cantidad conocida de cel/ml.
- Incubar durante 1 minuto el criovial a 37°C hasta q esté descongelado. Evitar que las células permanezcan demasiado tiempo descongeladas.
- Añadir las células descongeladas rápidamente a un tubo Falcón y añadir 10 ml de medio de cultivo completo para así diluir el DMSO y disminuir su toxicidad.
- Centrifugar el Falcón a 800 rpm durante 3 minutos para obtener el pellet de células en el fondo.
- Eliminar el sobrenadante con una pipeta Pasteur y dejar el pellet de células.
- Resuspender el pellet de células en 4 ml de medio cultivo completo en el caso de crioviales con 1.5×10^6 cel/ml y pipetear suavemente para homogenizar la suspensión.
- Pasar el contenido del tubo a una botella de cultivo el cual ya contiene 8ml de medio de cultivo completo y mezclar suavemente.
- Incubar a 37°C al 5% de CO_2 .
- Cambiar el medio de cultivo al día siguiente para eliminar posibles restos de DMSO y células muertas.

Anexo N° 7**PROTOCOLO DE VIABILIDAD CELULAR**

- Aplicado para ensayos de citotoxicidad y proliferación. Es un colorante vital que no se absorbe por células viables sanas. Cuando las células son dañadas o están muertas, el azul de tripán puede entrar a la célula, permitiendo a la célula muerta ser contada.

ENSAYO DEL AZUL TRIPÁN**PROCEDIMIENTO:**

- | | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none">➤ Mezclar 20 μL de suspensión celular con 20 μL de azul tripán.➤ Mezcle la suspensión celular con azul tripán por pipeteo de 5 a 8 veces.➤ Coloque 20 μL de la mezcla en cada cámara del hemocitómetro.➤ Coloque el hemocitómetro en el microscopio y localice las cuadrículas. | <ul style="list-style-type: none">➤ Deje que las células se asienten durante 1-2 minutos y proceda al conteo.➤ Cuente por separado a las células azules (muertas) y a las células refringentes o blancas (vivas) que sean observadas en cada uno de los cuadros por considerar.➤ Calcular el porcentaje de viabilidad. |
|---|--|

Anexo N° 8**PREPARACION DE MEDIO DE CULTIVO RPMI COMPLETO PARA
pH NEUTRO**

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

Anexo N° 9

TECNICA DE FICOLL HYPAQUE

Técnica de centrifugación por gradiente de densidad para separar Células Mononucleares de Sangre Periférica (CMSP) de otras células de la sangre.

- Extraer 5ml de sangre venosa en un tubo tapa verde que contiene heparina.
- Se coloca en un tubo Falcón 4 ml de PBS o solución salina, a este tubo se le adiciona 4 ml de sangre heparinizada.
- 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
- Centrifugar a 2000 rpm durante 15 minutos.
- 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.
- Una vez colocados los linfocitos en otro tubo falcón, agregarle 1 ml de PBS y centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos.
- Eliminar el sobrenadante y Resuspender con 2 ml de medio de cultivo RPMI completo.

Realizar el conteo de las células con 20 ul de las mismas y 20 ul de azul de tripano.

Anexo N° 10**PARA COLOCAR LAS CELULAS EN CADA POCILLO (CALCULOS)****LINEAS CELULARES (en el caso de extracto etanólico)**

- Una vez realizado el conteo de las líneas celulares ambas resuspendidas en 2 ml de medio de cultivo se debe distribuir la cantidad de células q irá en cada pocillo, en este caso fueron 500.000 cel/pocillo en 500 ul de medio de cultivo.
- En este caso se necesitaron 12 000 000 de células resuspendidas en 12 ml de medio de cultivo.
- Se colocan los 500 ul del medio con 500.000 células en cada una y luego se añaden 25 ul de los extractos y los medicamentos como controles positivos en diferentes concentraciones por triplicado.
- Se procede a incubar las placas de cultivo en la incubadora de CO₂ al 5% y con humedad del 98%.

Anexo N° 11

PREPARACION DE EXTRACTO EN DIFERENTES CONCENTRACIONES

EXTRACTO ETANÓLICO

- **Solución concentrada (Extracto 1):** Pesar 1 mg de extracto y disolver en 1 ml de DMSO al 10% (100 ul de DMSO + 900 ul de medio de cultivo completo). En este caso se disuelve los 100 ul de DMSO con 1 mg del extracto y a esta dilución se le añade los 900 ul de medio de cultivo.
- **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 N° 12

PREPARACION DE CONTROLES POSITIVOS

FLUOROURACILO

- **Solución concentrada 1:** Se colocan directamente los 25 ul de fluorouracilo ya preparado en concentración de 50 mg/50 ml
- **Solución 2:** Mezclar 100 ul de la solución concentrada con 900 ul de medio de cultivo completo.
- **Solución 3:** Mezclar 20 ul de la solución concentrada con 980 ul de medio de cultivo completo.

Anexo N° 13**CONTEO DE CELULAS CON AZUL DE TRIPANO (VIABILIDAD CELULAR)**

- Se realiza el contaje de las células tanto muertas como vivas para evaluar así de esta manera la viabilidad y citotoxicidad celular.
- 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.
- 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
- A cada pocillo cargado con células colocar 20 ul de azul de tripano y cargar en la cámara de Neubauer para su contaje.
- Se deben contar los cuatro cuadrantes externos de las esquinas y el valor final se lo multiplica por 10, por 1000 y por 2.
- Se realiza el mismo procedimiento a las seis horas de su incubación, 12, 24, 48, 60 y 72 horas.

Anexo N° 14

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

CÁLCULOS

**CONFLUENCIA = NÚMERO DE CÉLULAS ELONGADAS x 100
DIVIDIDO PARA EL TOTAL DE CÉLULAS VIVAS**

Anexo N° 15**CÁLCULOS VIABILIDAD CELULAR****CÁLCULOS**

**SE CUENTAN LOS CUATRO CUADRANTES EXTERNOS DE LAS
ESQUINAS DE LA CÁMARA DE NEUBAUER.**

EL VALOR FINAL SE LO MULTIPLICA $\times 10 \times 1000 \times 2$

FOTORELATORIA
FASE PREANALITICA
Anexo N° 16

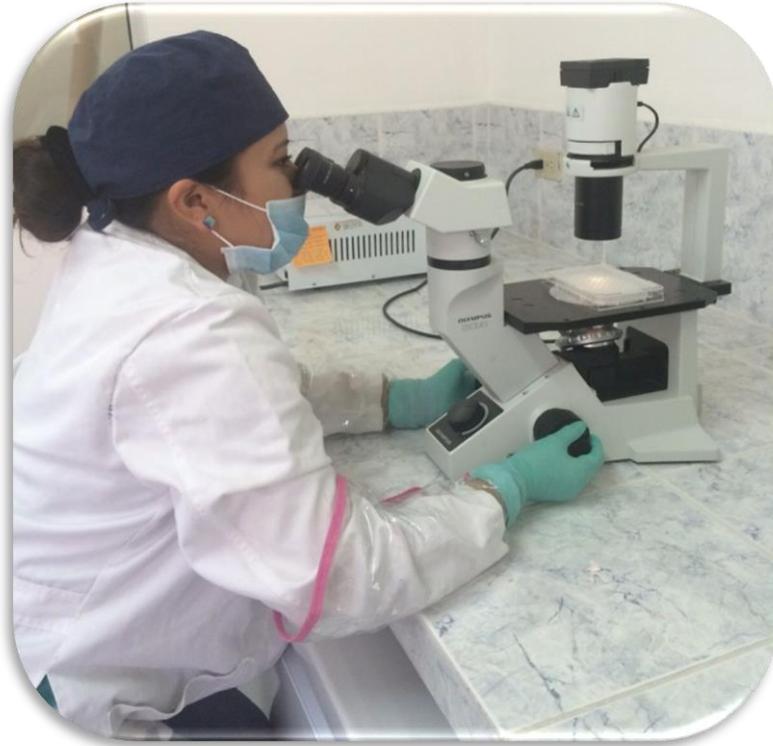


Fig. 1 Ensayos previos a la obtención de protocolos para la fase analítica



Fig. 2 Placas de 96 pocillos para los ensayos



Fig. 3 Conservación de células en incubadora de CO2 al 5% con humedad del 98%

FASE ANALITICA**Anexo N° 17**

Fig. 1 Aplicación del extracto en las células RKO en cámara de bioseguridad



Fig. 2 Colocación de las células en los pocillos



Fig. 3 Conteo de células con azul de tripán en la cámara de Neubauer

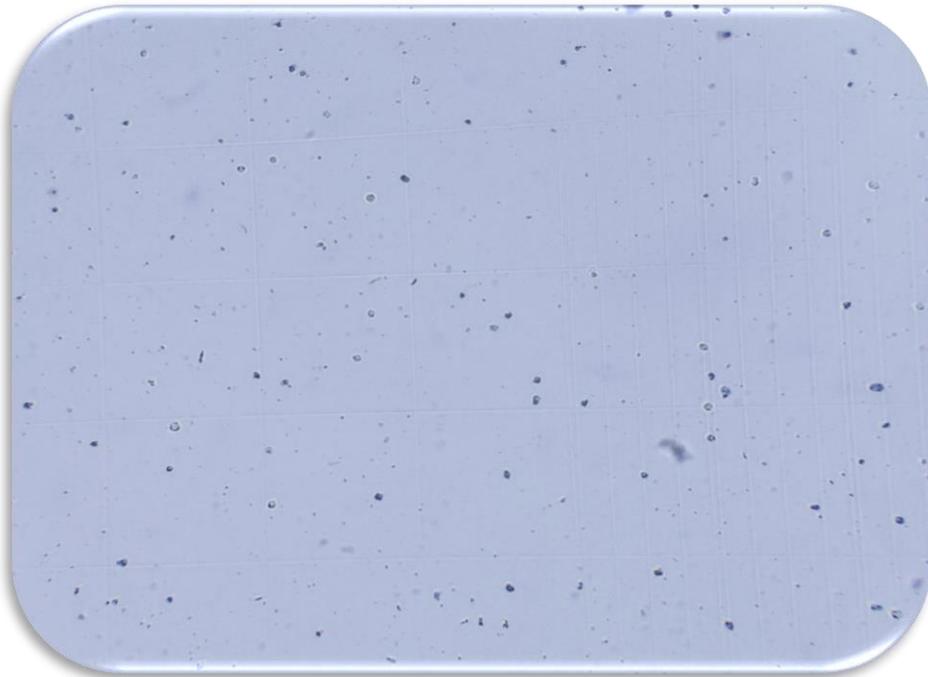
FASE POSTANALÍTICA**Anexo N° 18**

Fig. 1 Células en cámara de Neubauer, las que se encuentran teñidas de azul están muertas y las incoloras o celestes están vivas



Fig. 2 Observación de la confluencia de células tumorales RKO

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CONTENIDO	PÁGINAS
CARATULA.....	i
CERTIFICACIÓN.....	ii
AUTORÍA.....	iii
CARTA DE AUTORIZACIÓN.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
DEDICATORIA.....	vi
1. TITULO.....	1
2. RESUMEN.....	2
SUMMARY.....	3
3. INTRODUCCIÓN.....	4
4. REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
4.1 Cáncer de Colon o Colorrectal (CCR).....	6
4.1.1 Cáncer de Colon o Colorrectal (CCR).....	6
4.1.2 Diseminación linfática.....	6
4.1.3 Diseminación hematológica.....	6
4.2 Factores de Riesgo.....	6
4.3 Medicina Tradicional.....	7
4.4 Fitofármacos.....	7
4.5 Metabolitos a Nivel Vegetal.....	8
4.6 Principios Activos.....	8
4.7 Annona Cherimola.....	8
4.8 Origen.....	9
4.9 Taxonomía y Morfología.....	9
4.10 Propiedades y Beneficios.....	9
4.11 Las Acetogeninas de Annonaceae.....	11
4.12 Líneas Celulares.....	11
4.13 Líneas Celulares Comunes.....	12
4.13.1 Líneas celulares humanas.....	12
4.13.2 RKO (línea celular de cáncer de colon).....	13

4.14	Cultivos Celulares.....	13
4.14.1	Cultivos primarios.....	13
4.14.2	Cultivos secundarios.....	13
4.14.3	Cultivos continuos o líneas celulares.....	14
4.15	Medios de Cultivo.....	15
4.15.1	Suero Bovino Fetal (SFB).....	15
4.15.2	Medio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute).....	16
4.15.3	Recipientes para el cultivo de células.....	17
4.16	Fluorouracilo.....	18
4.16.1	Mecanismo de acción.....	18
4.16.2	Farmacocinética.....	19
4.17	American Type Culture Collection (ATCC).....	20
4.18	Obtención de Extractos.....	21
4.18.1	Extracto Etanólico.....	21
4.19	Técnicas.....	21
4.19.1	Medición de la Proliferación Celular.....	21
4.19.2	Viabilidad Celular.....	22
4.19.3	Azul de Tripán.....	22
4.19.4	Penicilina/estreptomicina (antibióticos y antifúngicos).....	23
4.19.5	Tripsinización, pase de células, cambios de medio, mantenimiento.....	23
4.19.6	Medios de congelación.....	24
4.19.7	Congelación y Descongelación.....	24
4.19.8	Técnica de Ficoll Hypaque.....	25
4.19.9	Recuento de células: cámara de Neubauer.....	25
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
6.	RESULTADOS.....	29
7.	DISCUSIÓN.....	35
8.	CONCLUSIONES.....	38
9.	RECOMENDACIONES.....	39
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	40
11.	ANEXOS.....	44
	ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	62