



1859

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**  
**ÁREA DE LA SALUD HUMANA**  
**LABORATORIO CLÍNICO**

**TÍTULO:**

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

TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN  
DEL TÍTULO DE LICENCIADO EN  
LABORATORIO CLÍNICO.

**AUTOR:**

**Kleber Gabriel Garrochamba Peñafiel**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**Lic. Angel Heriberto Iñiguez Gordillo**

**LOJA – ECUADOR**  
**2015**

## CERTIFICACIÓN

**Lic. Angel Heriberto Iñiguez Gordillo**

**DIRECTOR DE TESIS**

### **CERTIFICA:**

Que el presente trabajo denominado; **EFFECTO CITOTÓXICO DEL EXTRACTO ACUOSO DE LAS HOJAS DE *Annona cherimola* EN UNA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE PULMÓN HUMANO EN UN MEDIO DE CULTIVO CON pH NEUTRO**, de autoria del Sr. Kleber Gabriel Garrochamba Peñafiel ha sido desarrollado, corregido, y orientado bajo mi dirección, el mismo que ha cumplido con los requisitos académicos y reglamentarios correspondientes para su aprobación, por lo tanto faculto a la autoría realice los trámites correspondientes para su presentación, disertación, y defensa.

**ATENTAMENTE**



**Lic. Angel Heriberto Iñiguez Gordillo**

**DIRECTOR DE TESIS**

## **AUTORÍA**

Yo, Kleber Gabriel Garrochamba Peñafiel, estudiante de la Carrera de Laboratorio Clínico del Área de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja, libre y voluntariamente declaro ser autor del trabajo de tesis denominado: EFECTO CITOTÓXICO DEL EXTRACTO ACUOSO DE LAS HOJAS DE *Annona cherimola* EN UNA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE PULMÓN HUMANO EN UN MEDIO DE CULTIVO CON pH NEUTRO, y éximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y sus representantes jurídicos de posibles reclamos o acciones legales por el contenido de la misma. Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi tesis en el Repositorio Institucional de la Biblioteca Virtual.

Loja, 04 de Diciembre de 2015

Kleber Gabriel Garrochamba Peñafiel

C.I: 1104899693

**AUTOR**

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

Yo Kleber Gabriel Garrochamba Peñafiel, con cédula 1104899693, declaro ser autor de la Tesis titulada **EFECTO CITOTÓXICO DEL EXTRACTO ACUOSO DE LAS HOJAS DE *Annona cherimola* EN UNA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE PULMÓN HUMANO EN UN MEDIO DE CULTIVO CON pH NEUTRO**, como requisito para optar el grado de Licenciado en Laboratorio Clínico, autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos, muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional.

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

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

Para la constancia en la ciudad de Loja, a los cuatro días del mes de Diciembre de Dos mil quince.

**Autor:** Kleber Gabriel Garrochamba Peñafiel

**Firma:**

**Cédula:** 1104899693

**Dirección:** Loja

**Correo:** kleverg91@yahoo.es

**Celular:** 0990651728

**Datos complementarios:**

Director de tesis: Lic. Angel Iñiguez

**Tribunal de Grado:**

Lic. María del Cisne Loján Mg. Sc

Lic. Glenda Rodríguez Mg. Sc

Dra. Diana Montaña

## **AGRADECIMIENTO**

Al finalizar con éxito los estudios universitarios, quiero dejar constancia de un profundo agradecimiento a la Universidad Nacional de Loja, Área de la Salud Humana, Carrera de Laboratorio Clínico, entidades inagotables del conocimiento, forjadores de futuros profesionales donde se realiza nuestros anhelos.

Un gradecimiento fraterno a mi director Lic. Angel Iñiguez, por la atención, información, y orientación brindada en la realización de mi trabajo aquí expuesto.

Al Dr. Miguel Marín Director del Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja, por haberme permitido formar parte del Proyecto investigativo, orientado en el desarrollo, y permitirme desenvolver y adquirir nuevas experiencias.

A todos ellos, !Gracias por haber permitido la elaboración de ésta investigación.

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo investigativo va dedicado a Dios; Ser celestial y creador, quién ante los obstáculos de la vida, me ha brindado valor y fortaleza para salir adelante.

A mi padres; por su amor y apoyo incondicional, en la realización de mis estudios.

A mí inmortal recuerdo de amor; mi tía, que desde la eternidad cuidará de mí por siempre.

A mis tíos, hermanos, y primos, por su apoyo en todo momento, al ser ejemplo de superación y éxito.

A mis compañeros y amigos con quienes compartí inolvidables experiencias en la vida estudiantil.

A todos ellos; !Gracias por formar parte de mi vida académica y personal.

## **1. TÍTULO**

**EFEECTO CITOTÓXICO DEL EXTRACTO ACUOSO DE LAS HOJAS DE *Annona cherimola* EN UNA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE PULMÓN HUMANO EN UN MEDIO DE CULTIVO CON pH NEUTRO.**

## 2. RESUMEN

Los pulmones son a menudo afectados por patologías como el cáncer de pulmón, situación en que las células cambian sus características y se transforman en malignas como consecuencia de la inhalación del humo del tabaco, responsable al menos del 80% (American Cancer Society, 2014). La presente investigación tiene como objetivo: verificar la actividad citotóxica del extracto acuoso con pH neutro de hojas de *Annona cherimola* frente a líneas de cáncer de pulmón en la Provincia de Loja. El Estudio aplicó un modelo de tipo Experimental-prospectivo realizado en el centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja, empleando métodos y técnicas para determinar Viabilidad y Proliferación celular, la primera mediante conteo de células viables y muertas, en cámara de Neubauer y colorante azul de tripano, y la segunda a través del conteo de células viables posterior a incubación de medios a diferentes horas. Mediante los ensayos realizados entre el extracto acuoso, y cisplatino, se determinó un mayor efecto citotóxico a nivel del cisplatino frente a la línea celular de cáncer de pulmón (A549) equivalente al 84,1 %. Así también la mayor proliferación o confluencia celular fue dada por el medio de cultivo más la línea celular A549 equivalente al 78,3 %, en relación a la del extracto acuoso equivalente al 74 % a las 36 horas de incubación.

***Palabras clave:*** acetogenina, citotoxicidad, cisplatino



## SUMMARY

The lungs are often affected by diseases such as lung cancer, a situation in which cells change their characteristics and transform into malignant due to the inhalation of smoke snuff, head at least 80% (American Cancer Society, 2014) . This research aims to: verify the cytotoxic activity of neutral pH aqueous extract of leaves of *Annona cherimola* front lines of lung cancer in the Province of Loja. The study applied a prospective model of Experimental-kind in the center of Biotechnology of the National University of Loja, employing methods and techniques for determining cell viability and proliferation, the first by counting viable and dead cells in Neubauer chamber and coloring trypan blue, and the second through the viable cell count subsequent to incubation media at different times. By tests made between the aqueous extract and cisplatin increased level of cytotoxic effect against cisplatin equivalent to 84.1% cell lung cancer line (A549) it was determined. Well as proliferation or cell confluence was given by the culture medium over the A549 cell line equivalent to 78.3% relative to the aqueous extract equal to 74% at 36 hours of incubation.

**Keywords:** *acetogenina, cytotoxicity, cisplatin*

### 3. INTRODUCCIÓN

Los pulmones están constituidos por diferentes tipos de células que se van dividiendo de forma organizada, no obstante ésta permanente división celular puede ser alterada y permitir un crecimiento anormal y descontrolado de las células conocido como tumores. El cáncer de pulmón constituye una enfermedad mortal, que infortunadamente se diagnostica en estadios avanzados, debido a la ausencia de sintomatología específica en etapas tempranas. Para el desarrollo de cáncer pulmonar existen varios factores de riesgo dentro de los cuales se destaca, el humo del tabaco como principal causa en un 80%, los fumadores pasivos también están propensos en un 10%, existe también un determinante genético por los antecedentes familiares implícitos, la exposición a sustancias como el asbesto, radón, níquel, uranio, petróleo y sus derivados aumenta también la probabilidad de desarrollar este tipo de cáncer, la contaminación ambiental principalmente en el ámbito urbano también sugiere una importante causa, en cuanto al sexo la incidencia es tres veces mayor en hombres que en mujeres, sin embargo recientes estudios han evidenciado un aumento considerable en mujeres resultado de la incorporación tardía de la mujer al tabaquismo National Cancer Institute. (2010).

Dentro del cáncer pulmonar se consideran dos tipos de carcinomas que hace referencia al aspecto de sus células, con comportamiento, tratamiento y pronóstico totalmente diferentes, éstos son el cáncer de células no pequeñas (CPCNP) que representa el 85%, y el cáncer de células pequeñas o microcítico (CPCP) que representa el 15% siendo éste el más agresivo (Sociedad Americana del Cáncer, 2014). Por otra parte el cáncer pulmonar se constituye la principal causa de muerte en el mundo, anualmente se diagnóstican 2 millones de casos nuevos, y 1.1 millones de defunciones alrededor del mundo (Paz, J. 2010). En nuestro país para el año 2013 el número de personas con cáncer de pulmón fue de 468 casos, representando una tasa de 5.99 por cada 100 000 habitantes, así también esta patología es la cuarta causa de mortalidad en hombres, registrándose 396 muertes equivalentes al 10% por cáncer (Cueva, P. 2013).

A nivel local los casos de cáncer de pulmón registrados durante el año 2013-2014 fueron de 11, de lo cual 6 pertenecían al sexo femenino y 5 al masculino (SOLCA, Loja. 2014).

También se ha dado a conocer que *Annona cherimola*, posee diversos efectos debido a sus compuestos naturales de interés biológico tales como alcaloides, y en especial las acetogeninas: cisannonacin y (2,4)-cis transisoannonacinas, han mostrado un efecto citotóxico frente a las líneas cancerígenas humanas A549 (carcinoma de pulmón) (Quispe, A. 2009).

El presente estudio tuvo como iniciativa verificar el efecto citotóxico del extracto acuoso con pH neutro de las hojas de *Annona cherimola* frente a líneas de cáncer de pulmón. En ésta investigación de tipo Experimental-prospectiva se efectuó técnicas y procedimientos referentes a proliferación y viabilidad celular, para la proliferación celular se realizó la adición de las células de cáncer de pulmón A549 a un medio de cultivo celular Roswell Park Memorial Institute (RPMI), que cuenta con los nutrientes necesarios. En el caso de la viabilidad celular se utilizó el método cuantitativo basado en el uso del azul de tripano y contaje posterior en cámara de Neubauer. Así también los datos obtenidos fueron resultado del programa estadístico Statistical Analysis System (SAS). Acorde a los ensayos realizados se determinó la viabilidad celular en concentrados de extracto acuoso de hojas de *Annona cherimola* en medio de cultivo RPMI a pH neutro, el cisplatino posee mayor efecto citotóxico de 84,1 % frente a la línea celular A549, en relación al del extracto acuoso de 58,7 %, y linfocitos humanos frente al extracto acuoso de 32,5 %, utilizados para determinar si existe citotoxicidad a nivel de células normales. En cuanto refiere a la mayor proliferación o confluencia celular determinada fue la del medio de cultivo más la línea celular A549 equivalente al 78.3 %, en relación a la del cisplatino equivalente al 76,9 %, y extracto acuoso equivalente al 74 %, a las 36 horas de incubación.

## **4. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **4.1 Los Pulmones**

Los pulmones son dos órganos de consistencia esponjosa, formados por un tejido de coloración rosada y gris, siendo partes esenciales del sistema respiratorio. Los pulmones se encuentran ocupando la mayor parte de la cavidad torácica, y a su vez separados por el mediastino (Roncali, E. 2010).

### **4.2 Cáncer**

El término cáncer comprende un grupo de más de cien enfermedades diferentes. El cáncer ocurre cuando las células de cualquier tejido empiezan a dividirse de manera errónea, siendo un proceso que se da sin control u orden (Roncali, E. 2010).

#### **4.2.1 Cáncer de Pulmón**

Los pulmones están formados por muchos tipos de células que en condiciones normales, se dividen para producir más células, únicamente cuando el cuerpo las necesita. Sin embargo cuando estas células se dividen cuando no son necesarias, se forma una masa de tejido innecesario llamado crecimiento o tumor, que puede ser benigno y removidos mediante cirugía, ó maligno conocido como cáncer que invade tejidos, órganos, penetrar al torrente sanguíneo y linfa generando metástasis).En el caso del cáncer de pulmón, con frecuencia se disemina a los nódulos linfáticos u otros tejidos del tórax incluyendo el otro pulmón. En algunas ocasiones el cáncer hace metástasis en órganos como los huesos, cerebro, hígado (Roncali, E. 2010).

#### **4.2.2 Factores de Riesgo**

El factor principal es el tabaco que al poseer numerosos elementos carcinógenos o sustancias nocivas que dañan las células convirtiéndolas en cancerosas. La exposición a otros elementos carcinógenos reconocidos en el trabajo como el asbesto permite el desarrollo de cáncer de pulmón. Así también estos trabajadores al laborar en minas subterráneas, están expuestos a altos niveles de gas radioactivo radón, con un mayor riesgo a desarrollar cáncer pulmonar (Roncali, E. 2010).

### **4.2.3 Tipos de Cáncer de Pulmón**

El tipo de cáncer de pulmón depende de la clase de células que conformen el tumor, existen procedimientos para la obtención de una muestra de tejido o líquido del tumor que permiten confirmar el diagnóstico. Se divide en dos tipos:

#### **4.2.3.1 Cáncer de pulmón de células no pequeñas**

Es el más común, y conforma alrededor del 85 % al 90 %, las células difieren en tamaño, forma, y composición química cuando son observadas al microscopio. Existen 3 subtipos principales de este cáncer.

#### **4.2.3.2 Carcinoma de células escamosas**

Aproximadamente un 25 % a 30 % de todos los cánceres son de células escamosas, las cuales son células planas que cubren el interior de las vías respiratorias, la afectación de éste tipo de células está asociada al antecedente de fumar. Empieza a desarrollarse en los bronquios, es común en hombres, y por lo general no se disemina tan rápido.

#### **4.2.3.3 Adenocarcinoma**

Alrededor del 40 % de los cánceres de pulmón son adenocarcinomas, por lo general éste tipo de cáncer se origina en las células que segregan sustancias, como moco. Ha sido más común en mujeres y personas que no fuman, éste tipo de cáncer se encuentra en las partes externas del pulmón. Además es probable encontrarlo antes que se propague.

#### **4.2.3.4 Carcinoma de células grandes**

Representa aproximadamente del 10 % al 15 % de los cánceres de pulmón, éste tipo de cáncer puede aparecer en cualquier parte de pulmón, crecer, y propagarse rápidamente, lo cual hace difícil su tratamiento.

#### **4.2.3.5 Cáncer de pulmón de células pequeñas**

Aproximadamente del 10 % al 15 % comprende el cáncer de pulmón de células pequeñas, denominado así por el tamaño de las células cancerosas y por mostrar la

aparición de células de avena al microscopio, por lo general crece rápidamente, y afecta a órganos próximos (American Cancer Society, 2014).

#### **4.3 Planta Medicinal**

Cualquier vegetal que contenga, en sus órganos, alguna sustancia con actividad farmacológica, que se pueda utilizar con fines terapéuticos, o que se pueda emplear para obtener fármacos por síntesis farmacéutica (Cuklinski, C. 2010).

#### **4.4 Droga**

Material de origen natural obtenido de: hojas, corteza, semillas, y que mediante sencillas operaciones (ejemplo: extractos) que contienen los principios activos con actividad farmacológica para su uso directo o para la elaboración de medicamentos (Cuklinski, C. 2010).

#### **4.5 Principio activo**

Sustancia química a quien se le atribuye la actividad farmacológica y el uso terapéutico de una droga, la cual contiene varios principios activos ya sean antagónicos o sinérgicos (Cuklinski, C. 2010).

#### **4.6 Medicamento**

Toda sustancia medicinal natural o sintética, en la que sus combinaciones presenta propiedades para prevenir, diagnosticar, tratar, aliviar y curar enfermedades, modificando así alguna función del organismo (Cuklinski, C. 2010).

#### **4.7 Cisplatino**

Cisplatino es un agente antitumoral que contiene platino, activo en un amplio rango de tumores malignos humanos, generalmente se cree que interviene en la inhibición de la fase S ó síntesis de cromosomas ubicada entre la fase G1 Y G2, la fase S por lo general requiere de 10-12 horas ocupando la mitad del tiempo de ciclo celular, es así que el cisplatino inhibe la replicación excesiva de las células cancerosas (Flórez, J. 2010). El cisplatino también está involucrado en propiedades inmunosupresoras, radiosensibilizantes y antimicrobianas. Además está indicado en pacientes que ya no

responden a tratamiento local, como cirugía, y radioterapia, especialmente carcinoma de testículo, ovario, vejiga, próstata, y bronquio-pulmonar (NSCLC, SCLC) (Vardaro, A. 2011).

#### **4.8 Anonáceas**

Las Anonáceas constituyen una familia casi exclusivamente tropical, son primitivas y es notable su número de especies frutales y aceites esenciales. Ésta familia cuenta con 130 géneros y se estima que hay cerca de 2.300 especies en el mundo, dentro de la familia Anonácea se destacan especies importantes dentro de los cuales se menciona: *Annona cherimola*, *Annona muricata*, *Annona squamosa*, *Annona reticulata*, y *Annona diversifolia* (León, J. 2010).

##### **4.8.1 *Annona cherimola***

Su origen probablemente es la vertiente oriental de los Andes, 600-1800m de altitud, por lo general es un árbol pequeño que llega hasta 8m de altura. De las ramillas cilíndricas y grisáceas brotan hojas alternas, ovaladas, elípticas, suaves y de 10 a 20 cm de largo por 4-8cm de ancho, oscuras en su lado superior y con pubescencia fina en la parte inferior. Las hojas se renuevan una vez al año. En hojas, tallos, corteza, y semillas se han detectado compuestos citotóxicos (acetogeninas), terpenos, y alcaloides con uso farmacéutico y antimicrobial, además de su valiosa propiedad insecticida, y antiparasitaria (León, J. 2010).

##### **4.8.2 Aplicación Médica**

La *Annona cherimola* es una fuente de vitaminas B1, B2, B3, Hierro, Calcio, y Fósforo, el calentamiento de su pulpa produce oxidación enzimática. Las semillas, hojas, son trituradas para usarse como bioinsecticidas y las acetogeninas presentes en éste vegetal poseen algunas propiedades farmacológicas (Wouter, V. 2010).

##### **4.8.3 Acetogeninas**

Las Acetogeninas son un grupo de metabolitos secundarios bioactivos de interés, por su comprobada actividad biológica presentada en las Annonaceae. Se caracterizan por presentar un grupo  $\gamma$ -lactónico,  $\alpha$ -B insaturado o saturado y uno, dos, o tres anillos

tetrahidrofuránicos sobre una larga cadena alquílica, son compuestos con 35 o 37 carbonos de origen policétido con una cadena alifática que puede ser: hidroxilada, cetonizada, ó acetoxilada. Las acetogeninas poseen actividad biológica por considerarse como uno de los grupos de inhibidores más potentes del complejo I (NADH: ubiquinona oxidoreductasa) mitocondrial, y la (NADH oxidasa) de las membranas plasmáticas (Guzman, S. 2009).

#### **4.8.4 Alcaloides**

La palabra alcaloide deriva del vocablo alkali y eidos cuyo significado es semejante a un álcali, se trata de compuestos nitrogenados, además de estar constituidos por carbono, hidrógeno, oxígeno, y raramente azufre. Los alcaloides se encuentran distribuidos en las angiospermas dentro de la cual se encuentran las Annonaceae. Por lo general los alcaloides suelen presentar una gran variedad de actividades farmacológicas intensas a bajas dosis (Cuklinski, C. 2010 ).

#### **4.8.5 Citotoxicidad celular**

La definición de citotoxicidad suele variar dependiendo de la naturaleza del estudio, si las células mueren o simplemente tienen su metabolismo alterado. La toxicidad en tejidos y células puede producir la alteración de funciones básicas de la célula por efectos tóxicos de drogas y compuestos químicos. Determinadas plantas angiospermas como la *Annona cherimola* presentan sustancias con actividad biológica, las acetogeninas con actividad antitumoral in vitro citotóxica, esto es explicado por la inhibición del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial de las células cancerígenas. (Quispe, D., Zavala, D. 2007).

#### **4.9 Extracto**

Se constituye una mezcla compleja de compuestos químicos, obtenido mediante procesos físicos, químicos, y microbiológicos a partir de una fuente natural. a partir de un determinado vegetal se pueden obtener diferentes extractos con principios activos diversos (Caldas, A. 2012).



#### **4.9.1 Extracto Acuoso**

Preparación en agua de la sustancia de una determinada planta que contiene la fracción biológica sin el residuo celular, la droga se extrae con agua caliente, pero sin someterla a ebullición o con agua fría. El agua por lo general es un buen solvente de muchos principios activos de las drogas (ONSALUS, 2015).

#### **Procedimiento:**

- Pesar 10 gramos de hojas de cherimola.
- Hervir en 400 ml agua corriente o destilada por 15 minutos
- Centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos
- Dejar unos segundos tapar y apagar la llama
- Enfríar, filtrar y envasar en un frasco ámbar (ONSALUS, 2015).

#### **4.10 pH**

El pH es el acrónimo para potencial de hidrógeno, se lo define como el logaritmo negativo de la actividad de iones hidrógeno, y la concentración de protones. Es la forma más común de expresar la acidez y alcalinidad de una sustancia (Velázquez, M., Ordorica, M. 2009).

##### **4.10.1 pH Neutro**

Determinada sustancia, medio, o solución, en que acorde a la escala del pH que va de 0-14, la cifra 7 indica el equilibrio entre ácidos y bases o pH neutro (Vasey, C. 2010).

#### **4.11 Cultivo celular**

El cultivo celular es el conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de células in vitro, preservando al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Las células son capaces de dividirse, incrementar su tamaño y en condiciones adecuadas pueden replicarse hasta ser limitadas por algunas variables de cultivo como el consumo total de nutrientes o limitación del espacio físico (Castaño, E. 2012).

#### **4.11.1 Incubación de medio de cultivo de línea celular**

Los medios de cultivos celulares se incuban en cámaras de crecimiento eficientes en control ambiental por lo general una temperatura de (20-28 °C%), y humedad relativa (70-80 %). Así también estos cultivos celulares requieren de un determinado tiempo para crecer, duplicar sus proteínas, organelos, y cromosomas. Por ejemplo los cultivos celulares que se encuentran en crecimiento, la interfase celular puede requerir de hasta 23 horas para el ciclo celular, quedando una hora para la fase M, en el caso de las fases intermedias G1 Y G2 existen retrasos de tiempo para el crecimiento celular. (Acevedo, J. 2013). Por lo general los cultivos celulares doblan en un lapso de 24-48 horas dependiendo de las condiciones de crecimiento adecuadas, de esta manera el número de células se multiplica en pocos días ocupando toda la superficie del medio de cultivo, dando como resultado el empobrecimiento de nutrientes del medio y generando productos de desecho. Los cultivos celulares paran de dividirse cuando entran en contacto entre ellas, es decir producen confluencia celular, y para permitir su crecimiento de forma continua éstas células necesitan el pase a un nuevo medio de cultivo celular (Gómez, Milagros. 2009).

#### **4.11.2 Tipos de cultivo celular**

##### **4.11.3 Cultivo Primario**

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

##### **4.11.3.1 Líneas celulares**

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

##### **4.11.3.2 Líneas celulares diploides**

Se originan de un tejido normal y continúan normales a medida que se cultivan.

#### **4.11.3.3 Heteroploides o continuas**

Se originan de un tejido normal o anormal, pero se considera que estas células han sufrido una transformación que le confiere características de crecimiento diferentes (Castaño, E.2012)

#### **4.12 Células Linfoides**

Las células linfoides son células que participan en la inducción, expresión y regulación de las respuestas inmunitarias adquiridas. Se incluyen aquí a los linfocitos T y B (y sus subpoblaciones), a los macrófagos, células dendríticas, células de Lagerhans, células NK, neutrófilos, células cebadas, basófilos, y los eosinófilos (Rojas, O. 2006). Los linfocitos al ser células normales permitirían conocer entonces como ciertos compuestos producen una alteraciones de las funciones celulares básicas en ensayos de citotoxicidad celular (Acevedo, J. 2013).

##### **4.12.1 Obtención de Células Linfoides**

Boyum ideó un método basado en la centrifugación de la muestra sobre un gradiente de concentración discontinuo, cuyo medio original consistía en una mezcla de ficoll y metrizoato de sodio (aglutina los eritrocitos). Éste es un método fácil y simple, por lo que se utiliza para la obtención de linfocitos sanguíneos al trabajar con muestras de sangre periférica. El ficoll-diatrizoato al actuar sobre la sangre, separa las células mononucleares (linfocitos, monocitos) debido a diferencias de densidad. Los linfocitos y monocitos por poseer una menor densidad, luego de la centrifugación son recogidos del anillo blanco formado entre la interfase y el plasma y el ficoll-diatrizoato (Lomonte, B, 2009).

#### **4.13 Cepas celulares**

Es un cultivo derivado, por selección de una célula, desde un cultivo primario o de una línea celular. El nuevo cultivo tendrá propiedades o marcadores específicos que persistirán durante los pases subsiguientes (Castaño, E.,2012).

#### **4.14 Tipos de crecimiento celular**

##### **4.14.1 Células adherentes o cultivos fijos**

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

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

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

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

Presión osmótica, concentración de hidrogeniones, gases (oxígeno, dióxido de carbono), iones orgánicos, agua, carbohidratos, aminoácidos, L- Glutamina, vitaminas, suero, antibióticos y antimicóticos (Castaño, E.,2012).

#### **4.16 Medios de cultivo**

Los medios de cultivo están constituidos por una solución salina balanceada, suplementada con factores implicados en el metabolismo celular tales como carbohidratos, vitaminas, Suero Bobino Fetal (SFB) o Líquido amniótico y otros suplementos como lacto- albumina hidrolizada, extractos embrionarios o de levaduras y hormonas entre otras. La mayoría de suplementos y medios, deben esterilizarse mediante filtración a través de una membrana de poros de 0.22 micras (Castaño, E.,2012).

#### **4.17 Medio de Cultivo celular RPMI (Roswell Park Memorial Institute)**

Se trata de un medio de cultivo celular con sales enriquecidas con aminoácidos y otros componentes esenciales para el crecimiento de células humanas y de otros animales, gracias a que en su composición no posee timidina permite la sincronización de la división celular. Permite el crecimiento de al menos tres linajes celulares, siendo siempre determinados su pH y osmolaridad (Vitrocell, E. 2015).

## **4.18 Clasificación de los medios de cultivo**

### **4.18.1 Medio esencial mínimo (MEM)**

Medio que contiene los requerimientos mínimos de un medio. Está compuesto de SSB, aa esenciales y vitaminas; a partir de estos se separan los otros tipos de medios.

### **4.18.2 Medios de crecimiento**

Es un medio esencial mínimo con 10 a 15% de Suero Bobino Fetal (SFB). Se emplea para iniciar los cultivos debido a su capacidad de inducción de una rápida multiplicación celular.

### **4.18.3 Medios de Mantenimiento**

Se usan para mantener las células vivas pero en baja actividad metabólica, atrasando la degeneración celular y aumentando el intervalo en los subcultivos. Es el mismo MEM pero con suplemento con 2% de Suero Bobino Fetal (SFB).

### **4.18.4 Medios Selectivos**

Utilizados para favorecer el crecimiento de un tipo de células en particular. Para su uso se deben tener en cuenta dos factores. Primero, el tipo de células, su origen y adaptación previa; segundo, la naturaleza o propósito del cultivo, tiempo de supervivencia, crecimiento y utilización.

### **4.18.5 Medios de Congelación**

Utiliza como base el MEM, al cual se le añade SFB en altas concentraciones y glicerol o dimetilsulfóxido al 8 o 10% que protege las células de los cristales que se forman durante la congelación y descongelación (Castaño, E. 2012).

## **4.19 Criopreservación**

Una posibilidad interesante de los cultivos celulares es la de poderlos conservar por largos periodos de tiempo (meses o años) a bajas temperaturas (<150°C) en la que las células se mantienen en un estado de animación suspendida hasta que se necesiten; así, si es necesario trabajar varias líneas celulares pero no todas a la vez, es posible, ahorrar

reactivos, dinero y tiempo. Este procedimiento es útil, además, para resolver la pérdida por contaminación, minimizar los cambios genéticos en líneas celulares continuas y evitar el envejecimiento y posible transformación o la pérdida de las funciones originales de las células.

Las células se suspenden en medio de congelación, se enfrían a un ritmo constante (generalmente 1°C por minuto) y después se introduce en Nitrógeno (N<sub>2</sub>) líquido. El proceso de descongelación, por el contrario, debe realizarse usando el menor tiempo posible; para ello debe retirarse el vial del N<sub>2</sub> líquido, sumergido en el baño maría de 37 a 40 °C agitándolo suavemente hasta que se descongele completamente; luego el contenido del vial es diluido en medio fresco y llevado a una botella de cultivo.

La función del criopreservante es actuar como agente higroscópico; esto es, que puede absorber agua dentro y fuera de la célula para evitar la formación de cristales que, de otro modo, romperían las membranas celulares. La elevada concentración de suero contribuye probablemente a mantener la integridad conservando la concentración intracelular de proteínas en las células permeabilizadas.

Las células solo deben crioconservarse cuando se encuentran en la fase exponencial del crecimiento y en un buen estado (Aladro, F. 2009).

#### **4.20 Viabilidad celular**

La viabilidad celular mide la proporción de células vivas luego de un determinado procedimiento, permitiendo determinar alteraciones o rompimiento de la integridad de la membrana celular (**Rivera, M. 2012**). En un determinado cultivo es posible conocer el porcentaje de células viables tras un determinado estímulo o tratamiento, tal determinación se puede realizar gracias a la tinción de azul de tripano que se introduce en la membrana celular tiñéndolas de azul, cuando ésta no es viable, caso contrario se consideran células viables y se las observa como puntos blancos en la cámara de Neubauer (Cultek, 2010).

#### **4.21 Proliferación Celular**

La proliferación celular es la medida del número de células que se dividen en un determinado medio de cultivo, por lo general esto permite medir ciertos parámetros

celulares, que a su vez indican la respuesta proliferativa de las células ante los distintos estímulos de crecimiento, en la proliferación celular, las células llegan a un punto en que ocupan toda la superficie del medio en que crecen, y experimentan contacto entre ellas (Martínez, A. 2009).

## 5. MÉTODOS, TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS

### 5.1 Fase Pre-Analítica

- Oficio dirigido al Director del proyecto que permita ser parte del presente (**ANEXO 1**)
- Mantenimiento de la línea celular A549 ATTC (**Anexo 2**)
- Mantenimiento celular: Medio de congelación, Criocongelación, Descongelación celular (**ANEXO 3**)

### 5.2 Fase Analítica

En el presente estudio se realizó

- Preparación de medios de cultivo RPMI pH neutro y del extracto acuoso en diferentes concentraciones (**ANEXO 4**)
- Preparación de controles positivos con el fármaco cisplatino en diferentes Concentraciones (**ANEXO 5**)
- Obtención de linfocitos o células normales mediante la técnica de ficoll hypaque. (**ANEXO 6**)
- Tripsinización de células A549 (**ANEXO 7**)
- Colocación de células en cada pocillo por cálculo para Extracto Acuoso (**Anexo 8**)
- **Controles Negativos y Controles Positivos**
- **Control Positivo**
- Medio de cultivo más la línea celular de cáncer de pulmón, más fármaco cisplatino
- **Control Negativo**
- Medio de cultivo, más línea celular



### 5.3 Fase Post Analítica

- **Proliferación Celular:** Se realizaron dos cultivos con pH neutro, el primero que permitió la proliferación de células tumorales en un medio de cultivo selectivo, éste medio contó con los nutrientes necesarios para favorecer el crecimiento de la línea celular, así también al segundo cultivo se agregó la línea celular del cáncer, más la adición del extracto. Incubando así los cultivos a 37 ° C en la cámara de CO<sub>2</sub> al 5%. (**Anexo 9**)
- **Viabilidad Celular:** para la viabilidad celular se utilizó el colorante de azul de tripano que permitió teñir las estructuras y evaluar la integridad de la membrana, se efectuó también una suspensión que logró diferenciar las células viables de las no viables, así mismo se realizó un conteo de las células viables y no viables en cada campo visual en la cámara de Neubauer. (**Anexo 10**)
- Permiso para trabajar en los laboratorios de Investigaciones de la UNL del centro de Biotecnología. (**Anexo 11**)
- Realización de cálculos correspondientes a Viabilidad Celular para la obtención del porcentaje de células vivas y muertas (**Anexo 12**)
- Realización de los cálculos correspondientes a Proliferación Celular, para la obtención del porcentaje de células elongadas, en relación a las células vivas o confluencia celular. (**Anexo 13**)
- Pruebas de significancia mediante el Software de Análisis Estadístico (SAS), con la utilización de tres métodos estadísticos tales como la prueba de ADEVA, la cual diseña bloques al azar en relación al número de tratamientos, la misma realiza una varianza, permitiendo conocer si los diferentes ensayos resentan una diferencia significativa. Al encontrar tal diferencia significativa se aplica la prueba de Duncan, que permite conocer la significancia entre medias, o que categoriza a través de letras que se asignan determinando así cual es mejor una con otra, en cuanto se relaciona al tratamiento, al final se utiliza la prueba de T-Student que permite encontrar las medias, realizando así un análisis por grupos entre lo mejores. (**Anexo 14**)
- Material de evidencia investigativa (**Anexo 15**)

## 6. RESULTADOS

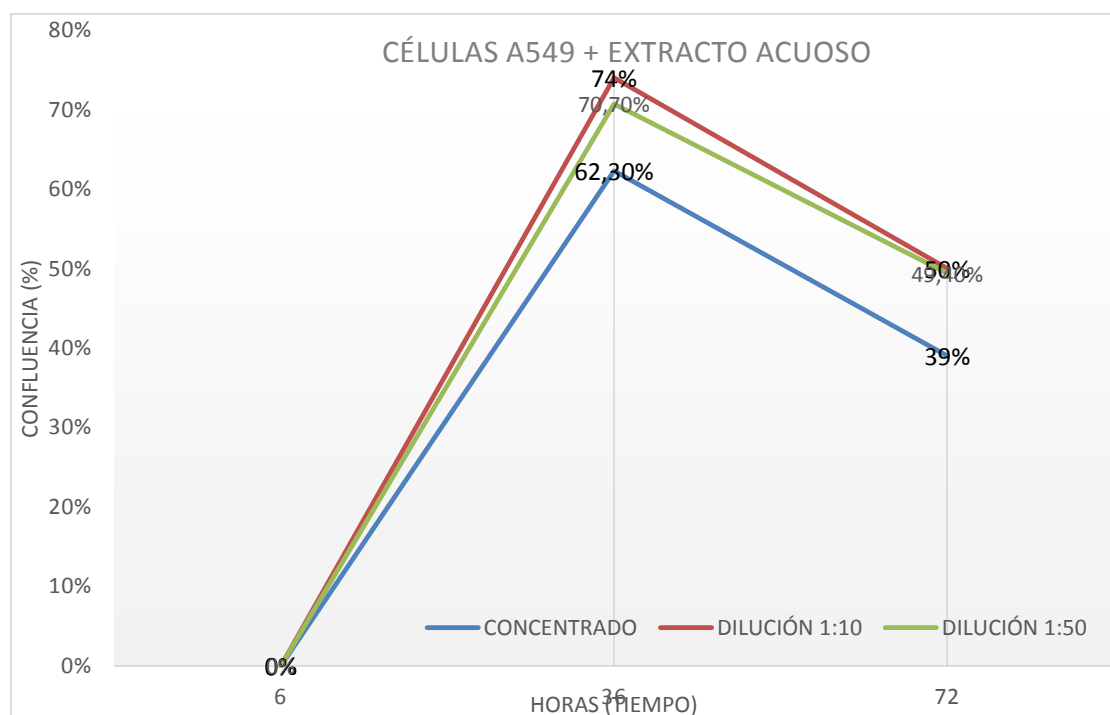
### PROLIFERACIÓN CELULAR

#### CÉLULAS A549 FRENTE AL EXTRACTO ACUOSO EN MEDIO DE CULTIVO CON pH NEUTRO

TABLA 1

| HORAS         | 6  | 36    | 72    |
|---------------|----|-------|-------|
| CONCENTRADO   | 0% | 62,3% | 39%   |
| DILUCIÓN 1:10 | 0% | 74%   | 50%   |
| DIUCIÓN 1:50  | 0% | 70,7% | 49,4% |

#### CÉLULAS A549 FRENTE AL EXTRACTO ACUOSO



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

**AUTOR:** Kleber Garrochamba

**LEYENDA:**

A549\*\*

\*RPMI 1640

\*\*\*pH Neutro

En la tabla 1 se puede observar que en el ensayo realizado en medio RPMI a pH neutro entre la línea celular, y el extracto acuoso, la dilución 1:10 presenta una mayor confluencia celular equivalente al 74 % a las 36 horas, en relación a la confluencia celular de la dilución 1:10 equivalente al 50 %, a las 72 horas, y dilución 1:10 equivalente al 0 % a las 6 horas respectivamente.

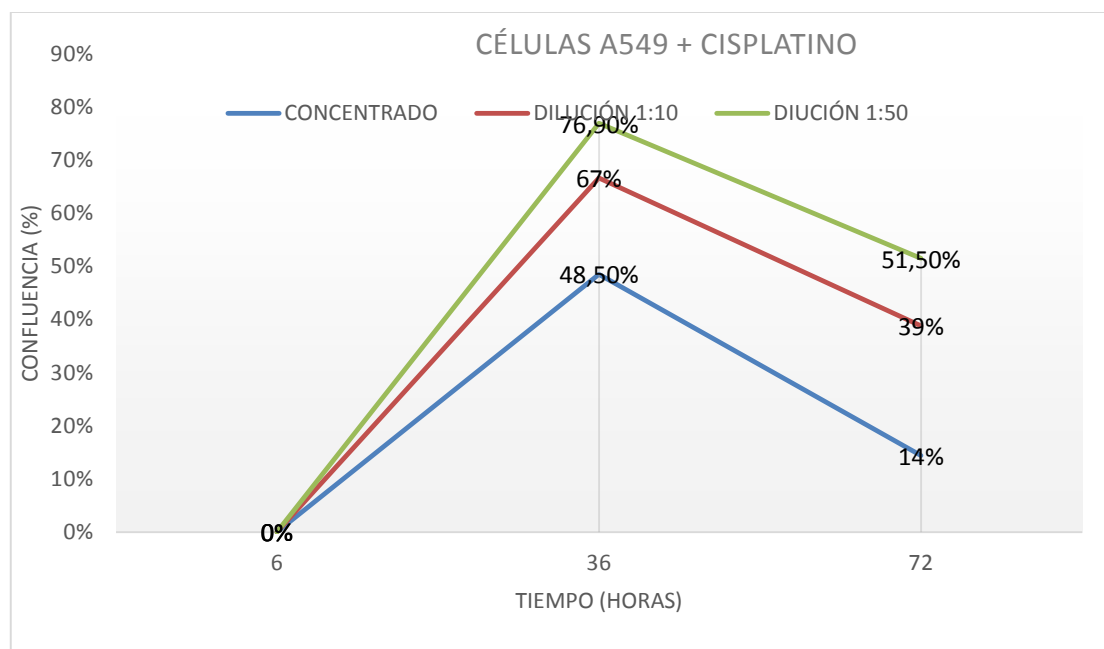
## PROLIFERACIÓN CELULAR

### CÉLULAS A549 FRENTE AL CISPLATINO EN MEDIO DE CULTIVO CON pH NEUTRO

TABLA 2

#### CÉLULAS A549 + CISPLATINO

| HORAS         | 6  | 36     | 72     |
|---------------|----|--------|--------|
| CONCENTRADO   | 0% | 48,50% | 14%    |
| DILUCIÓN 1:10 | 0% | 67%    | 39%    |
| DIUCIÓN 1:50  | 0% | 76,90% | 51,50% |



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

**AUTOR:** Kleber Garrochamba

**LEYENDA:**

A549\*\*

\*RPMI 1640

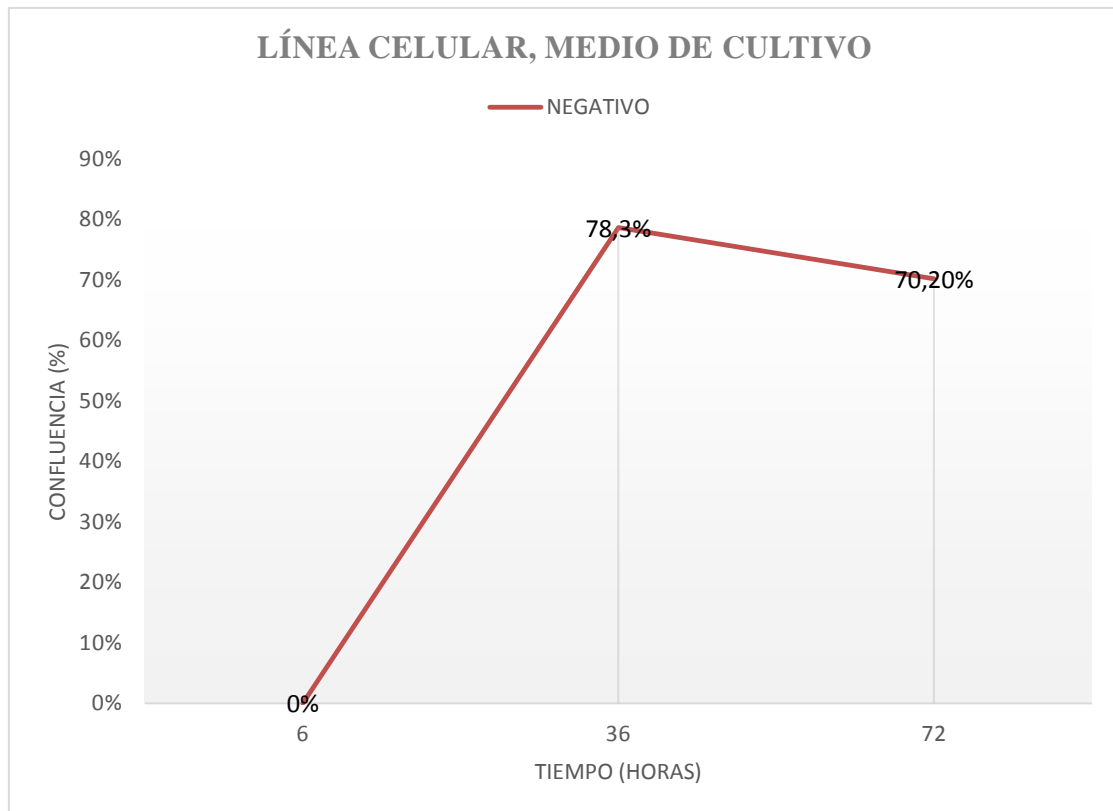
\*\*\*pH Neutro

En la tabla 2 se puede observar que en el ensayo realizado en medio RPMI a pH neutro entre la línea celular A549 y el cisplatino, la dilución 1:50 presenta una mayor confluencia celular del 76,9 % a las 36 horas, en relación a la confluencia celular de la dilución 1:50 equivalente al 51,50 % a las 72 horas, y dilución 1:10 equivalente al 0 % a las 6 horas respectivamente.

**PROLIFERACIÓN CELULAR**  
**LÍNEA CELULAR + MEDIO DE CULTIVO**

**TABLA 3**

| <b>HORAS</b>    | <b>6</b> | <b>36</b> | <b>72</b> |
|-----------------|----------|-----------|-----------|
| <b>NEGATIVO</b> | 0%       | 78,3 %    | 70,2 %    |



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

**AUTOR:** Kleber Garrochamba

**LEYENDA:**

A549\*\*

\*RPMI 1640

\*\*\*pH Neutro

En la tabla 3 se puede observar que en el ensayo realizado en medio RPMI a pH neutro de la línea celular A549 y medio de cultivo celular ó (negativo), presenta una mayor confluencia celular del 78,3 %, a las 36 horas, una confluencia menor del 70,2 % a las 72 horas, y una confluencia aún más baja equivalente al 0 % a las 6 horas de incubación.

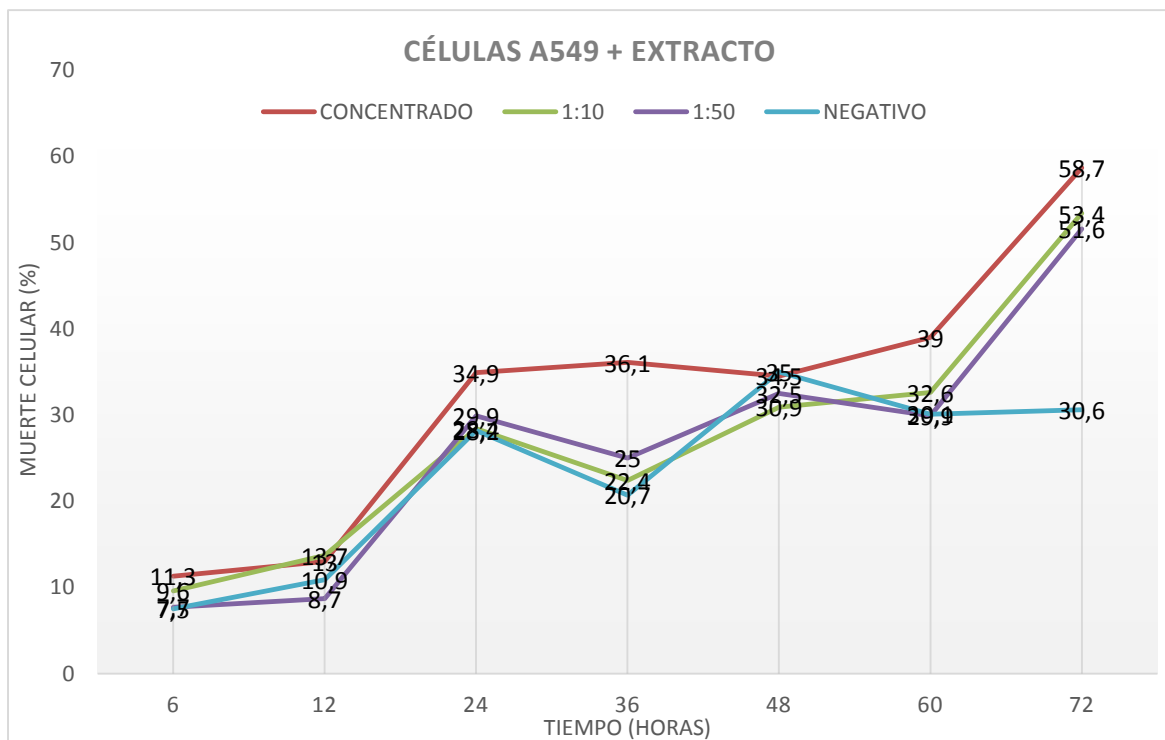
## VIABILIDAD CELULAR

### EVALUACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO DE LA HOJA DE ANNONA CHERIMOLA EN MEDIO DE CULTIVO CON pH NEUTRO CON CÉLULAS A549

#### CÉLULAS A549 FRENTE AL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE ANNONA CHERIMOLA EN MEDIO DE CULTIVO A pH NEUTRO

TABLA 4

| HORAS | CONCENTRADO | 1:10 | 1:50 | NEGATIVO |
|-------|-------------|------|------|----------|
| 6     | 11,3        | 9,6  | 7,7  | 7,5      |
| 12    | 13          | 13,7 | 8,7  | 10,9     |
| 24    | 34,9        | 28,4 | 29,9 | 28,2     |
| 36    | 36,1        | 22,4 | 25   | 20,7     |
| 48    | 34,5        | 30,9 | 32,5 | 35       |
| 60    | 39          | 32,6 | 29,9 | 30,1     |
| 72    | 58,7        | 53,4 | 51,6 | 30,6     |



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

**AUTOR:** Kleber Garrochamba

**LEYENDA:**

A549\*\*

\*RPMI 1640

\*\*\*pH Neutro

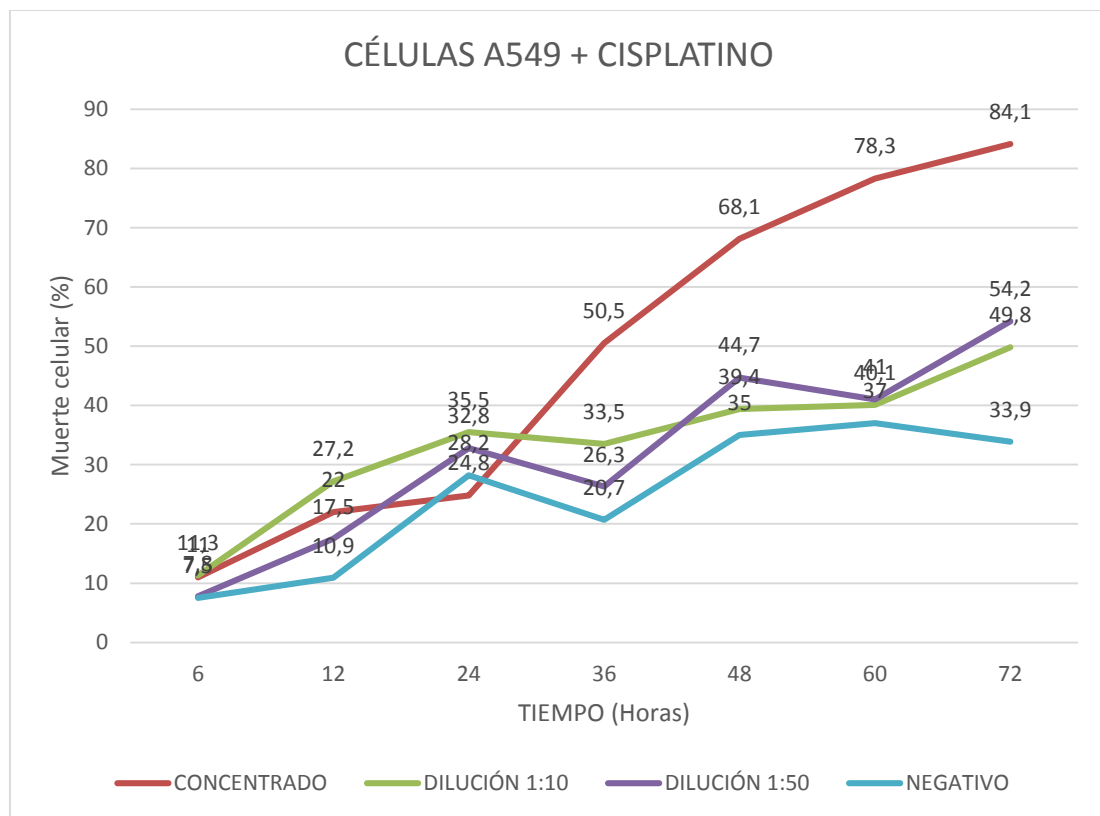
En la tabla 4 se puede observar que el extracto acuoso de hojas de *Annona cherimola* concentrado en medio de cultivo RPMI a pH neutro posee un efecto mayor de muerte celular equivalente al 58,7 %, en relación a la dilución 1:10 del 53.4%, y dilución 1:50 de 51,6% a las 72 horas de incubación.

**CÉLULAS A549 FRENTE AL CISPLATINO EN MEDIO DE CULTIVO CON  
pH NEUTRO**

**CÉLULAS A549 + CISPLATINO**

**TABLA 5**

| HORAS | CONCENTRADO | DILUCIÓN<br>1:10 | DILUCIÓN<br>1:50 | NEGATIVO |
|-------|-------------|------------------|------------------|----------|
| 6     | 11          | 11,3             | 7,8              | 7,5      |
| 12    | 22          | 27,2             | 17,5             | 10,9     |
| 24    | 24,8        | 35,5             | 32,8             | 28,2     |
| 36    | 50,5        | 33,5             | 26,3             | 20,7     |
| 48    | 68,1        | 39,4             | 44,7             | 35       |
| 60    | 78,3        | 40,1             | 37               | 37       |
| 72    | 84,1        | 49,8             | 54,2             | 33,9     |



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

**AUTOR:** Kleber Garrochamba

**LEYENDA:**

A549\*\*

\*RPMI 1640

\*\*\*pH Neutro

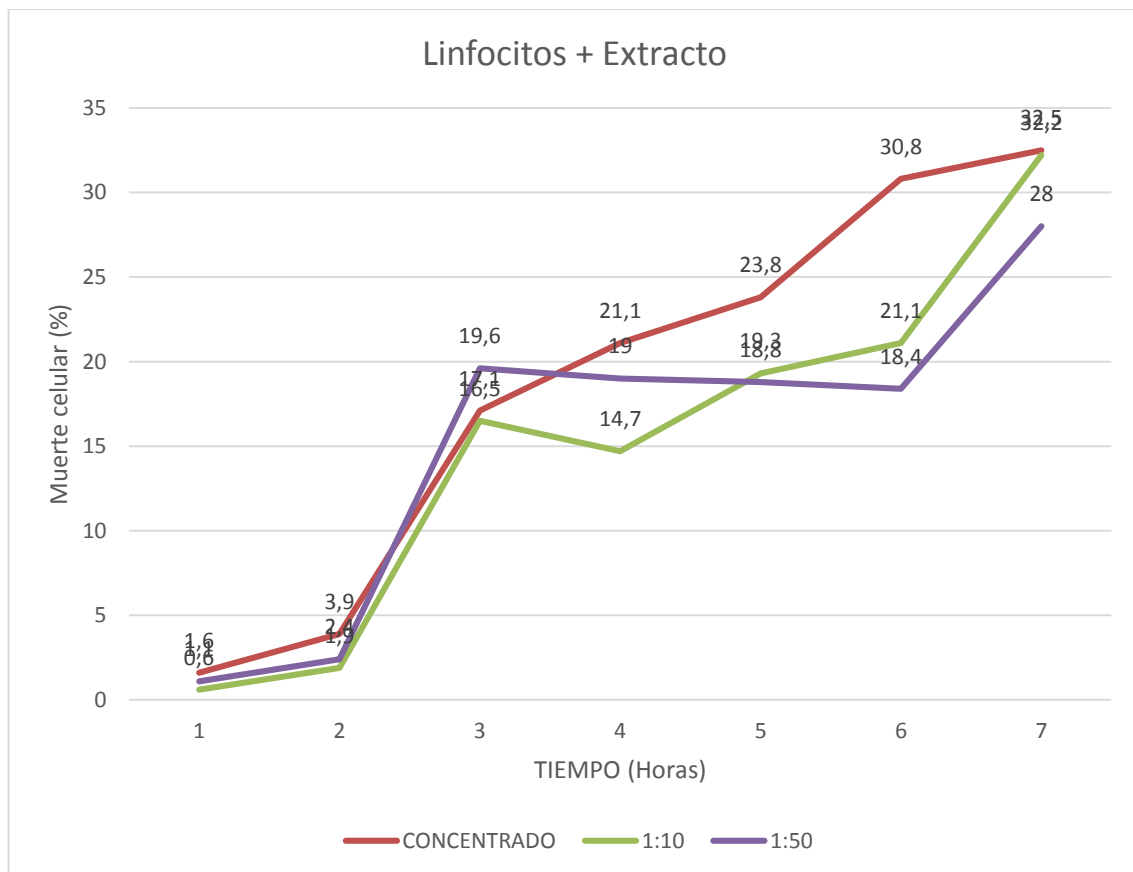
En la tabla 5 se puede observar que el ensayo realizado en medio RPMI a pH neutro entre la línea celular A549 frente al cisplatino, el concentrado presenta una mayor mortalidad equivalente al 84,1 %, en relación a la dilución 1:50 del 54,2 %, y dilución 1:10: 49,8. %, a las 72 horas de incubación.



**LINFOCITOS HUMANOS FRENTE AL EXTRACTO ACUOSO EN MEDIO DE CULTIVO CON pH NEUTRO**  
**LINFOCITOS + EXTRACTO**

**TABLA 6**

| HORAS | CONCENTRADO | 1:10 | 1:50 |
|-------|-------------|------|------|
| 6     | 1,6         | 0,6  | 1,1  |
| 12    | 3,9         | 1,9  | 2,4  |
| 24    | 17,1        | 16,5 | 19,6 |
| 36    | 21,1        | 14,7 | 19   |
| 48    | 23,8        | 19,3 | 18,8 |
| 60    | 30,8        | 21,1 | 18,4 |
| 72    | 32,5        | 32,2 | 28   |



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

**AUTOR:** Kleber Garrochamba

**LEYENDA:**

A549\*\*

\*RPMI 1640

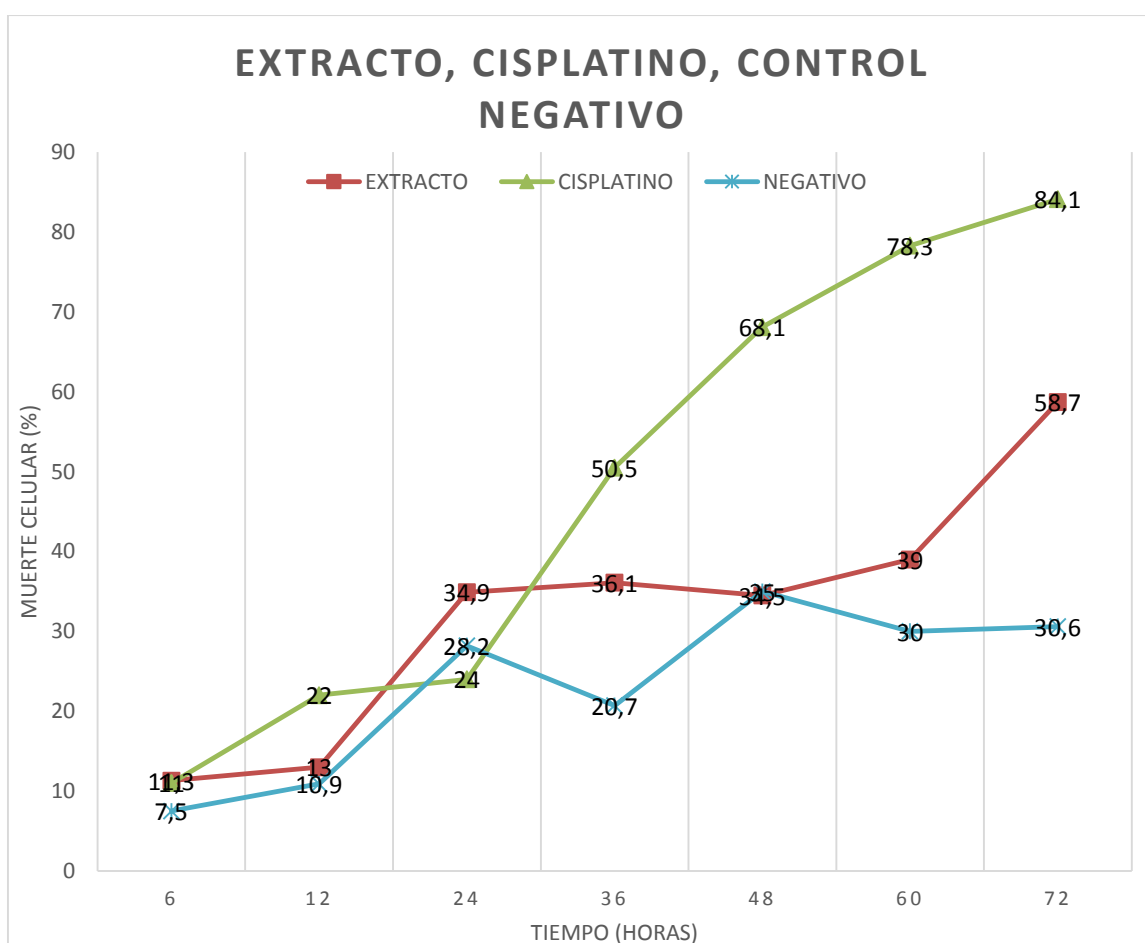
\*\*\*pH Neutro: 7,4

En la tabla 6 se puede observar que el extracto acuoso concentrado en medio de cultivo RPMI a pH neutro posee un efecto mayor de muerte celular equivalente al 32,5 %, en relación a la dilución 1:10 que fue del 32,2. %, y dilución 1:50: 28% a las 72 horas de incubación.

**COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS CITOTÓXICOS CONCENTRADOS ENTRE EL EXTRACTO ACUOSO, CISPLATINO, Y CONTROL NEGATIVO FRENTE A LA LÍNEA CELULAR A549, EN MEDIO DE CULTIVO CON pH NEUTRO.**

**TABLA 7**

| HORAS      | 6    | 12   | 24   | 36   | 48   | 60   | 72   |
|------------|------|------|------|------|------|------|------|
| EXTRACTO   | 11,3 | 13   | 34,9 | 36,1 | 34,5 | 39   | 58,7 |
| CISPLATINO | 11   | 22   | 24   | 50,5 | 68,1 | 78,3 | 84,1 |
| NEGATIVO   | 7,5  | 10,9 | 28,2 | 20,7 | 35   | 30   | 30,6 |



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

**AUTOR:** Kleber Garrochamba

**LEYENDA:**

A549\*\*

\*RPMI 1640

\*\*\*pH Neutro

En la tabla 7 se puede observar que en los ensayos de concentrados realizados entre extracto acuoso, cisplatino, y control negativo en medio de cultivo RPMI a pH neutro, el cisplatino posee mayor efecto citotóxico de 84,1 % frente a la línea celular A549, en relación al del extracto acuoso de 58,7%, y control negativo de 30,6 % a las 72 horas de incubación.

## 6 DISCUSIÓN

La presente investigación titulada: Efecto citotóxico del extracto acuoso de las hojas de *Annona cherimola* en una línea celular de cáncer de pulmón humano en un medio de cultivo con pH neutro realizado en el centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja, cuya investigación tuvo como finalidad: Determinar el grado de proliferación celular determinando que de los ensayos de proliferación celular realizados en medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute (RPMI) a pH neutro, el ensayo realizado entre el medio de cultivo + la línea celular A549 presenta una confluencia celular equivalente al 78,3 % a las 36 horas, en relación al ensayo de dilución 1:50 entre el cisplatino, y la línea celular A549 con una confluencia celular de 76,9 % a las 36 horas, y una confluencia menor del 70,7 % a las 36 horas del ensayo con dilución 1:50 entre la línea celular A549, y el extracto acuoso. Así también se midió la Viabilidad celular en el cultivo de líneas celulares tumorales de pulmón con el extracto acuoso en pH neutro, tales resultados obtenidos demuestran que existe mayor efecto citotóxico en medio de cultivo RPMI a pH neutro por parte del concentrado de cisplatino frente a la línea celular de cáncer de pulmón A549, equivalente al 84,1 %, en relación al efecto citotóxico dado por parte del extracto acuoso concentrado frente a la línea celular de cáncer de pulmón A549, equivalente al 58,7 %, y un efecto citotóxico aún menor equivalente al 32.5 % observado entre el extracto acuoso y linfocitos humanos utilizados para conocer la citotoxicidad del extracto a nivel de una célula normal y efectos secundarios.

En el Perú, según Quispe en el 2009 se realizó un estudio para determinar el efecto citotóxico en cultivos de cáncer, en el que se ha demostrado que compuestos naturales de interés biológico como las acetogeninas: cis-annonacin, y (2,4)- cis- y transoannonacinas poseen citotoxicidad frente a la línea celular A-549 (carcinoma de pulmón), en el estudio realizado, se trabaja con una línea celular de adenocarcinoma de cérvix, mama, y mieloides crónicas, (ME180, MCF-7, K-562). Para la línea celular ME180, los porcentajes de crecimiento variaron de -13,0 a 60,1, dado que sus mayores concentraciones no solo inhibieron el crecimiento sino que destruyeron las células inoculadas, los porcentajes para la línea MCF-7 fueron de -45,5 hasta 67,3, el comportamiento del extracto muestra una mayor capacidad de inhibir el crecimiento tumoral, y los porcentajes para la línea K-562 fueron de -15,1 y 59,5 con una mayor

capacidad para inhibir el crecimiento tumoral, más no así con el cisplatino (Quispe, A. Callacondo, D. 2007). Al contrastar los dos estudios se observa que existe relación con el presente estudio debido a que el cisplatino muestra una mayor capacidad de inhibir el crecimiento tumoral, al encontrarse porcentajes de crecimiento superiores equivalente al 84,1% frente a la línea celular A549 en relación al extracto.

Estudios realizados por la Sociedad científica de San Fernando Lima, Perú en 2007, que consistía en evaluar el efecto citotóxico de *Annona muricata* (familia Annonaceae), en cultivo de líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar y gástrico (H-460, C678), en el que se determina que para la línea celular H-460 hay una densidad óptica de  $< 0.00022$ , y para el fluoracilo de 0.00030, para la línea celular C678 una densidad óptica de  $< 0.00022$  y fluoracilo de 0.00013 llegando a la conclusión de que existió un efecto citotóxico sobre las líneas celulares por parte del extracto e inclusive superior a la del fluoracilo (Quispe, A. Zavala, D. 2007). Tal estudio evidencia la citotoxicidad del extracto, a pesar de utilizar un medicamento terapéutico diferente, sin embargo *annona muricata* pertenece a la familia *annocaceae*, es importante mencionar que el estudio realizado no presenta una relación total con la investigación en curso, debido a que la misma presenta mayor efecto citotóxico dada por el cisplatino, equivalente al 58,7 %, en relación al cisplatino y control negativo.

Acorde a un estudio realizado en la Sociedad científica de la Universidad Nacional de San Marcos Lima-Perú, el cual menciona un estudio del efecto citotóxico in vitro de la acetogenina (muricina H) en cultivos de cáncer de pulmón (H460, el estudio mencionado demuestra que existe una mayor actividad citotóxica por parte de la acetogenina muricin H aislada de *Annona muricata*, con concentraciones de (0,06 ug/ml, y 62,5 ug/ml), demostrando que se inhibe el crecimiento de células tumorales, así también la concentración inhibitoria del fluoracilo de 0,46,(Quispe, A. Zavala, D. 2007). La relación con la investigación en curso merece mencionar, la presencia de la acetogeninas con su efecto citotóxico por parte del extracto del 84,1 % y cisplatino 58,7% respectivamente, concentraciones inhibitorias del crecimiento de células tumorales.

En Perú, según Callacondo, en 2008| se realizó un estudio para determinar la actividad citotóxica del extracto de *Gnaphalium spicatum* en cultivos de líneas celulares

tumorales humanas dentro de las cuales se menciona la línea celular H-460, en este tipo de estudio se utilizaron extractos de tallos, hojas, flores, y como fármaco el cisplatino, es así que para la línea celular H-460, se muestran valores entre 47,7 a 114,3, y cisplatino de 0,0004, es así que el extracto supera el efecto citotóxico, por otro lado el cisplatino intenta alcanzar el valor dado por el extracto (Callacondo, D. Quispe, A. 2008). Éste estudio presenta relación alguna, debido a que el cisplatino presenta un porcentaje considerable en cuanto a una citotoxicidad del 84,1 %, no obstante el porcentaje de muerte celular dado por el extracto es equivalente al 58,7 %.

## 7. CONCLUSIONES

- Se verificó el grado de proliferación celular realizado en medio de cultivo RPMI a pH neutro, el ensayo de mediodo cultivo + la línea celular de cáncer de pulmón A549 (control negativo) presenta una mayor confluencia celular equivalente al 78,3 % a las 36 horas, en relación al ensayo de cisplatino frente a la línea celular A549 con dilución 1:50 equivalente a una confluencia celular de 76,9 % a las 36 horas, y una confluencia menor del ensayo entre la línea celular A549 y el extracto acuoso con dilución 1:50 equivalente a una confluencia celular del 70,7 % a las 36 horas de incubación.
- Se determinó la Viabilidad celular realizada en medio de cultivo RPMI a pH neutro, tales resultados demuestran que existe mayor efecto citotóxico por parte del concentrado de cisplatino frente a la línea celular de cáncer de pulmón (A549) equivalente al 84,1 %, en relación al efecto citotóxico dado por parte del extracto acuoso concentrado frente a la línea celular de cáncer de pulmón (A549), equivalente al 58,7 %, y un efecto citotóxico aún menor observado entre linfocitos humanos y el extracto acuoso concentrado equivalente al 32,5 % .



## 8. RECOMENDACIONES

- El presente estudio sea motivo de investigaciones a futuro, debido a que el reino vegetal cuenta con infinidad de principios activos a nivel de sus diferentes estructuras, en este caso se menciona a la familia Annonaceae, especie: *Annona cherimola*, en la cual se han descubierto principios bioactivos de especial interés en el proceso de citotoxicidad a nivel de líneas celulares del cáncer.
- Realizar estudios a nivel de Biología molecular que permitan comprender el efecto citotóxico dado por las acetogeninas presentes en *Annona cherimola* a nivel del material genético de la célula cancerígena.
- Se evalué gradualmente los compuestos activos de *Annona cherimola* en modelos animales, para determinar su efectividad, ya que los resultados de citotoxicidad son aún *in vitro*, antes de su recomendación a la terapia quimioterapéutica.

## 10. BIBLIOGRAFÍA:

- Acevedo, Juan.(2013). Modelos invitro para la evaluación y caracterización de péptidos bioactivos. 01/12/015, de OmniaScience Sitio web: <http://omniascience.com/monographs/index.php/monograficos/article/viewFile/38/6>
- American Cancer Society. (2014). Cáncer de pulmón no microcítico. 05/10/015, de 2. American Cancer Society Sitio web: <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002310-pdf.pdf>
- American Type Culture Collection. (2013). A549 (ATCC® CCL-185™). 07/10/015, de ATTC Sitio web: <http://www.atcc.org/products/all/CCL-185.aspx>
- Alejandra Vardaro. (2011). Cisplatino. 15/10/015, de Tuteur Sitio web: <http://www.tuteur.com.ar/www/prospectos/cisplatino.pdf>
- Caldas Adriana. (2012). Planta Piloto de Extracción. 10/10/015, de Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Químicas Sitio web: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/2468/1/tq1111.pdf>
- Castaño, E. (2012). Cultivos Celulares. 11/02/015, de Biogénesis Sitio web: <http://editorialbiogenesis.udea.edu.co/index.php/biogenesis/article/viewFile/252/252>
- Claudia Cuklinski. (2010). Alcaloides. En Farmacognosia(167). España: Ediciones Omega ISBN.
- Collacondo, David; Quispe, Angel. (2008). ACTIVIDAD CITOTÓXICA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Gnaphalium spicatum* “KETO KETO” EN CULTIVOS DE LÍNEAS CELULARES TUMORALES HUMANAS. 05/10/015, de Revista Médica Peruana Sitio web: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v25n4/a06v25n4>

- Cueva, Patricia. (2013). El Cáncer en el Ecuador. 19/01/015, de SOLCA Quito  
Sitio web: <http://www.taringa.net/posts/salud-bienestar/17638672/El-Cancer-en-el-Ecuador.html>
- Cultek. (2010). Cultivos Celulares. 20/10/015, de Cultek Sitio web:  
[http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Cultivos%20Celulares/Aplica\\_Cultivos\\_Celulares\\_2010.pdf](http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Cultivos%20Celulares/Aplica_Cultivos_Celulares_2010.pdf)
- Flórez, J. (2010). Fármacos Antineoplásicos. 01/12/015, de Farmacología Humana  
Sitio web: [https://www.uam.es/departamentos/medicina/farmacologia/especifica/F\\_General/FG\\_T75.pdf](https://www.uam.es/departamentos/medicina/farmacologia/especifica/F_General/FG_T75.pdf)
- Gómez Milagros. (2009). Curso de cultivos celulares. 01/12/015, de Universidad Autónoma de Madrid  
Sitio web: [https://www.uam.es/personal\\_pdi/ciencias/lidesviat/\\_private/BIOQ%20EXPIII/CursocultivosUAM2008.pdf](https://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/lidesviat/_private/BIOQ%20EXPIII/CursocultivosUAM2008.pdf)
- Jorge León. (2010). Anonáceas. En Botánica de los Cultivos Tropicales(50-52). Costa Rica: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura.
- Juanita Paz. (2010). Cáncer Pulmonar. 07/10/015, de FUNDACIÓN NEUMOLÓGICA COLOMBIANA  
Sitio web: <http://www.neumologica.org/Archivos/ADULTOS/CANCER%20PULMONAR%20GPC.pdf>
- Lomonte, B.. (2009). Técnicas de Laboratorio en Inmunología Clínica. 11/02/015, de Universidad de Costa Rica Sitio web:  
[http://www.medic.ula.ve/idic/docs/clases/iahula/curso\\_2010/suplementario-tema16.pdf](http://www.medic.ula.ve/idic/docs/clases/iahula/curso_2010/suplementario-tema16.pdf)
- Londoño Yesid, Martínez Elizabeth. (2010). Obtención y Evaluación de extractos Bioactivos presentes en semillas de Annona muricata. 05/10/015, de Escuela de Tecnología Química Pereira Sitio web:  
<http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/11059/1828/1/63441F634.pdf>

- Martínez Angela. (2009). Proliferación Y Diferenciación de Cultivos Primarios . 20/10/015, de Universidad Complutense de Madrid Sitio web: <http://biblioteca.ucm.es/tesis/19911996/D/1/D1010001.pdf>
- National Cancer Institute. (2010). El Cáncer de Pulmón. 05/10/015, de National Cancer Institute Sitio web: <http://cancer101.org/wp-content/uploads/2014/08/pulmon.pdf>
- Onsalus. (2015). extracto acuoso. 11/02/015, de onsalus Sitio web: <http://www.onsalus.com/diccionario/extracto-acuoso/11204>
- Quispe, Angel (2009). Efecto citotóxico de las semillas de Annona cherimola en cultivos de cáncer de cervix, mama, y leucemia mieloide crónica. 19/01/015, de Acta Médica Peruana Sitio web: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1728-59172009000300003](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172009000300003)
- Quispe Angel, David Zavala. (2007). Efecto citotóxico de Annona muricata en cultivo de líneas celulares. 07/10/015, de Sociedad Científica de San Fernando Lima-Perú Sitio web: [http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/cimel/v12\\_n1/pdf/a05v12n1.pdf](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/cimel/v12_n1/pdf/a05v12n1.pdf)
- Quispe, Angel; Zavala, David.. (2006). EFECTO CITOTÓXICO SELECTIVO IN VITRO DE MURICIN H (ACETOGENINA DE Annona muricata) EN CULTIVOS CELULARES DE CÁNCER DE PULMÓN . 06/10/015, de Revista Médica Peruana Sitio web: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v23n4/a06v23n4.pdf>
- Registro Nacional de Tumores SOLCA 2014
- Rivera, Michael.(2012). Viabilidad y conteo celular. 01/12/015, de Slides Share Sitio web: <http://es.slideshare.net/uscbio225/viabilidad-y-conteo-celular>

- Roncali Emerito. (2010). Cáncer de Pulmón. En Todo sobre el Cáncer(385-389). España: ISBN Digital publications.
- Rojas, O. (2006). Inmunidad adquirida: el sistema linfoide. En Inmunología de Memoria(73). México: Médica Panamericana.
- Vanhouve Wouter. (2010). Descriptores para Annona cherimola. 13/10/015, de Bioversity International Sitio web: [https://www.bioversityinternational.org/fileadmin/user\\_upload/online\\_library/publications/pdfs/1295.pdf](https://www.bioversityinternational.org/fileadmin/user_upload/online_library/publications/pdfs/1295.pdf)
- Vasey Christopher . (2010). Ácidos y Bases. En Equilibrio Ácido Base(18). España: EDAF.
- Velásquez María, Miguel Ordorica. (2009). Ácidos, Bases, pH y Soluciones Reguladoras. 21/10/015, de mlvm/maov/23 Sitio web: <http://www.bioquimica.dogsleep.net/Teoria/archivos/Unidad24.pdf>
- Vitrocell. (2015). Medio MEM Earle. 12/10/015, de Vitrocell Embriolife Sitio web: [http://www.vitrocell.com.br/esp/vitrocell\\_esp\\_bulamem.html](http://www.vitrocell.com.br/esp/vitrocell_esp_bulamem.html)

## 11. ANEXOS

### ANEXO 1

(OFICIO DIRIGIDO AL DIRECTOR DEL PROYECTO QUE PERMITA SER PARTE DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN).



EVALUACIÓN DEL EFECTO INMUNOESTIMULANTE DEL EXTRACTO DE *ANNONA CHERIMOLA*. 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 del interesado:

CERTIFICO:

Que el Sr. **KLEBER GABRIEL GARROCHAMBA PEÑAFIEL**, estudiante del **VIII MÓDULO** de la Carrera de **LABORATORIO CLÍNICO**, con cédula de identidad 1104899693 fue aceptado para formar parte del grupo de estudiantes y ser partícipe de 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 Licenciado en Laboratorio Clínico.

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

Atentamente

Dr. Miguel Marín Gómez Mg, Sc.

**DIRECTOR DEL PROYECTO**

## ANEXO 2

# CONSERVACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR A549



Product Sheet

### A549 (ATCC® CCL-185™)

Please read this **FIRST**

Storage Temp.  
**liquid nitrogen  
vapor phase**

Biosafety Level  
**1**

#### Intended Use

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

#### Complete Growth Medium

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

#### Citation of Strain

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

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

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

Or contact your local distributor

Page 1 of 3



#### Description

**Organism:** *Homo sapiens*, human

**Tissue:** lung

**Disease:** Carcinoma

**Age:** 58 years

**Gender:** male

**Morphology:** epithelial

**Growth Properties:** adherent

**Isoenzymes:**

G6PD, B

**DNA Profile:**

Amelogenin: X,Y

CSF1PO: 10,12

D13S317: 11

D16S539: 11,12

D5S818: 11

D7S820: 8,11

THO1: 8,9,3

TPOX: 8,11

VWA: 14

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



#### Batch-Specific Information

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



#### SAFETY PRECAUTION

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



#### Unpacking & Storage Instructions

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



#### Handling Procedure for Frozen Cells

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



1. Thaw the vial by gentle agitation in a 37°C water bath. To reduce the possibility of contamination, keep the O-ring and cap out of the water. Thawing should be rapid (approximately 2 minutes).
2. Remove the vial from the water bath as soon as the contents are thawed, and decontaminate by dipping in or spraying with 70% ethanol. All of the operations from this point on should be carried out under strict aseptic conditions.
3. Transfer the vial contents to a centrifuge tube containing 9.0 mL complete culture medium, and spin at approximately 125 x g for 5 to 7 minutes.
4. Resuspend cell pellet with the recommended complete medium (see the specific batch information for the culture recommended dilution ratio). It is important to avoid excessive alkalinity of the medium during recovery of the cells. It is suggested that, prior to the addition of the vial contents, the culture vessel containing the complete growth medium be placed into the incubator for at least 15 minutes to allow the medium to reach its normal pH (7.0 to 7.6). pH (7.0 to 7.6).



Product Sheet

## A549 (ATCC® CCL-185™)

Please read this FIRST

|   |   |
|---|---|
|  | Storage Temp.<br><b>liquid nitrogen<br/>vapor phase</b> |
|  | Biosafety Level<br><b>1</b>                             |

### Intended Use

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

### Complete Growth Medium

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

### Citation of Strain

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

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

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

Or contact your local distributor

Page 2 of 3

- Incubate the culture at 37°C in a suitable incubator. A 5% CO<sub>2</sub> in air atmosphere is recommended if using the medium described on this product sheet.



### Handling Procedure for Flask Cultures

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

- Upon receipt visually examine the culture for macroscopic evidence of any microbial contamination. Using an inverted microscope (preferably equipped with phase-contrast optics), carefully check for any evidence of microbial contamination. Also check to determine if the majority of cells are still attached to the bottom of the flask; during shipping the cultures are sometimes handled roughly and many of the cells often detach and become suspended in the culture medium (but are still viable).
- If the cells are still attached, aseptically remove all but 5 to 10 mL of the shipping medium. The shipping medium can be saved for reuse. Incubate the cells at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> in air atmosphere until they are ready to be subcultured.
- If the cells are not attached, aseptically remove the entire contents of the flask and centrifuge at 125 x g for 5 to 10 minutes. Remove shipping medium and save. Resuspend the pelleted cells in 10 mL of this medium and add to 25 cm<sup>2</sup> flask. Incubate at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> in air atmosphere until cells are ready to be subcultured.



### Subculturing Procedure

Volumes used in this protocol are for 75 cm<sup>2</sup> flask; proportionally reduce or increase amount of dissociation medium for culture vessels of other sizes. Corning® T-75 flasks (catalog #430641) are recommended for subculturing this product.

- Remove and discard culture medium.
- Briefly rinse the cell layer with 0.25% (w/v) Trypsin- 0.53 mM EDTA solution to remove all traces of serum that contains trypsin inhibitor.
- Add 2.0 to 3.0 mL of Trypsin-EDTA solution to flask and observe cells under an inverted microscope until cell layer is dispersed (usually within 5 to 15 minutes).  
Note: To avoid clumping do not agitate the cells by hitting or shaking the flask while waiting for the cells to detach. Cells that are difficult to detach may be placed at 37°C to facilitate dispersal.
- Add 6.0 to 8.0 mL of complete growth medium and aspirate cells by gently pipetting.
- Add appropriate aliquots of the cell suspension to new culture vessels.  
Cultures can be established between 2 x 10<sup>3</sup> and 1 x 10<sup>4</sup> viable cells/cm<sup>2</sup>. Do not exceed 7 x 10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup>.
- Incubate cultures at 37°C.

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

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

**Medium Renewal:** 2 to 3 times per week



### Cryopreservation Medium

Complete growth medium described above supplemented with 5% (w/v) DMSO.  
Cell culture tested DMSO is available as ATCC Catalog No. 4-X.



### Comments

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



### References

References and other information relating to this product are available online at [www.atcc.org](http://www.atcc.org).



### Biosafety Level: 1

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

### ATCC Warranty







Product Sheet

## A549 (ATCC® CCL-185™)

### Please read this FIRST

|   |   |
|---|---|
|  | Storage Temp.<br><b>liquid nitrogen<br/>vapor phase</b> |
| .....   |   |
|  | Biosafety Level<br><b>1</b>                             |

### Intended Use

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

### Complete Growth Medium

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

### Citation of Strain

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

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

### Disclaimers

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans.

While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate.

This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to ensure authenticity and reliability of strains on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of cultures.

Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is also available on our Web site at [www.atcc.org](http://www.atcc.org)

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

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

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

Or contact your local distributor

Page 3 of 3

## **ANEXO 3**

### **MEDIO DE CONGELACIÓN**

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

### **CRIOCONGELACIÓN**

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

### **DESCONGELACIÓN CELULAR**

- Encender cabina de bioseguridad y esterilizar 15 minutos antes de usar, de igual manera el baño maría a  $37^{\circ}\text{C}$
- Tener listo el medio de cultivo RPMI completo e incompleto, el tubo falcón
- Extraer del tanque de nitrógeno líquido el criovial que deseemos con la cantidad conocidas de cel/ml.
- Incubar durante 1 minuto el criovial a  $37^{\circ}\text{C}$  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  $1.5 \times 10^6$  cel/ml y pipetear suavemente para homogenizar la suspensión.
- Pasar el contenido del tubo a una botella de cultivo el cual ya contiene 8ml de medio de cultivo completo y mezclar suavemente.
- Incubar a 37°C al 5% de CO<sub>2</sub>.
- Cambiar el medio de cultivo al día siguiente para eliminar posibles restos de DMSO y células muertas.

#### **ANEXO 4**

### **PROTOCOLO PARA EL ENSAYO DE CITOTOXICIDAD CON EXTRACTO ACUOSO pH NEUTRO EN LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE PULMÓN HUMANO A549 Y LINFOCITOS HUMANOS**

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

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

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

### **EXTRACTO ACUOSO**

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

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

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

## **ANEXO 5**

### **PREPARACIÓN DE CONTROLES POSITIVOS**

#### **CISPLATINO**

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

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

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

## **ANEXO 6**

### **OBTENCIÓN DE LINFOCITOS O CÉLULAS NORMALES**

**TÉCNICA DE FICOLL HYPaque** (técnica de centrifugación por gradiente de densidad para separar Células Mononucleares de Sangre Periférica (CMSP) de otras células de la sangre)

1. Extraer 5ml de sangre venosa en un tubo tapa verde que contiene heparina.

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

## **ANEXO 7**

### **TRIPSINIZACIÓN DE CÉLULAS A549**

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

## ANEXO 8

### COLOCACIÓN DE CÉLULAS EN LOS RESPECTIVOS POCILLOS PARA COLOCAR LAS CÉLULAS EN CADA POCILLO (CÁLCULOS)

#### LÍNEAS CELULARES (Extracto acuoso)

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

## ANEXO 9

### PROLIFERACIÓN CELULAR

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

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

## ANEXO 10

### CONTAJE DE CELULAS CON AZUL DE TRIPANO (VIABILIDAD CELULAR)

1. Se realiza el conteo de las células tanto muertas como vivas para evaluar así de esta manera la viabilidad y citotoxicidad celular.
2. En placas de cultivo de 96 pocillos se colocan 20  $\mu$ l de cada una de las células con los extractos en las diferentes concentraciones, los medicamentos antitumorales, los linfocitos humanos y los controles negativos.
3. Se deben extraer dichas células de manera mecánica frotando los pocillos donde se encuentran incubadas ya que estas células son adherentes y tienden a pegarse al fondo
4. A cada pocillo cargado con células colocar 20  $\mu$ l de azul de tripano y cargar en la cámara de Neubauer para su conteo.
5. Se deben contar los cuatro cuadrantes externos de las esquinas y el valor final se lo multiplica por 10, por 1000 y por 2.
6. Se realiza el mismo procedimiento a las seis horas de su incubación, 12, 24, 48, 60 y 72 horas.

## ANEXO 11



EVALUACIÓN DEL EFECTO INMUNOESTIMULANTE DEL EXTRACTO DE *ANNONA CHERIMOLA*. 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 del interesado:

CERTIFICO:

Que EL Sr. **KLEBER GABRIEL GARROCHAMBA PEÑAFIEL**, estudiante del **VIII MÓDULO** de la Carrera de **LABORATORIO CLÍNICO**, con cédula de identidad 1104899693 realizó sus prácticas en el Laboratorio de Cultivos celulares como parte de su tesis (Ensayos de Citotoxicidad) en el Centro de **BIOTECNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**, los días , 11, 12,13, y 14 de Mayo de 2015, en los horarios de 8H00 a 10H30 y de 16H30 a 18H30

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

Atentamente

Dr. Miguel Marín Gómez Mg, Sc.

**DIRECTOR DEL PROYECTO**



# ANEXO 12) CÁLCULOS CORRESPONDIENTES A LA VIABILIDAD CELULAR OBTENIENDO EL PORCENTAJE DE CÉLULAS VIVAS Y MUERTAS.

## A las 6 Horas de Incubación

Kawler

ENSAYO DE: HOJA DE ANOVA OPERATIVA GRUPO A CUCLOSA ESQUE A CELULAS ANEX 2015 MC NGUYEN

FECHA: 14 de 05 de 2015 HORA: 12:00 RESPONSABLE: Carina Tinoco

6 HORAS <sup>0% 100%</sup> <sup>0% 100%</sup> <sup>0% 100%</sup> <sup>0% 100%</sup> <sup>0% 100%</sup> <sup>100% 0%</sup>

| A549 +EXTRACTO 1               | A549 +EXTRACTO 2              | A549 +EXTRACTO 3              | A549 +CISPLATINO 1             | A549 + CISPLATINO 2            | A549 + CISPLATINO 3          |
|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| V 50<br>M 10<br>80,0%<br>10,0% | V 53<br>M 7<br>89,1%<br>11,0% | V 70<br>M 5<br>93,3%<br>6,7%  | V 72<br>M 10<br>87,8%<br>12,2% | V 66<br>M 12<br>84,6%<br>15,4% | V 67<br>M 6<br>92,3%<br>7,7% |
| V 75<br>M 8<br>86,3%<br>13,7%  | V 50<br>M 6<br>83,3%<br>16,7% | V 69<br>M 4<br>93,8%<br>6,2%  | V 70<br>M 8<br>87,5%<br>12,5%  | V 71<br>M 8<br>89,4%<br>10,6%  | V 83<br>M 7<br>92,6%<br>7,4% |
| V 72<br>M 8<br>90,0%<br>10,0%  | V 67<br>M 8<br>89,3%<br>10,7% | V 33<br>M 7<br>82,3%<br>17,7% | V 63<br>M 7<br>90,3%<br>9,7%   | V 70<br>M 9<br>86,6%<br>13,4%  | V 65<br>M 7<br>90,2%<br>9,8% |
| C.C. = 11,4                    | C.C. = 9,5                    | C.C. = 7,7                    | C.C. = 10,5                    | C.C. = 12,3                    | C.C. = 7,8                   |
| LH + EXTRACTO 1                | LH + EXTRACTO 2               | LH + EXTRACTO 3               | A549+25 uISOLVENTE             | A549CON MC                     |                              |
| V 70<br>M 1<br>96,5%<br>3,5%   | V 53<br>M 1<br>98,1%<br>1,9%  | V 62<br>M 1<br>95,2%<br>4,8%  |                                | V 68<br>M 5<br>93,1%<br>6,9%   |                              |
| V 60<br>M 2<br>96,7%<br>3,3%   | V 71<br>M 0<br>100,0%<br>0,0% | V 56<br>M 1<br>98,2%<br>1,8%  |                                | V 70<br>M 6<br>92,1%<br>7,9%   |                              |
| V 53<br>M 0<br>100,0%<br>0,0%  | V 64<br>M 0<br>100,0%<br>0,0% | V 72<br>M 0<br>100,0%<br>0,0% |                                | V 61<br>M 5<br>92,1%<br>7,9%   |                              |
| C.C. = 4,6                     | C.C. = 0,6                    | C.C. = 1,3                    |                                | C.C. = 7,4                     |                              |

Células: 31.440.000 cel <sup>100%</sup> M: 3,45% <sup>100%</sup> confluencia <sup>100%</sup>

Unifocales: 5.480.000 cel <sup>100%</sup> 0% <sup>100%</sup>

• Agulo Con Fluencia  
• Peso: Alteraciones  
en Morfología y  
 tamaño

## A las 12 Horas de Incubación

12 HORAS

| A549 +EXTRACTO 1                | A549 +EXTRACTO 2               | A549 +EXTRACTO 3               | A549 +CISPLATINO 1              | A549 + CISPLATINO 2             | A549 + CISPLATINO 3            |
|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| V 120<br>M 16<br>88,2%<br>11,8% | V=99<br>M=20<br>83,1%<br>16,9% | V 125<br>M 12<br>91,2%<br>8,8% | V=75<br>M=20<br>78,9%<br>21,1%  | V=20<br>M=16<br>55,5%<br>44,5%  | V 33<br>M 13<br>86,4%<br>13,6% |
| V 131<br>M 18<br>87,9%<br>12,1% | V=88<br>M=15<br>85,4%<br>14,6% | V 75<br>M 6<br>92,5%<br>7,5%   | V 100<br>M 35<br>74,1%<br>25,9% | V=56<br>M=17<br>76,7%<br>23,3%  | V=57<br>M=18<br>76,0%<br>24,0% |
| V=60<br>M=20<br>75,0%<br>25,0%  | V=105<br>M=11<br>90,5%<br>9,5% | V=103<br>M=11<br>90,3%<br>9,7% | V 130<br>M 30<br>81,2%<br>18,8% | V 88<br>M 14<br>86,2%<br>13,8%  | V=58<br>M=10<br>85,2%<br>14,8% |
| C.C. = 12,9                     | C.C. = 7,3                     | C.C. = 8,6                     | C.C. = 24,9                     | C.C. = 27,2                     | C.C. = 77,4                    |
| LH + EXTRACTO 1                 | LH + EXTRACTO 2                | LH + EXTRACTO 3                | A549+25 uISOLVENTE              | A549 CON MC                     |                                |
| V 66<br>M 2<br>97,0%<br>3,0%    | V 60<br>M 1<br>98,3%<br>1,7%   | V 57<br>M 2<br>96,2%<br>3,8%   |                                 | V 21<br>M 14<br>89,6%<br>10,4%  |                                |
| V 68<br>M 3<br>95,7%<br>4,3%    | V 63<br>M 1<br>98,4%<br>1,6%   | V 60<br>M 1<br>98,3%<br>1,7%   |                                 | V 135<br>M 12<br>89,5%<br>10,5% |                                |
| V 45<br>M 2<br>95,7%<br>4,3%    | V 79<br>M 2<br>97,5%<br>2,5%   | V 57<br>M 1<br>98,2%<br>1,8%   |                                 | V 87<br>M 12<br>87,5%<br>12,5%  |                                |
| C.C. = 3,8                      | C.C. = 1,9                     | C.C. = 2,3                     |                                 | C.C. = 11,2                     |                                |

## A las 24 Horas de Incubación

| 24 HORAS                                |  |  |  |   |                                      |
|---|--|--|--|---|--------------------------------------|
| A549 +EXTRACTO 1                        | A549 +EXTRACTO 2                           | A549 +EXTRACTO 3                           | A549 +CISPLATINO 1                     | A549 + CISPLATINO2                      | A549 + CISPLATINO 3                  |
| V=54 58,0%<br>M=39 42%                  | V=46 71,8%<br>M=18 28,2%                   | V=40 64,5%<br>M=22 35,5%                   | V=77 70,8%<br>M=32 29,4%               | V=33 57,8%<br>M=24 42,2%                | V=44 55%<br>M=36 45%                 |
| V=49 75,3%<br>M=16 24,7%                | V=42 67,7%<br>M=20 32,3%                   | V=74 66,0%<br>M=38 34%                     | V=90 78,2%<br>M=25 21,8%               | V=67 68,3%<br>M=31 31,7%                | V=48 70,5%<br>M=20 29,5%             |
| V=74 62,1%<br>M=45 37,9%<br>C.C.= 34,8  | V=46 75,4%<br>M=15 24,6%<br>C.C.= 28,3     | V=44 60,2%<br>M=20 39,8%<br>C.C.= 26,4     | V=90 76,4%<br>M=27 23,1%<br>C.C.= 24,7 | V=58 67,4%<br>M=38 32,6%<br>C.C.= 35,5  | V=59 71,0%<br>M=24 29%<br>C.C.= 34,5 |
| LH + EXTRACTO 1<br>V=53 67%<br>M=26 23% | LH + EXTRACTO 2<br>V=54 85,7%<br>M=9 14,3% | LH + EXTRACTO 3<br>V=33 80,4%<br>M=8 19,6% | A549+25 uISOLVENTE                     | A549 CON MC<br>V=44 72,1%<br>M=17 27,9% |                                      |
| V=66 82,5%<br>M=14 17,5%                | V=47 87%<br>M=7 13%                        | V=50 93,3%<br>M=10 16,7%                   | X                                      | V=42 69,3%<br>M=20 30,6%                |                                      |
| V=67 89,3%<br>M=8 10,7%<br>C.C.= 17,0   | V=56 77,7%<br>M=16 22,3%<br>C.C.= 16,5     | V=52 77,6%<br>M=15 22,4%<br>C.C.= 6,5      | X                                      | V=57 74%<br>M=20 26%<br>C.C.= 28,1      |                                      |

## A las 36 Horas de Incubación

| 36 HORAS                                    |  |   |  |   |                                     |
|---|--|---|--|---|-------------------------------------|
| A549 +EXTRACTO 1                            | A549 +EXTRACTO 2                           | A549 +EXTRACTO 3                          | A549 +CISPLATINO 1                     | A549 + CISPLATINO2                      | A549 + CISPLATINO 3                 |
| V 68 62,3%<br>M 41 37,7%                    | V 57 74%<br>M 20 26%                       | V 70 70,7%<br>M 29 29,3%                  | V 52 48,5%<br>M 55 51,5%               | V 50 66,6%<br>M 25 33,4%                | V 70 76,9%<br>M 21 23,1%            |
| V 102 63,3%<br>M 59 36,7%                   | V 95 83,3%<br>M 19 16,7%                   | V 69 82,1%<br>M 15 17,9%                  | V 69 51,1%<br>M 66 48,9%               | V 77 65,8%<br>M 40 34,2%                | V 62 71,2%<br>M 25 28,8%            |
| V 78 66,1%<br>M 40 33,9%<br>C.C.= 36,1      | V 74 72,5%<br>M 28 27,5%<br>C.C.= 23,4     | V 78 72,2%<br>M 30 27,8%<br>C.C.= 15,7    | V 72 48,9%<br>M 75 51,1%<br>C.C.= 50,5 | V 63 67%<br>M 37 33%<br>C.C.= 33,5      | V 65 73%<br>M 24 27%<br>C.C.= 126,3 |
| LH + EXTRACTO 1<br>V 59 79,7%<br>M 15 20,3% | LH + EXTRACTO 2<br>V 49 84,4%<br>M 9 15,6% | LH + EXTRACTO 3<br>V 59 90,7%<br>M 6 9,3% | A549+25 uISOLVENTE                     | A549 CON MC<br>V 34 78,3%<br>M 26 21,7% |                                     |
| V 61 81,3%<br>M 14 18,7%                    | V 67 52,7%<br>M 6 47,3%                    | V 66 94,2%<br>M 4 5,8%                    | ~                                      | V 84 77%<br>M 25 23%                    |                                     |
| V 50 75,7%<br>M 16 24,3%<br>C.C.= 24,1      | V 52 89,6%<br>M 6 10,4%<br>C.C.= 24,4      | V 55 91,6%<br>M 5 8,4%<br>C.C.= 7,8       |  | V 96 82,7%<br>M 20 17,3%<br>C.C.= 20,6  |                                     |

62,3%
74%
70,7%
48,5%
66,6%
76,9%

37,7%
26%
29,3%
51,5%
33,4%
23,1%

36,7%
16,7%
17,9%
48,9%
34,2%
28,8%

33,9%
27,5%
27,8%
51,1%
33%
27%

20,3%
15,6%
9,3%
78,3%
21,7%

18,7%
47,3%
5,8%
77%
23%

24,3%
10,4%
8,4%
82,7%
17,3%

24,1
24,4
7,8
50,5
33,5
126,3

↓
no hay
confluencia
78,7%

## A las 48 Horas de Incubación

| 48 HORAS                                     |  |  |  |   |   |
|--|--|--|--|---|---|
| A549 +EXTRACTO 1<br>V=16 55.1%<br>M=13 44.9% | A549 +EXTRACTO 2<br>V=23 69.7%<br>M=36 30.3% | A549 +EXTRACTO 3<br>V=16 34.7%<br>M=30 65.3% | A549 +CISPLATINO 1<br>V=32 29.3%<br>M=77 70.7% | A549 + CISPLATINO 2<br>V=42 46.6%<br>M=48 53.4% | A549 + CISPLATINO 3<br>V=28 48.2%<br>M=30 51.8% |
| V=35 68.6%<br>M=16 31.4%                     | V=30 69.4%<br>M=22 30.6%                     | V=19 55.8%<br>M=15 44.2%                     | V=34 35%<br>M=63 65%                           | V=30 60%<br>M=20 40%                            | V=15 57.6%<br>M=11 42.4%                        |
| V=54 76%<br>M=17 24%                         | V=43 68.2%<br>M=20 31.8%                     | V=50 65.7%<br>M=26 34.3%                     | V=32 31.3%<br>M=70 68.7%                       | V=33 75%<br>M=11 25%                            | V=33 60%<br>M=22 40%                            |
| C.C. = 34.4                                  | C.C. = 30.9                                  | C.C. = 47.9                                  | C.C. = 62.1                                    | C.C. = 39.4                                     | C.C. = 44.7                                     |
| LH + EXTRACTO 1<br>V=25 69.4%<br>M=11 30.6%  | LH + EXTRACTO 2<br>V=25 75.7%<br>M=8 25.3%   | LH + EXTRACTO 3<br>V=41 83.6%<br>M=8 16.4%   | A549+25 uISOLVENTE<br>X                        | A549 CON MC<br>V=109 66.4%<br>M=55 33.6%        |   |
| V=41 74.5%<br>M=14 25.5%                     | V=44 88%<br>M=6 12%                          | V=24 82.7%<br>M=5 17.3%                      | X  | V=40 66.6%<br>M=20 33.3%                        |   |
| V=28 84.8%<br>M=5 15.2                       | V=53 92.9%<br>M=4 7.1%                       | V=41 77.3%<br>M=12 22.7%                     | X  | V=44 63.7%<br>M=25 36.3%                        |   |
| C.C. = 23.7                                  | C.C. = 14.8                                  | C.C. = 18.8                                  |  | C.C. = 35.0                                     |   |

6

## A las 60 Horas de Incubación

| 60 HORAS                                     |  |  |  |   |   |
|--|--|--|--|---|---|
| A549 +EXTRACTO 1<br>V 50 58.8%<br>M 35 41.2% | A549 +EXTRACTO 2<br>V 61 73.4%<br>M 22 26.6% | A549 +EXTRACTO 3<br>V 90 73.1%<br>M 33 26.9% | A549 +CISPLATINO 1<br>V 25 23.3%<br>M 82 76.7% | A549 + CISPLATINO 2<br>V 54 59.3%<br>M 37 40.7% | A549 + CISPLATINO 3<br>V 87 62.5%<br>M 52 37.5% |
| V 66 64.7%<br>M 36 35.3%                     | V 56 65.1%<br>M 30 34.9%                     | V 85 75.8%<br>M 27 24.2%                     | V 29 23.3%<br>M 95 76.7%                       | V 55 57.8%<br>M 40 42.2%                        | V 73 64.6%<br>M 40 35.4%                        |
| V 65 59.6%<br>M 44 40.4%                     | V 65 63.7%<br>M 37 36.3%                     | V 56 69.1%<br>M 25 30.9%                     | V 20 18.5%<br>M 88 81.5%                       | V 59 62.7%<br>M 35 37.3%                        | V 68 61.8%<br>M 50 38.2%                        |
| C.C. = 38.9                                  | C.C. = 32.6                                  | C.C. = 27.3                                  | C.C. = 78.3                                    | C.C. = 40.0                                     | C.C. = 37.0                                     |
| LH + EXTRACTO 1<br>V 40 66.6%<br>M 20 33.4%  | LH + EXTRACTO 2<br>V 49 76.5%<br>M 15 23.5%  | LH + EXTRACTO 3<br>V 52 89.6%<br>M 6 10.4%   | A549+25 uISOLVENTE<br>X                        | A549 CON MC<br>V 26 82.7%<br>M 20 17.3%         |   |
| V 36 70.5%<br>M 15 29.5%                     | V 40 76.9%<br>M 12 23.1%                     | V 42 85.7%<br>M 7 14.3%                      |  | V 79 78.2%<br>M 22 21.8%                        |   |
| V 48 70.5%<br>M 20 29.5%                     | V 55 83.3%<br>M 11 16.7%                     | V 46 82.1%<br>M 10 17.9%                     |  | V 69 76.6%<br>M 21 23.4%                        |   |
| C.C. = 30.8                                  | C.C. = 27.7                                  | C.C. = 44.2                                  |  | C.C. = 20.0                                     |   |



## A las 72 Horas de Incubación

| 72 HORAS                         |                | 30%                              |                | 50%                              |                | 45,4%                              |                | 14,4%                              |                          | 32,8%                              |                | 51,5%    |  |
|----------------------------------|----------------|----------------------------------|----------------|----------------------------------|----------------|------------------------------------|----------------|------------------------------------|--------------------------|------------------------------------|----------------|----------|--|
| AS43                             |                | AS49                             |                | AS49                             |                | AS49+CSF                           |                | AS49+CSF                           |                          | AS49+CSF                           |                | AS49+CSF |  |
| RKO + EXTRACTO 1<br>V=16<br>M=25 | 34%<br>61%     | RKO + EXTRACTO 2<br>V=20<br>M=20 | 50%<br>30%     | RKO + EXTRACTO 3<br>V=47<br>M=48 | 49%<br>50,6%   | RKO + FLUORACILO 1<br>V=16<br>M=25 | 14%<br>85,6%   | RKO + FLUORACILO 2<br>V=26<br>M=41 | 38,8%<br>61,2%           | RKO + FLUORACILO 3<br>V=50<br>M=47 | 51,5%<br>48,5% |          |  |
| M=25                             | 48%<br>52%     | V=15<br>M=22                     | 35,7%<br>64,3% | V=36<br>M=32                     | 52,9%<br>47,1% | V=28<br>M=107                      | 20,7%<br>79,3% | V=47<br>M=30                       | 61%<br>39%               | V=26<br>M=31                       | 45,6%<br>54,4% |          |  |
| V=14<br>M=24                     | 36,8%<br>63,2% | V=47<br>M=40                     | 51%<br>46%     | V=28<br>M=37                     | 43%<br>57%     | V=17<br>M=116                      | 12,7%<br>87,3% | V=34<br>M=33                       | 50,7%<br>49,3%           | V=36<br>M=53                       | 40,4%<br>59,6% |          |  |
| C.C. = 158,7                     |                | C.C. = 153,4                     |                | C.C. = 151,5                     |                | C.C. = 184,0                       |                | C.C. = 149,8                       |                          | C.C. = 154,7                       |                |          |  |
| LH + EXTRACTO 1<br>V=27<br>M=9   | 75%<br>25%     | LH + EXTRACTO 2<br>V=26<br>M=10  | 72,2%<br>27,8% | LH + EXTRACTO 3<br>V=20<br>M=10  | 70,0%<br>33,4% | RKO + 25 ul SOLVENTE<br>AS49       | ✓              | RKO CON MC<br>AS49                 | V 52 70,2%<br>M 22 29,8% |                                    |                |          |  |
| V=27<br>M=13                     | 67,5%<br>32,5% | V=24<br>M=16                     | 60%<br>40%     | V=24<br>M=10                     | 70,5%<br>29,5% |                                    | ✓              | V 47 65,2%<br>M 25 34,8%           |                          |                                    |                |          |  |
| V=28<br>M=12                     | 70%<br>30%     | V=31<br>M=13                     | 70,4%<br>29,6% | V 30<br>M 8                      | 78,9%<br>21,1% |                                    | ✓              | V 48 72,7%<br>M 18 27,3%           |                          |                                    |                |          |  |
| C.C. = 129,1                     |                | C.C. = 132,4                     |                | C.C. = 128                       |                |                                    |                | C.C. = 130,6                       |                          |                                    |                |          |  |
|                                  |                | no hay.                          |                |                                  |                |                                    |                | 70,2%                              |                          |                                    |                |          |  |

**ANEXO 13**

**GRADO DE PROLIFERACIÓN CELULAR**

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

**6 HORAS**

| <b>A549 +<br/>EXTRAC<br/>TO 1</b> | <b>A549 +<br/>EXTRAC<br/>TO 2</b> | <b>A549 +<br/>EXTRAC<br/>TO 3</b> | <b>A549 +<br/>CISPLATI<br/>NO 1</b> | <b>A549 +<br/>CISPLATI<br/>NO 2</b> | <b>A549 +<br/>CISPLATI<br/>NO 3</b> |
|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Confluencia:</b><br>0%         | <b>Confluencia:</b><br>0%         | <b>Confluencia:</b><br>0%         | <b>Confluencia:</b><br>0%           | <b>Confluencia:</b><br>0%           | <b>Confluencia:</b><br>0%           |
| <b>A549 + MC</b>                  |                                   |                                   |                                     |                                     |                                     |
| <b>Confluencia:</b><br>0%         |                                   |                                   |                                     |                                     |                                     |

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

**36 HORAS**

| <b>A549 +<br/>EXTRAC<br/>TO 1</b> | <b>A549 +<br/>EXTRAC<br/>TO 2</b> | <b>A549 +<br/>EXTRAC<br/>TO 3</b> | <b>A549 +<br/>CISPLATI<br/>NO 1</b> | <b>A549 +<br/>CISPLATI<br/>NO 2</b> | <b>A549 +<br/>CISPLATI<br/>NO 3</b> |
|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Confluencia:</b><br>62,3 %     | <b>Confluencia:</b><br>74,0 %     | <b>Confluencia:</b><br>70,7 %     | <b>Confluencia:</b><br>48,5 %       | <b>Confluencia:</b><br>66,6 %       | <b>Confluencia:</b><br>76,9 %       |
| <b>A549 + MC</b>                  |                                   |                                   |                                     |                                     |                                     |
| <b>Confluencia:</b><br>78,3 %     |                                   |                                   |                                     |                                     |                                     |

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

72 HORAS

| <b>A549 +<br/>EXTRAC<br/>TO 1</b> | <b>A549 +<br/>EXTRAC<br/>TO 2</b> | <b>A549 +<br/>EXTRAC<br/>TO 3</b> | <b>A549 +<br/>CISPLATI<br/>NO 1</b> | <b>A549 +<br/>CISPLATI<br/>NO 2</b> | <b>A549 +<br/>CISPLATI<br/>NO 3</b> |
|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Confluencia:</b><br>39 %       | <b>Confluencia:</b><br>50 %       | <b>Confluencia:</b><br>49,4 %     | <b>Confluencia:</b><br>14,4 %       | <b>Confluencia:</b><br>38,8 %       | <b>Confluencia:</b><br>51,5 %       |
| <b>A549 + MC</b>                  |                                   |                                   |                                     |                                     |                                     |
| <b>Confluencia:</b><br>70,2 %     |                                   |                                   |                                     |                                     |                                     |

## ANEXO 14

### PRUEBAS DE SIGNIFICANCIA MEDIANTE EL PROGRAMA DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO (SAS)

EXTRACTO + A549

Adeva

| Factor de varianza | G.L. | Suma de cuadrados | CMe Cuadrado medio del error | F calculado | F tabular |
|--------------------|------|-------------------|------------------------------|-------------|-----------|
| Tratamientos       | 27   | 15463.62005       | 572.72667                    | 22.94       | 1.72      |
| Repeticiones       | 2    | 36.04192          | 18.02096                     | 0.72        | 0.4906    |
| Error Experimental | 54   | 1323.18301        | 24.96572                     |             |           |
| Error total:       | 83   | 16822.84499       |                              | -3          |           |

| R-cuadrado | C.V.     | Raíz MSE | Media Resultados |
|------------|----------|----------|------------------|
| 0.921346   | 18.30706 | 4.996571 | 27.29313         |

Duncan's

|       |      |
|-------|------|
| Alpha | 0.05 |
|-------|------|

T students

Análisis de variables

| Media     | F calculado | F tabular |
|-----------|-------------|-----------|
| 5.5000000 | 3.33        | 2.16      |

## EXTRACTO + CISPLATINO

### ADEVA

| Factor de varianza | G.L. | Suma de cuadrados | CMe Cuadrado medio del error | F calculado | F tabular |
|--------------------|------|-------------------|------------------------------|-------------|-----------|
| Tratamientos       | 27   | 31558.72988       | 1168.84185                   | 38.89       | 1.72      |
| Repeticiones       | 2    | 253.58310         | 126.79155                    | 4.22        | 0.0199    |
| Error Experimental | 54   | 1623.15690        | 30.05846                     |             |           |
| Error total:       | 83   | 33435.46988       |                              |             |           |

| R-cuadrado | C.V.     | Raíz MSE | Media Resultados |
|------------|----------|----------|------------------|
| 0.951454   | 15.75502 | 5.482560 | 34.79881         |

### Duncan's

|       |      |
|-------|------|
| Alpha | 0.05 |
|-------|------|

### T students

#### Análisis de variables

| Media      | F calculado | F tabular |
|------------|-------------|-----------|
| 16.3571429 | 2.62        | 2.16      |



**EXTRACTO + LINFOCITOS****ADEVA**

| <b>Factor de varianza</b> | <b>G.L.</b> | <b>Suma de cuadrados</b> | <b>CMe Cuadrado medio del error</b> | <b>F calculado</b> | <b>F tabular</b> |
|---------------------------|-------------|--------------------------|-------------------------------------|--------------------|------------------|
| <b>Tratamientos</b>       | 27          | 10475.89586              | 387.99603                           | 35.85              | 1.72             |
| <b>Repeticiones</b>       | 2           | 24.58167                 | 12.29083                            | 1.14               | 0.4906           |
| <b>Error Experimental</b> | 54          | 584.44500                | 10.82306                            |                    |                  |
| <b>Error total:</b>       | 83          | 11084.91952              |                                     |                    |                  |

| <b>R-cuadrado</b> | <b>C.V.</b> | <b>Raíz MSE</b> | <b>Media Resultados</b> |
|-------------------|-------------|-----------------|-------------------------|
| 0.947276          | 17.62190    | 3.289841        | 18.66905                |

**Duncan 's**

|              |      |
|--------------|------|
| <b>Alpha</b> | 0.05 |
|--------------|------|

**T students****Análisis de variables**

| <b>Media</b> | <b>F calculado</b> | <b>F tabular</b> |
|--------------|--------------------|------------------|
| -6.8285714   | -5.50              | 2.16             |

## ANEXO 15

### MATERIAL DE EVIDENCIA INVESTIGATIVA

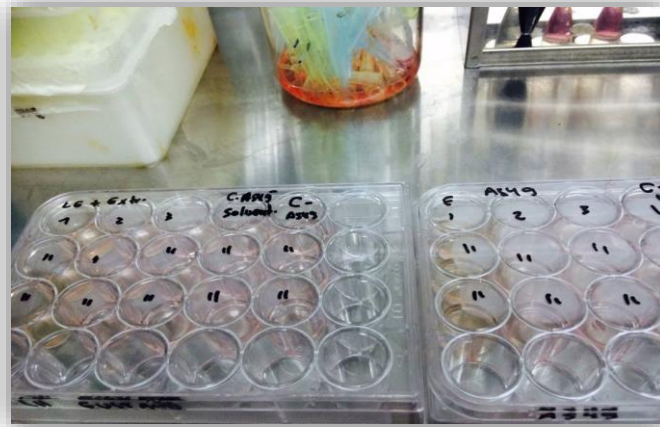
#### DISECADO DE HOJAS DE *Annona cherimola*



#### TRITURADO DE HOJAS DE *Annona cherimola*



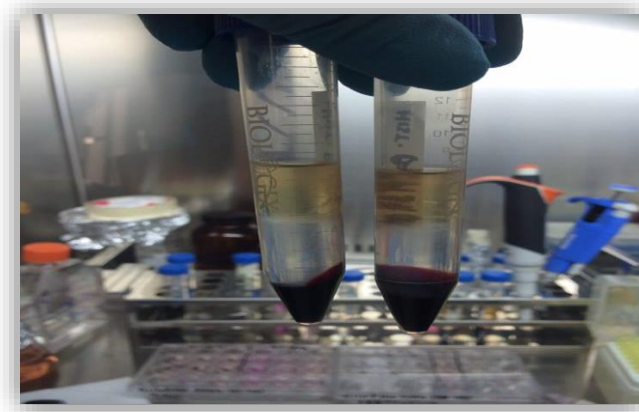
## PROCEDIMIENTO DE PIPETEO POR TRIPLICADO PARA EXTRACTO, CISPLATINO Y LINFOCITOS



## TRIPSINIZACIÓN DE CÉLULAS



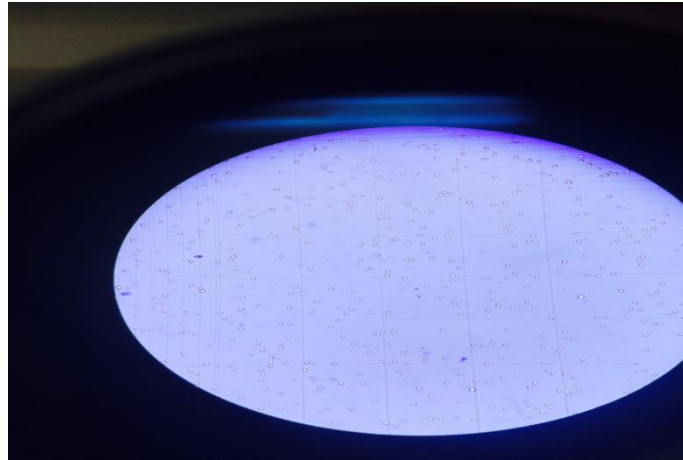
## SEPARACIÓN DE LINFOCITOS HUMANOS: TÉCNICA DE FICOLL HYPAQUE



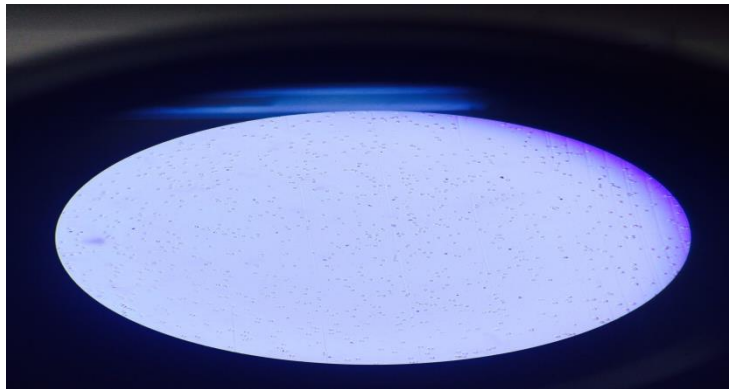
## CONTAJE CELULAR EN CÁMARA DE NEUBAUER



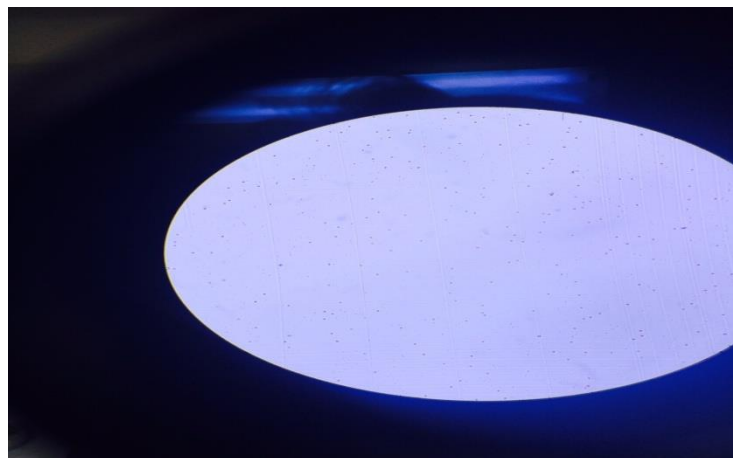
**OBSERVACIÓN DE CÉLULAS A549 EN MICROSCOPIO DE INVERSIÓN**



**OBSERVACIÓN DE CÉLULAS A4549 CON AZUL DE TRIPANO  
(CITOTOXICIDAD CELULAR)**

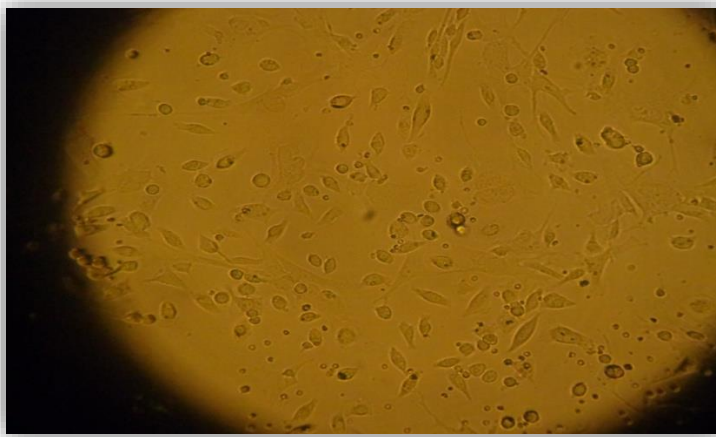
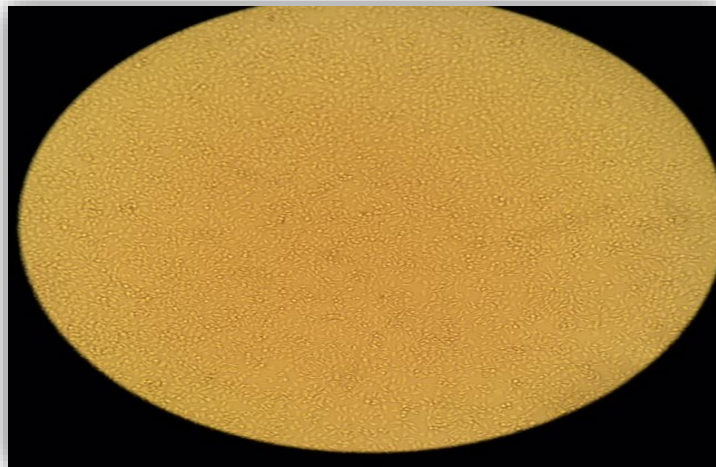


**OBSERVACIÓN DE LINFOCITOS**





## PROLIFERACIÓN CELULAR: CONFLUENCIA



## ÍNDICE

### CONTENIDO PÁGINA

|  |     |
|--|-----|
| Portada.....   | I   |
| Certificación.....                                   | II  |
| Autoría.....   | III |
| Carta de Autorización de Tesis.....                  | IV  |
| Agradecimiento.....                                  | V   |
| Dedicatoria.....                                     | VI  |
| Agradecimiento.....                                  | VI  |
| 1. Título.....                                       | 1   |
| 2. Resumen.....                                      | 2   |
| Summary.....   | 3   |
| 3. Introducción.....                                 | 4   |
| 4. Revisión de Literatura.....                       | 6   |
| 4.1 Los Pulmones.....                                | 6   |
| 4.2 Cáncer.....                                      | 6   |
| 4.2.1 Cáncer de pulmón.....                          | 6   |
| 4.2.2 Factores de riesgo.....                        | 6   |
| 4.2.3 Tipos de cáncer de pulmón .....                | 7   |
| 4.2.3.1 Cáncer de pulmón de células no pequeñas..... | 7   |
| 4.2.3.2 Carcinoma de células escamosas.....          | 7   |
| 4.2.3.3 Adenocarcinoma.....                          | 7   |
| 4.2.3.4 Carcinoma de células grandes.....            | 7   |
| 4.2.3.5 Cáncer de pulmón de células pequeñas.....    | 7   |
| 4.3 Planta medicinal.....                            | 8   |
| 4.4 Droga.....                                       | 8   |
| 4.5 Principio activo.....                            | 8   |
| 4.6 Medicamento.....                                 | 8   |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>4.7 Cisplatino.....</b>  | <b>8</b>  |
| <b>4.8 Anonáceas.....</b>   | <b>9</b>  |
| <b>4.8.1 <i>Annona cherimola</i>.....</b>                         | <b>9</b>  |
| <b>4.8.2 Aplicación médica.....</b>                               | <b>9</b>  |
| <b>4.8.3 Acetogeninas.....</b>                                    | <b>9</b>  |
| <b>4.8.4 Alcaloides.....</b>                                      | <b>10</b> |
| <b>4.8.5 Citotoxicidad celular.....</b>                           | <b>10</b> |
| <b>4.9 Extracto.....</b>  | <b>10</b> |
| <b>4.9.1 Extracto acuoso.....</b>                                 | <b>11</b> |
| <b>4.10 pH.....</b>   | <b>11</b> |
| <b>4.10.1 pH neutro.....</b>                                      | <b>11</b> |
| <b>4.11 Cultivo celular.....</b>                                  | <b>11</b> |
| <b>4.11.1 Incubación de medios de cultivo celular.....</b>        | <b>12</b> |
| <b>4.11.2 Tipos de cultivo celular.....</b>                       | <b>12</b> |
| <b>4.11.3 Cultivo primario.....</b>                               | <b>12</b> |
| <b>4.11.3.1 Líneas celulares.....</b>                             | <b>12</b> |
| <b>4.11.3.2 Líneas celulares diploides.....</b>                   | <b>12</b> |
| <b>4.11.3.3 Heteroploides o continuas.....</b>                    | <b>13</b> |
| <b>4.12 Células linfoides.....</b>                                | <b>13</b> |
| <b>4.12.1 Obtención de células linfoides.....</b>                 | <b>13</b> |
| <b>4.13 Cepas celulares.....</b>                                  | <b>13</b> |
| <b>4.14 Tipos de crecimiento celular.....</b>                     | <b>14</b> |
| <b>4.14.1 Células adherentes o cultivos fijos.....</b>            | <b>14</b> |
| <b>4.14.2 Células no adherentes o cultivos en suspensión.....</b> | <b>14</b> |
| <b>4.15 Factores básicos para la supervivencia celular.....</b>   | <b>14</b> |
| <b>4.16 Medios de cultivo.....</b>                                | <b>14</b> |
| <b>4.17 Medio de cultivo celular rpmi.....</b>                    | <b>14</b> |
| <b>4.18 Clasificación de medios de cultivo.....</b>               | <b>15</b> |
| <b>4.18.1 Medio esencial mínimo.....</b>                          | <b>15</b> |



|  |    |
|--|----|
| 4.18.2 Medios de crecimiento.....          | 15 |
| 4.18.3 Medios de mantenimiento.....        | 15 |
| 4.18.4 Medios selectivos.....              | 15 |
| 4.18.5 Medios de congelación.....          | 15 |
| 4.19 Criopreservación.....                 | 15 |
| 4.20 Viabilidad celular.....               | 16 |
| 4.21 Proliferación celular.....            | 16 |
| 5. Técnicas, métodos y procedimientos..... | 18 |
| 5.1 Fase Preanalítica.....                 | 18 |
| 5.2 Fase Analítica.....                    | 18 |
| 5.3 Fase Postanalítica.....                | 19 |
| 6. Resultados.....                         | 20 |
| 7. Discusión.....                          | 31 |
| 8. Conclusiones.....                       | 34 |
| 9. Recomendaciones.....                    | 35 |
| 10. Bibliografía.....                      | 36 |
| Anexos.....                                | 40 |