



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
ÁREA DE LA SALUD HUMANA
LABORATORIO CLÍNICO

TÍTULO:

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

AUTOR:

Tesis Previa a la Obtención
del Título de Licenciado En
Laboratorio Clínico.

Cristian Augusto Loján Delgado

DIRECTOR:

Lic. Ángel Heriberto Iñiguez Gordillo

LOJA - ECUADOR

2015

CERTIFICACIÓN

Lic. Ángel Heriberto Iñiguez Gordillo

DIRECTOR DE TESIS

Que el trabajo de investigación titulado, EFECTO CITOTÓXICO DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO DE LAS HOJAS DE *Annona cherimola* EN UNA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE PULMÓN HUMANO EN UN MEDIO DE CULTIVO CON pH ÁCIDO presentado por el Sr. Cristian Augusto Loján Delgado, previo a optar el grado de Lic. en Laboratorio Clínico, ha sido elaborado bajo mi dirección y una vez revisado autorizo su presentación ante el tribunal correspondiente.

Loja, 04 de Diciembre del 2015

Atentamente.



Lic. Ángel Heriberto Iñiguez Gordillo

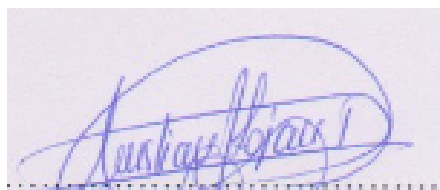
DIRECTOR DE TESIS

AUTORÍA

Yo, Cristian Augusto Loján Delgado, 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 CLOROFÓRMICO DE LAS HOJAS DE *Annona cherimola* EN UNA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE PULMÓN HUMANO EN UN MEDIO DE CULTIVO CON pH ÁCIDO, y eximo 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 del 2015



Cristian Augusto Loján Delgado

C.I: 1105172876

Autor

CARTA DE AUTORIZACIÓN

Yo, Cristian Augusto Loján Delgado, declaro ser autor de la tesis titulada **EFEECTO CITOTÓXICO DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO DE LAS HOJAS DE *Annona cherimola* EN UNA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE PULMÓN HUMANO EN UN MEDIO DE CULTIVO CON pH ÁCIDO** 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 en su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional.

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

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

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los 04 días del mes de Diciembre del dos mil quince, firma autor.

Firma:



Autor: Cristian Augusto Loján Delgado

Cedula: 1105172876

Correo Electrónico: chestercald.22@hotmail.com

Teléfono: 0967791931

Dirección: El Pedestal “Barrio El Dorado”

DATOS COMPLEMENTARIOS

Director de tesis: Lic. Ángel Heriberto Iñiguez Gordillo

Tribunal de Grado:

- Dra. Paola Mercedes Benítez Castrillon, Mg. Sc
- Dra. Maricela del Rosario López Morocho, Mg. Sc
- Dra. Mariela Alexandra Idrovo Vallejo, Mg. Sc

DEDICATORIA

Dedico de todo corazón a mi **Dios** quien fue la persona que me guio por el camino del bien, a seguir siempre adelante y no darme por rendido en ningún momento gracias a él estoy a punto de cumplir un sueño y que este se convierta en realidad.

A mi familia a quienes por ellos soy lo que soy.

Para mis padres **Augusto** y **Carmita** a quienes dedico este trabajo, ya que su gran esfuerzo, apoyo y confianza en mí, me dieron las fuerzas suficientes para seguir adelante gracias a ellos estoy redactando estas palabras que salieron de lo más profundo de mi corazón y decirles que me están regalando el mejor de todos los regalos que es el estudio.

¡Gracias a ustedes!

El autor.

AGRADECIMIENTO

Agradezco intensamente a la Universidad Nacional de Loja, Área de la Salud Humana, a los docentes de la Carrera de Laboratorio Clínico que con sus sabias enseñanzas día a día fueron amplificando mis conocimientos, al “Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja” a mis familiares, amigos y compañeros quienes fueron artífices en el desarrollo de mi trabajo investigativo.

Especialmente agradezco a mi asesor y director de tesis Lic. Ángel Heriberto Iñiguez Gordillo quien me supo guiar brindándome sus conocimientos, tiempo y su buena voluntad en el asesoramiento de mi trabajo que hoy lo presento para su estudio y análisis final.

Agradezco a todos, sin su ayuda no hubiese podido culminar la Carrera con la meta que me trace y con el sacrificio, dedicación y mucho esfuerzo la pude cumplir.

Cristian Augusto Loján Delgado

1. TÍTULO

**EFFECTO CITOTÓXICO DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO DE LAS HOJAS DE
Annona cherimola EN UNA LINEA CELULAR DE CÁNCER DE PULMÓN HUMANO
EN UN MEDIO DE CULTIVO CON pH ÁCIDO.**

2. RESUMEN

El cáncer de pulmón es un tumor maligno que se desarrolla a partir de células pulmonares y bronquiales que consiste en un crecimiento descontrolado de células anormales en el organismo que dañan tejidos y órganos. Algunos de estos agentes, denominados carcinógenos por ejemplo la nicotina sustancias que contiene el tabaco actúan sobre el organismo y producen un daño a la célula sana. Al tratarse de un problema de salud se consideró la necesidad de realizar el presente estudio denominado: “EFECTO CITOTÓXICO DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO DE LAS HOJAS DE *Annona cherimola* EN UNA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE PULMÓN HUMANO EN UN MEDIO DE CULTIVO CON PH ÁCIDO” y tiene como objetivo verificar la actividad citotóxica del extracto clorofórmico con pH ácido de las hojas de *Annona cherimola* frente a líneas de cáncer de pulmón. El estudio de la presente investigación fue de tipo Experimental – Prospectivo, y la línea celular utilizada fue la A549 de cáncer de pulmón. La investigación se la realizó en la ciudad de Loja, en los Laboratorios de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja. Las técnicas utilizadas para identificar el efecto citotóxico del extracto clorofórmico fueron la proliferación celular y la viabilidad celular. Se concluyó en el presente trabajo investigativo que se produjo un 85.5% de muerte celular con el extracto clorofórmico el cual nos indica que elimina una gran cantidad de células cancerígenas.

Palabras claves: *Cáncer de Pulmón 549. Extracto Clorofórmico*

SUMMARY

Lung cancer is a malignant tumor that develops from lung and bronchial cells is uncontrolled growth of abnormal cells in the body tissues and organs That damage. Some of These agents, called carcinogenic substances: such as nicotine in snuff act on the body and cause damage to the healthy cell. As a health problem the need Considered For This study was called "Cytotoxic effect of chloroform extract from the leaves of *Annona cherimola* in a cell line of human lung cancer in a culture medium at acid pH" and Its Intended to verify the cytotoxic activity of the With chloroform extract Annona acid pH leaves Against cherimola lung cancer lines. The study of esta research will be of Experimental Design - Prospective, and the cell line is the A549 lung cancer, the research was Conducted in the city of Loja, in the Laboratory of Biotechnology of the National University of Loja. The techniques used to Identify the cytotoxic effect of the chloroform extract Were cell proliferation and cell viability. It was Concluded That the present research work presents a score of 85.5% cell death With the chloroform extract Which Indicates That Eliminates a lot of cancer cells.

Keywords: *Lung Cancer 549. Chloroform Extrac*

3. INTRODUCCIÓN

El cáncer de pulmón es una enfermedad mortal cuando se diagnostica en estadios clínicos avanzados. Este tipo de cáncer se forma en los tejidos de estos órganos, por lo general en las células que recubren las vías respiratorias. Entre los factores de riesgo que incrementan las probabilidades de padecer cáncer de pulmón tenemos el tabaco asociado con el 90% de los diagnósticos, la exposición con determinadas sustancias químicas como el asbesto petróleo, níquel y radón, los factores genéticos con antecedentes familiares aumenta la probabilidad de desarrollar un cáncer de pulmón (Dolores I., Sánchez J. 2011).

Ante esta situación se está haciendo uso de plantas medicinales vegetales que poseen sustancias que pueden ser utilizadas con finalidades terapéuticas o que sean precursores de fármacos semisintéticas. A nivel oncológico, las plantas medicinales se emplean para evitar y aliviar los efectos secundarios de los tratamientos convencionales y de la propia enfermedad, como para potenciar sus efectos terapéuticos y como agentes antitumorales complementarios (Vanini, M., Barbieri, L., Heck, M., Schwartz, E. 2011).

El uso de drogas vegetales es uno de los recursos a los que acceden los pacientes en tratamiento oncológico, intentando ayudar el tratamiento convencional en la lucha contra la enfermedad. Los pacientes con diagnóstico de cáncer, la industria farmacéutica internacional ha abierto una novedosa línea de productos, basada en extractos estandarizados de especies vegetales (el contenido de principio activo del extracto ha sido analizado y cuantificado). Esta tendencia, responde a la búsqueda de medicamentos naturales por parte de los consumidores. Hoy en día, se puede palpar un compromiso creciente en cuanto a la investigación, el desarrollo, la innovación, la producción y comercialización de medicamentos basados en los extractos estandarizados de especies vegetales: fitoterapia (Buisan P. 2012).

Desde hace aproximadamente dos décadas se ha observado un especial interés por el empleo de plantas medicinales en los países desarrollados del mundo occidental. Por ejemplo, en los últimos años, la prevención del cáncer y enfermedades cardiovasculares se ha asociado con la ingestión de frutas frescas, vegetales o infusiones ricas en antioxidantes naturales. Existe una gran cantidad de estudios que sugieren que una mayor ingesta de dichos compuestos se asocia

con un menor riesgo de mortalidad por estas enfermedades como la hipertensión arterial, la aterosclerosis y la diabetes mellitus (Vanini, M., Barbieri, L., Heck, M., Schwartz, E. 2011).

Los fitomedicamentos son productos elaborados con el fin de curar, tratar enfermedades y cuyos ingredientes principales están constituidos principalmente por extractos de origen vegetal previamente elaborados y estandarizados es por ello que se realiza el siguiente estudio de verificar la actividad citotóxica del extracto clorofórmico de las hojas de *Annona cherimola* en una línea celular de cáncer de pulmón humano en un medio de cultivo con pH ácido. El estudio de la presente investigación es de tipo Experimental – Prospectivo, y la línea celular es la A549 de cáncer de pulmón, la investigación se la realizo en la ciudad de Loja, en los Laboratorios de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja. Las técnicas utilizadas para identificar el efecto citotóxico del extracto clorofórmico fueron la proliferación celular y la viabilidad celular además se realizo protocolos como: preparación del medio de cultivo RPMI completo, medio de congelación, Criocongelación, Tripsinización de las células (subcultivos), Descongelación celular y estudio de las células frente al cisplatino. Los resultados obtenidos nos indican que el extracto clorofórmico concentrado elimina mayor cantidad de células anormales en un 85.4% en un tiempo de 72 horas.

En un intento por detener el crecimiento anormal de las células cancerígenas hemos estado realizando estudios químicos basados en plantas como es el caso de la *Annona Cherimola* ya que presenta sustancias bioactivas como las acetogeninas que son de interés biológico en la apoptosis celular de células cancerígenas, es por ello que el presente trabajo investigativo tiene como finalidad investigar las hojas de *annona cherimola* para la eliminación de las células cancerígenas que afectan al ser humano ya que ciertos tratamientos como la quimioterapia elimina células cancerígenas y células normales del individuo provocando efectos adversos en el paciente.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Medicina Tradicional

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la medicina tradicional como la suma total del conocimiento, habilidades y prácticas basadas en la teorías, creencias y en las experiencias indígenas en diversas culturas las cuales sean susceptibles de explicación o no, utilizadas en el manteniendo de la salud, así como la prevención y la mejora en el tratamiento de la enfermedad física o mental (Rojas M. 2010).

La Medicina Tradicional ha desempeñado un papel importante en el tratamiento de diversas patologías, fundamentalmente en los países en desarrollo. En ellos, el 80 % de la población acude a este tipo de medicina para satisfacer las necesidades primarias de salud. Si bien los productos de origen vegetal, particularmente las drogas secas y los extractos, pasaron de ocupar un lugar preponderante a un segundo plano, en las últimas décadas han vuelto a alcanzar una presencia cada vez mayor en la Medicina Occidental (González P, Garrido S, González José; 2010).

Las plantas han constituido la base de los sistemas de Medicina Tradicional para mantener la salud e incrementar la calidad de vida del hombre, por cientos de años, los avances del conocimiento científico, cada vez es mayor en el conocimiento químico, farmacológico y clínico de las drogas vegetales y sus productos derivados, en el desarrollo de nuevas formas de preparación y administración de los medicamentos fitoterapéuticos (González, P. Garrido, S. González, José. 2010).

4.2 Plantas Medicinales

Una planta medicinal es un recurso, de extractos que se emplean como drogas en el tratamiento de alguna afección. La parte de la planta empleada medicinalmente se conoce con el nombre de droga vegetal, y puede suministrarse bajo diferentes formas galénicas: como cápsulas, cremas, jarabe, y tintura. El uso de remedios de origen vegetal se remonta a la época prehistórica, y es una de las formas más extendidas de medicina, presente virtualmente en todas las culturas conocidas (Aguilar J; Díaz L. 2012).

La industria farmacéutica actual se ha basado en los conocimientos tradicionales para la síntesis y elaboración de fármacos, y el proceso de verificación científica de estas tradiciones continúa hoy en día, descubriéndose constantemente nuevas aplicaciones. Muchos de los fármacos empleados hoy en día como el opio, la quinina, la aspirina se aíslan de los principios activos de remedios vegetales (Aguilar J; Díaz L. 2012).

Las plantas medicinales son importantes para la investigación farmacológica y el desarrollo de medicamentos, los constituyentes de las plantas se usan directamente como agentes terapéuticos y como materiales para la síntesis de los medicamentos para compuestos farmacológicamente activos. Otro campo de interés es el conocimiento fitoquímico y de toxicidad de las plantas medicinales identificadas, lo que permite conocer los diversos componentes que en cierta medida explican sus propiedades terapéuticas. Se consideran plantas medicinales a aquellas especies vegetales cuya calidad y cantidad de principios activos tienen propiedades terapéuticas comprobadas empírica o científicamente en beneficio de la salud humana (Gallo M; Gómez V; Galán J 2010).

4.3 Fitofármacos

Es un medicamento extraído de una planta medicinal. El termino proviene del griego phytos = planta y pharmakon = remedio. Aunque el extracto obtenido de una especie vegetal se compone de toda una serie de principios activos, este es considerado como un solo fármaco ya que el efecto radica en la acción combinada de sus componentes. Los componentes de estos fármacos artificiales pueden conseguirse sintetizándolos, a partir de la materia prima adecuada o aprovechando una serie de fuentes naturales, como plantas, animales, bacterias, hongos entre otros (Kohler P. 2008).

Estos son medicamentos elaborados con ingredientes naturales obtenidos mediante modernas tecnologías de producción industrial y que contienen un extracto estandarizado de una planta que constituye su componente biológicamente activo. Con el uso de estos medicamentos se busca conseguir el alivio de numerosas patologías pues las plantas medicinales no sólo son tejidos vegetales, ya que sus células esconden compuestos químicos con capacidad terapéutica (Yambay P. 2013).

4.4 Fitoterapia

Ciencia que estudia la utilización de los productos de origen vegetal con una finalidad terapéutica, ya sea para prevenir, atenuar o curar un estado patológico. Si bien la humanidad ha utilizado las plantas para curarse durante toda su historia, la incidencia de los productos de origen vegetal ha variado a lo largo de los tiempos, de acuerdo a los avances del conocimiento científico tanto sobre estos productos como sobre las demás herramientas terapéuticas (Avello M; Cisternas I 2010).

La base de los medicamentos fitoterápicos son las drogas vegetales y los diferentes tipos de productos que de ellas se obtienen. El término droga vegetal no debe confundirse con el de planta medicinal. La Organización Mundial de la Salud (OMS) definió en 1978 estos conceptos: Planta medicinal.- Cualquier vegetal que contenga, en cualquiera de sus órganos, algunas sustancias con actividad farmacológica que se pueda utilizar con fines terapéuticos para obtener nuevos fármacos.

Droga vegetal.- Es la parte de la planta medicinal utilizada en terapéutica (Cañigual S, Dellacassa E; Bandoni A 2011).

4.5 Fitomedicamentos

Los Fitomedicamentos, son productos medicinales acabados y etiquetados cuyos ingredientes activos están formados por partes aéreas o subterráneas de plantas u otro material vegetal, o combinaciones de éste, en estado bruto o en forma de preparaciones vegetales (Romero O, García R. 2010).

Los fitomedicamentos difieren sustancialmente de los medicamentos químico-farmacéuticos en sus ingredientes. Mientras que el contenido de un medicamento químico-farmacéutico está integrado por compuestos químicos puros y bien definidos, la mayoría de los fitomedicamentos presentan extractos vegetales con numerosos compuestos. Por esta razón, la fuente del material vegetal, su calidad de producción, los procedimientos de manufactura y especialmente la estandarización del extracto son particularmente importantes en el desarrollo y producción de los fitomedicamentos (Romero O, García R. 2010).

Hay una gran tendencia a utilizar plantas medicinales en los países desarrollados, usando el material de la planta como polvos o extractos, la misma que contiene complicadas mezclas de químicos. Hay personas que apuestan por lo natural y acuden a otros tipos de medicina que, desafortunadamente, no siempre tienen el aval científico que garantice la seguridad del paciente, en el caso de los fitomedicamentos sí lo tienen, pues ahora forman parte de los compuestos que gozan de aprobación médica aun cuando su origen no es químico, como los productos tradicionales (Yambay P. 2013).

4.6 Principio Activo

Se entiende por principio activo aquella molécula, producto del metabolismo de los organismos vegetales, que posee actividad farmacológica y que es susceptible de utilización terapéutica. Los principios activos de las plantas medicinales son moléculas resultantes del metabolismo celular de las plantas, unas son principios inmediatos como los azúcares, proteínas o lípidos, pero la mayoría de ellas son metabolitos secundarios producidos en diferentes rutas metabólicas (Serrano M, López M. 2010).

La investigación científica ha permitido descubrir una variada gama de principios activos, de los cuales los más importantes desde el punto de vista de la salud, son los aceites esenciales, los alcaloides, los glucósidos o heterósidos, los mucílagos y gomas, y los taninos. Existen en las plantas otros principios activos relevantes denominados nutrientes esenciales, como las vitaminas, minerales, aminoácidos, carbohidratos y fibras, azúcares diversos, ácidos orgánicos, lípidos y los antibióticos (Serrano M, López M. 2010).

4.7 Cisplatino

Cisplatino es un agente antitumoral que contiene platino, activo en un rango amplio de tumores malignos humanos. El cisplatino actúa produciendo la inhibición selectiva y persistente de la síntesis de ADN en una gran variedad de tipos de células. El cisplatino se intercala en la doble hélice del ADN y establece enlaces intra e intercatenarios detiene el ciclo celular y activa la apoptosis. El mecanismo principal del cisplatino es la inhibición de la síntesis de ADN (Ramón A, Escudero V. 2011).

4.8 El pH

El pH o “potencial de hidrógeno”, es una medida de la concentración de iones de hidrógeno, una medida de la acidez o alcalinidad de una solución. Los productos ácidos tienen un pH inferior a 7, los alcalinos tienen un pH superior a 7 y los neutros igual a 7 (Montagud A; Espadalé R. 2009).

4.8.1 pH Ácido

Son aquellos que presentan un pH inferior a 7 se los considera ácidos. Sabemos que el cáncer necesita un ambiente ácido y bajo en oxígeno para sobrevivir sin oxígeno, la fermentación de la glucosa se convierte en ácido láctico, esto hace que el pH de la célula baje a 7,0. Los pacientes terminales de cáncer tienen un nivel de acidez 1.000 veces superior al de personas sanas en casos de cáncer avanzado, el nivel de pH cae a 6,5 e incluso puede caer a 6,0, 5,7 o inferior. La verdad básica es que nuestros cuerpos simplemente no pueden luchar contra las enfermedades si nuestro pH no está bien equilibrado (Montagud A; Espadalé R. 2009).

4.9 Annona Cherimola

El chirimoyo (*Annona cherimola*.) es una de las muchas especies frutales en el género *Annona* (familia *Annonaceae*). La chirimoya es un árbol caducifolio de la familia de las Anonáceas, cuyo origen se remonta a los Andes Peruanos y las montañas de Ecuador, donde crece espontáneamente, aunque algunos historiadores incluyen también las zonas andinas de Chile y Colombia (González M. 2013).

4.9.1 Taxonomía y Morfología

4.9.1.1 Familia: Annonaceae.

La familia *Annonaceae* abarca a un grupo de plantas que producen frutos de sabor exquisito además, de su importancia económica en algunas regiones del mundo. Las especies, según sus características, se agrupan en comestibles, en plantaciones comerciales, las de uso medicinal, industrial y las empleadas como plantas exóticas y en labores de reforestación. Se plantea que

solamente cuatro géneros de la familia Annonaceae producen frutos comestibles: *Annona*, *Rollinia*, *Uvaria* y *Ansimina*. Los géneros más importantes dentro de esta familia son: *Annona*, *Rollinia* y *Abernona*, catalogándose a los géneros *Annona* y *Rollinia* como los más significativos desde el punto de vista comercial (González M. 2013).

4.9.1.2 Género: *Annona*

El género *Annona* spp. agrupa a varias especies conocidas comúnmente por guanábana, guanábana cimarrona, chirimoya, anona blanca, anona del monte, las especies más importantes del género *Annona* spp son: *Annona cherimola* Mill, *Annona Muricata* L, *Annona Squamosa* L, *Annona Reticulata* L, y el híbrido interespecífico Atemoya (*A. cherimola* x *A. Squamosa*).

El género *Annona* spp. presenta una amplia diversidad genética, estas especies son originarias de América Central y el norte de Sur América. Varias de las especies de este género de la familia Annonaceae producen frutos comestibles con una pulpa altamente valorizada, pero debido a la susceptibilidad de la piel de los frutos y al corto período de duración de los mismos, estas especies, no ocupan actualmente un lugar destacado en el comercio de frutas tropicales (González M. 2013).

4.9.1.3 Especie: *Annona Cherimola*

La *A. cherimola*-chirimoya, (del quechua chiri, «frío, fría», muya, «semillas», puesto que germina a elevadas altitudes) es nativa de los Andes Ecuatorianos y Peruanos, y es considerada una de las frutas tropicales más apreciadas dentro del género *Annona* spp. Presenta excelente calidad y valor comercial, siendo cultivada en los Andes, Europa, California y regiones brasileras de clima adecuado (González M. 2013).

4.10 Acetogeninas (ACG)

Las acetogeninas (ACG) de la familia Annonaceae son metabolitos secundarios considerados como el grupo más potente de inhibidores del complejo I mitocondrial. Estas moléculas muestran un efecto antiproliferativo sobre líneas celulares cancerosas, aun en aquellas con multiresistencia a las drogas, por lo que pudieran ser relevantes en el desarrollo de nuevos fármacos antineoplásicos, Estructuralmente, la mayoría de las acetogeninas poseen una cadena alifática de

35 ó 37 átomos de carbono con uno, dos o tres anillos tetrahidro- furánicos (THF) adyacentes, así como sustituyentes oxigenados (hidroxilos, cetonas y epóxidos) localizados a lo largo de ésta (Adelina M, González R, Mercedes Luna. 2010)

4.11 Alcaloides

Desde el punto de vista químico son compuestos nitrogenados, en los que el nitrógeno forma parte de un heterociclo. Además están constituidos por carbono e hidrogeno y algunos por oxígeno. En la naturaleza se encuentran combinados con ácidos minerales o ácidos orgánicos dando lugar a citratos y a compuestos más específicos como meconatos o aconitatos (Castillo G; Martínez S. 2007).

Los alcaloides suelen presentar actividad farmacológica muy intensa a dosis bajas, algunos son especialmente tóxicos, como la aconitina del acónito, debido a su carácter toxico en la actualidad no se suelen utilizar plantas con alto contenido de alcaloides, sino las sustancias ya aisladas perfectamente dosificadas y controladas (Castillo G; Martínez S. 2007).

4.12 Actividad Citotóxica

Se ha reportado que las acetogeninas de Annonaceae pueden inhibir selectivamente el crecimiento de células cancerígenas y también inhibir el crecimiento de células resistentes. Las acetogeninas son componentes inhibidores de la NADH ubiquinona oxidoreductasa, que es una enzima en el Complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (García K. 2009).

Recientemente, se ha demostrado que las ACG también inhiben la actividad de la NADH oxidasa presente en la membrana plasmática. Este segundo modo de acción produce una disminución del nivel intracelular de ATP, bloqueando la regeneración del NAD e inhibiendo la fosforilación glicolítica en el citosol; la combinación de los dos modos de acción promueven el proceso de apoptosis y explican la potencia de este tipo de compuestos (García K. 2009).

La Annona Cherimola han mostrado citotoxicidad frente a las líneas tumorales humanas A-549 (carcinoma de pulmón), MCF-7 (carcinoma de mama), HT-29 (adenocarcinoma de colon),

A498 (carcinoma renal), PC-3 (adenocarcinoma de próstata), y MIA PaCa-2 (carcinoma de páncreas) (Quispe, A., Riva., D. Rojas, J. Zavala., D. Margarita. Rivera., P. Abraham J. 2009).

4.13 Usos y Beneficios

La chirimoya es una fruta muy digestiva y nutritiva, se caracteriza por su alto contenido de agua, a nivel de fruto, la especie *A. cherimola* es importante por la pulpa, que usualmente es utilizada como alimento y particularmente para la elaboración de productos industriales alimenticios tales como jugos, yogurt, cremas y productos saborizantes. Por otra parte los beneficios que presenta la chirimoya son, el aceite que se extrae de las semillas amarillas, a pesar de no ser apto para el consumo humano, es utilizado en la fabricación de jabones y lubricantes (González M. 2013).

4.14 Aplicación Médica

La bioactividad de este tipo de metabolitos de plantas pertenecientes a las Anonáceas está asociada a su efecto como insecticidas, actividad citotóxica, antitumoral, antibacterial, pesticida, antimalarial, antileishmaniasis y propiedades antihelmínticas (Vega G, Esther M. 2013).

4.15 Extracto

Mezcla compleja, con multitud de compuestos químicos, obtenible por procesos físicos, químicos, y microbiológicos a partir de una fuente natural y utilizable en cualquier campo de la tecnología. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) el 25% de los fármacos comercializados actualmente son de origen vegetal y un 25% contiene principios vegetales modificados químicamente (Zapata, J. 2002).

4.15.1 Extracto Clorofórmico

Sustancia que se obtiene a partir del secado de hojas por medio de la trituración, rotoevaporación al vacío, centrifugación y filtración (ONSALUS, 2015).

4.15.2 Métodos de obtención del Extracto Clorofórmico

- Secar el material vegetal, a temperatura ambiente.
- A continuación se prepara por maceración, con agitación frecuente durante 12 horas a temperatura ambiente
- Repetir dos veces más la misma operación, o bien someter el material a percolación con cloroformo.
- Se filtra y el filtrado se concentra a sequedad en evaporador rotatorio a <40°C. y finalmente se obtiene el extracto clorofórmico (Torres M. 2013).

4.16 Cultivo

4.16.1 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).

4.17 Tipos de cultivo celular

4.17.1 Cultivo Primario

Son células provenientes del tejido original y recién trasplantadas a condiciones artificiales, este primer cultivo contiene una población celular variada, después de pases sucesivos la población celular capaz de proliferar más rápidamente predomina, y la que no prolifera o lo hace más lentamente desaparece. Este tipo de cultivo suele tener una duración limitada (no más de 10 subcultivos) por lo que se llama cultivo celular infinito (Castaño, E.2012).

4.17.2 Líneas Celulares

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

- **Diploides:** En estos cultivos el 75% de la población, tiene el mismo cariotipo de células normales de la especie de la cual se origina el tejido. Usualmente se originan de un tejido normal y continúan normales a medida que se subcultivan (más de 100 veces) (Castaño, E.2012).

- **Heteroploides o continuas:** Pueden originarse de un tejido normal o anormal, pero se considera que estas células han sufrido una transformación que le confiere características de crecimiento diferentes, entre ellas tenemos: inmortalización, pérdida de adherencia y menor dependencia de factores de crecimiento (Castaño, E.2012).

4.18 Células Linfoides

Todas las células móviles del sistema inmunitario se producen en la medula ósea a partir de precursores que terminan diferenciándose en las diversas estirpes de células linfoides: linfocitos T y B, monocitos, células dendríticas, y células natural Killer (NK). Algunas células linfoides como los linfocitos T y B en su estado de madurez les permite enfrentarse a los antígenos y responder ante ellos con la producción de anticuerpos confiriendo de esta manera la inmunidad al individuo (Rojas E. 2006).

4.19 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).

4.20 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).

4.21 Tipos de Crecimiento Celular

4.21.1 Células Adherentes o Cultivos Fijos

Éste tipo de células requieren unirse a una superficie para multiplicarse por lo que se conocen como dependientes de anclaje. Cuando el cultivo tiene éxito se forma una monocapa la cual se puede obtener de dos maneras según el tipo de recipiente.

Cultivo Estacionario.- Durante el periodo de crecimiento el cultivo es incubado sin agitación, las células se sedimentan y se adhieren al fondo del recipiente.

Cultivo en Agitación.- Un recipiente cilíndrico se rota lentamente de tal forma que las células se unen a la superficie completa del recipiente (Castaño E. 2012).

4.21.2 Células no Adherentes o Cultivos en Suspensión

Células que se multiplican suspendidas en medio líquido, en este medio se pueden sedimentar pero no se adhieren a la superficie del recipiente, el subcultivo se realiza mediante diluciones cuando el cultivo inicial ha adquirido la saturación máxima (Castaño E. 2012).

4.21.3 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).

4.22 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 (Castaño E. 2012).

Unos pocos medios se pueden esterilizar en autoclave, gracias a que en su formulación no incluye elementos termolábiles, éstos se adicionan después de la esterilización. Los otros medios y la mayoría de suplementos deben esterilizarse mediante filtración a través de una membrana de poros de 0.22 micras (Castaño E. 2012).

4.23 Clasificación de los Medios de Cultivo

4.23.1 Medio Esencial Mínimo (MEM):

Como su nombre lo indica contiene los requerimientos mínimos de un medio. Está compuesto de Solución de Sales Balanceadas (SSB), y vitaminas; a partir de este se preparan los otros tipos de medios (Castaño, E., 2012).

4.23.2 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 (Castaño E. 2012).

4.23.3 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 medio esencial mínimo pero con suplemento con 2% de Suero Bobino Fetal (SFB) (Castaño E. 2012).

4.23.4 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; segunda, la naturaleza o propósito del cultivo, tiempo de supervivencia, crecimiento y utilización (Castaño E. 2012).

4.23.5 Medios de Congelación

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

4.23.6 Preparación de los Medios de Cultivo

- En la campana de flujo laminar horizontal, se desinfecta el área de trabajo con alcohol al 70%.
- Pesar y reconstituir el medio de cultivo, filtrar con membrana de 0.22 μm y agregar la cantidad requerida de suero fetal de bovino al medio.
 - Agregar el bicarbonato de sodio gota a gota hasta obtener un color rojo y mover suavemente, no llegar al púrpura y en caso de manifestarse este, bajar el pH gota a gota con una solución 1N de Acido Clorhídrico (HCl).
 - Realizar la prueba de esterilidad, usar el medio de tioglicolato y caldo de tripticaseína soya, inocular 0.5 ml de medio de cultivo a cada uno de los medios bacteriológicos. Identificar con su nombre, fecha, el medio utilizado e incubar a 37 °C durante 2 semanas. Los tubos contaminados deberán desecharse por autoclave y deberá realizarse el medio nuevamente.

- En caso de que el medio resulte estéril, etiquetar el Medio Esencial Mínimo, su nombre, número de lote, fecha y colocarlo en el refrigerador.
- Etiquetar el bicarbonato y otros reactivos con su nombre y guardar en el refrigerador.
- Depositar las pipetas en desinfectante hipoclorito de sodio al 2% y desinfectar la superficie de trabajo (Castaño E. 2012).

4.24 Criopreservación

La criopreservación tiene como objetivo el mantenimiento de la viabilidad y funcionabilidad celular a temperaturas bajas. La criobiología se refiere a entender los efectos de las temperaturas bajas sobre los sistemas celulares ya que el tiempo biológico es una consecuencia de determinadas reacciones bioquímicas y el frío prolonga el tiempo biológico puesto que enlentece estas reacciones. Una posibilidad interesante de los cultivos celulares es la de poderlos conservar por largos periodos de tiempo (meses o años) a bajas temperaturas (menores de -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 (Zapata J. 2012).

4.25 Viabilidad Celular

La viabilidad celular se refiere a la proporción de células que sobreviven a alguna situación particular. El método más común para determinar la viabilidad celular es la tinción con azul tripán. El azul tripán es una molécula que no puede atravesar la membrana de las células vivas pero que se introduce en el interior de las células que presentan roturas en la membrana, tiñéndolas de azul (Aladro F. 2009).

4.26 Proliferación Celular

La proliferación celular es la medida del número de células que se dividen en un cultivo. Una forma de medir este parámetro es mediante la realización de ensayos por clonación, en estos ensayos, un número definido de células se siembran en una matriz apropiada y el número de

colonias que se forman después de un período de crecimiento se enumeran (Fernández J, Santos J, Rivera M. 2010)

Por lo general, uno de los dos parámetros que se usa para medir la salud de las células: es la viabilidad celular o la proliferación celular. En casi todos los casos, estos parámetros se miden por el ensayo de "funciones vitales" que son características de las células sanas. El control de la proliferación celular es esencial para el correcto funcionamiento del organismo. La pérdida de esta regulación es la causa de enfermedades como el cáncer donde una célula forma una línea celular con capacidad de proliferación celular ilimitada e incontrolada debido a mutaciones genéticas (Fernández J, Santos J, Rivera M. 2010)

5. MATERIALES Y MÉTODOS

• Tipo de Investigación

La presente investigación fue de tipo Experimental – Prospectivo.

➤ Área de Estudio

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

➤ Técnicas y Procedimientos

Fase Pre-analítica

- Oficio que permita ser parte del presente proyecto de Investigación (ANEXO 1)
- Obtención de la Línea Celular A549 (ANEXO 2)
Mantenimiento celular: Medio de Congelación y Crio congelación (ANEXO 3)
- Descongelación celular (ANEXO 4)
- Preparación de medios de cultivo RPMI pH ácido. (ANEXO 5)
- Preparación de Extractos en Diferentes Concentraciones (ANEXO 6)
- Preparación de Controles positivos con el fármaco Cisplatino en diferentes Concentraciones (ANEXO 7)

Fase Analítica

En el presente estudio investigativo se realizó:

- Obtención de Linfocitos o Células Normales (ANEXO 8)
- Tripsinización de células A549 (ANEXO 9)
- Colocación de células en los respectivos pocillos (ANEXO 10)
- **Determinación de Viabilidad celular:** La viabilidad celular se utilizó el método cuantitativo de azul de tripano para teñir las células, y así permita una diferenciación entre células vivas y muertas posteriormente se colocó en la cámara de Neubauer y se contó el número de células presentes en cada campo visual. (ANEXO 11).

- **Determinación de la proliferación celular:** Se realizarán dos cultivos con pH ácido, el primero que permitirá el crecimiento de células tumorales en medios de cultivo selectivos, la cual contará con los nutrientes necesarios para favorecer el crecimiento de la línea celular, mientras que en el segundo cultivo se colocara la línea celular tumoral y el extracto clorofórmico. Finalmente se incubarán los cultivos a 37°C en la cámara de CO₂ al 5% (ANEXO 12).

- **Controles Negativos y Controles positivos**

Control positivo:

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

Control negativo:

- Medio de cultivo más línea celular.

Control Guía:

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

Fase Post-Analítica

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

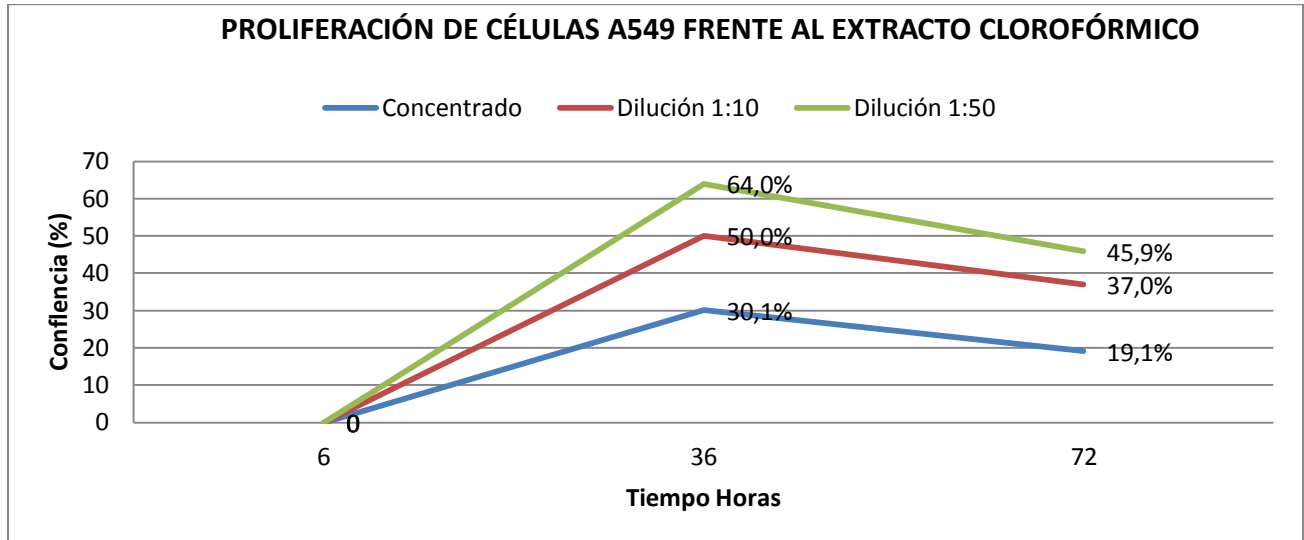
6. RESULTADOS

1.- PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS A549 FRENTE AL EXTRACTO CLOROFÓRMICO EN MEDIO DE CULTIVO* CON pH ÁCIDO**

Tabla N 1.1

Horas	Proliferación Celular %		
	6 Horas	36 Horas	72 Horas
Concentrado	0%	30,1%	19,1%
Dilución 1:10	0%	50,0%	37,0%
Dilución 1:50	0%	64,0%	45,9%

Gráfico N# 1.1



Fuente: Datos obtenidos por el tesista.

Autor: Cristian Augusto Loján Delgado

***Línea celular:** Cáncer de Pulmón Humano

**** Medio RPMI 1640**

***** pH 6,5**

Interpretación.

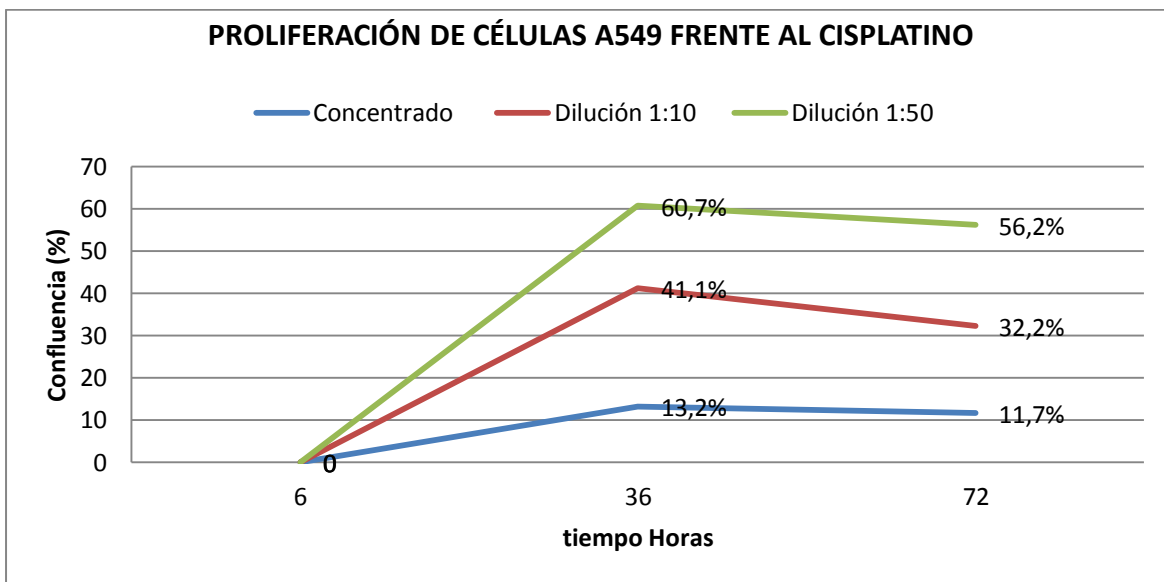
De acuerdo a lo observado en la gráfica 1.1 en la dilución 1:50 se determinó una proliferación del 0 % en las 6 primeras horas, un 50.0 % a las 36 horas y un 37.0 % a las 72 horas de incubación. Demostrando que existe una mayor proliferación a las 36 horas y esta disminuye a las 72 horas de incubación.

1.2 PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS A549 FRENTE AL CISPLATINO EN UN MEDIO DE CULTIVO *CON PH ÁCIDO**

Tabla # 1.2

	Proliferación Celular %		
Horas	6 Horas	36 Horas	72 Horas
Concentrado	0%	13,2%	11,7%
Dilución 1:10	0%	41,1%	32,2%
Dilución 1:50	0%	60,7%	56,2%

Gráfico # 1.2



Fuente: Datos obtenidos por el tesista.

Autor: Cristian Augusto Loján Delgado

***Línea celular:** Cáncer de Pulmón Humano

**** Medio RPMI 1640**

***** pH 6,5**

Interpretación.

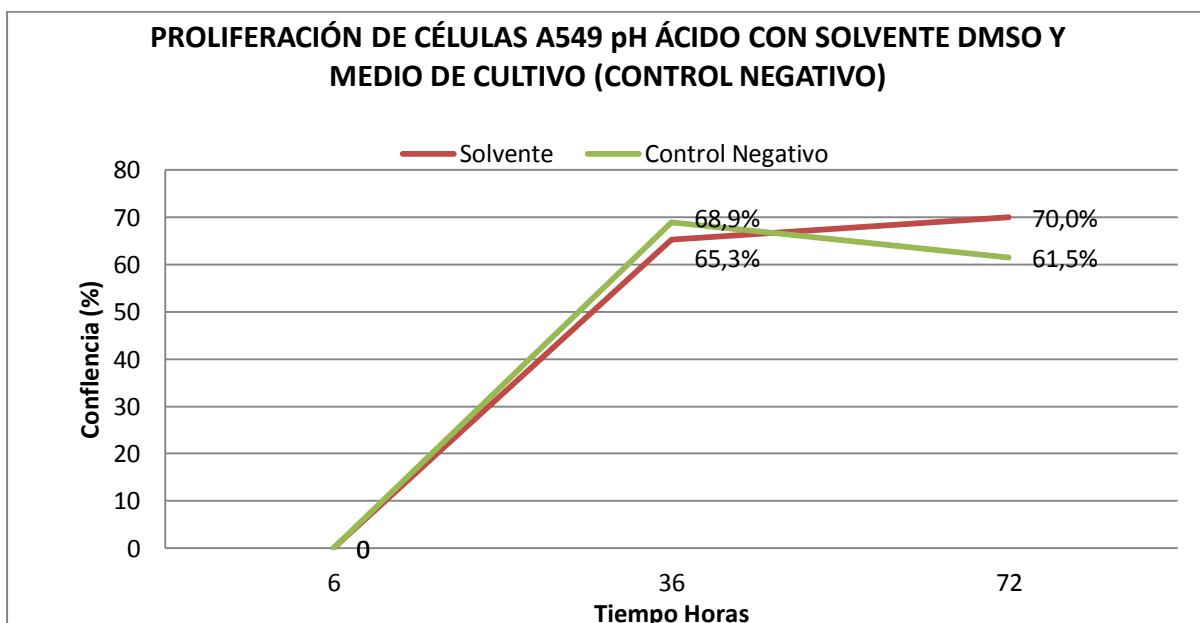
De acuerdo a lo observado en la gráfica 1.2 en la dilución 1:50 se determinó una proliferación del 0% a las 6 horas, un 60.7 % a las 36 horas y un 56.2 % a las 72 horas de incubación. Demostrando que existe una mayor proliferación a las 36 horas y una disminución a las 72 horas por efecto del fármaco.

1.3 PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS A549 pH ÁCIDO CON SOLVENTE DMSO Y MEDIO DE CULTIVO (CONTROL NEGATIVO)

Tabla # 1.3

Horas	Proliferación Celular %		
	6 Horas	36 Horas	72 Horas
Solvente	0%	65,3%	70,0%
Control Negativo	0%	68,9%	61,5%

Gráfico # 1.3



Fuente: Datos obtenidos por el tesista.

Autor: Cristian Augusto Loján Delgado

***Línea celular:** Cáncer de Pulmón Humano

** **Medio RPMI 1640**

*** **pH 6,5**

Interpretación.

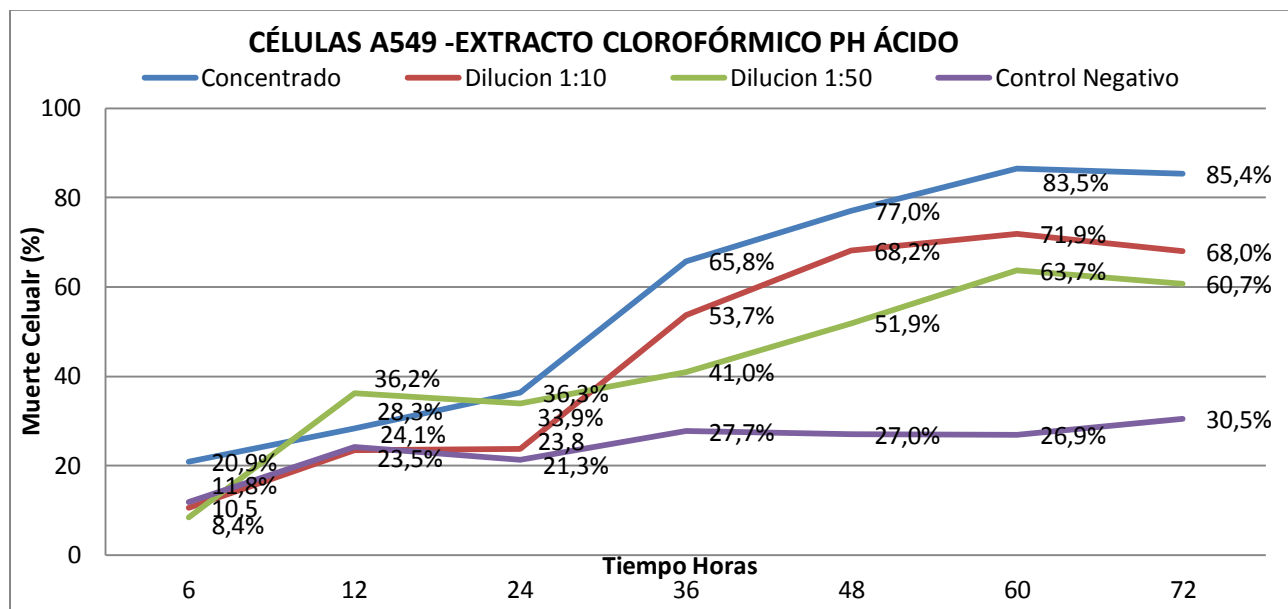
De acuerdo a lo observado en la gráfica 1.3 se determinó una proliferación de 0% a las 6 horas tanto para el solvente como para el control negativo. De igual manera a las 36 horas se observó una proliferación mucho mayor del 65.3 % para el solvente y 68.9% para el control negativo. A las 72 horas de incubación la proliferación fue mucho mayor para el solvente con un 70.0% y para el control negativo disminuyo presentando un 61.5 % de proliferación.

2.- CÉLULAS A549 FRENTE AL EXTRACTO CLOROFÓRMICO DE LAS HOJAS DE *Annona cherimola* EN UN MEDIO DE CULTIVO *CON pH ÁCIDO*****

Tabla # 2.1

Horas	Concentrado	Dilución 1:10	Dilución 1:50	Control Negativo
6 Horas	20,9%	10,5%	8,4%	11,8%
12 Horas	28,3%	23,5%	36,2%	24,1%
24 Horas	36,3%	23,8%	33,9%	21,3%
36 Horas	65,8%	53,7%	41,0%	27,7%
48 Horas	77,0%	68,2%	51,9%	27,0%
60 Horas	83,5%	71,9%	63,7%	26,9%
72 Horas	85,4%	68,0%	60,7%	30,5%

Gráfico # 2.1



Fuente: Datos obtenidos por el tesista.

Autor: Cristian Augusto Loján Delgado

***Línea celular:** Cáncer de Pulmón Humano

**** Medio RPMI 1640**

***** pH 6,5**

Interpretación.

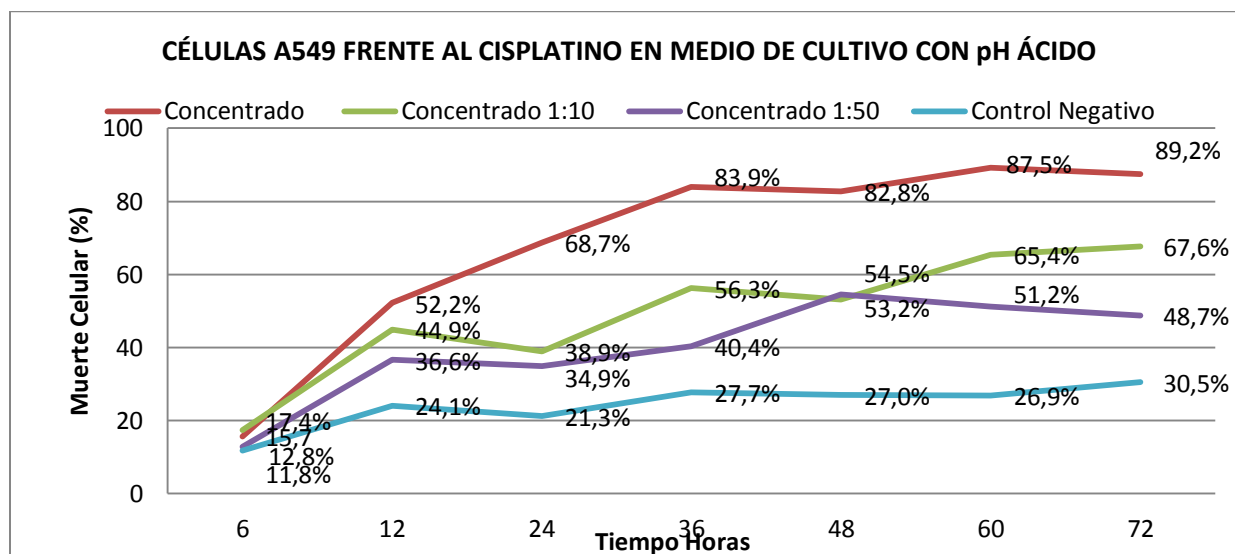
De acuerdo a lo observado en la gráfica 2.1 podemos deducir que el cultivo del extracto clorofórmico concentrado presenta mayor muerte celular con un resultado del 85,4%, seguido de la dilución 1:10 con un 68.0 % y la dilución de 1:50 un 60,7% de muerte celular en un de tiempo de 72 horas de incubación.

2.2 CÉLULAS A549 FRENTE AL CISPLATINO EN UN MEDIO DE CULTIVO CON pH ÁCIDO

Tabla # 2.2

Horas	Concentrado	Concentrado 1:10	Concentrado 1:50	Control Negativo
6 Horas	15.7%	17.4%	12.8%	11.8%
12 Horas	52.2%	44.9%	36.6%	24.1%
24 Horas	68.7%	38.9%	34.9%	21.3%
36 Horas	83.9%	56.3%	40.4%	27.7%
48 Horas	82.8%	53.2%	54.5%	27.0%
60 Horas	87.5%	65.4%	51.2%	26.9%
72 Horas	89.2%	67.6%	48.7%	30.5%

Gráfico # 2.2



Fuente: Datos obtenidos por el tesista.

Autor: Cristian Augusto Loján Delgado

***Línea celular:** Cáncer de Pulmón Humano

** **Medio RPMI** 1640

*** **pH** 6,5

Interpretación.

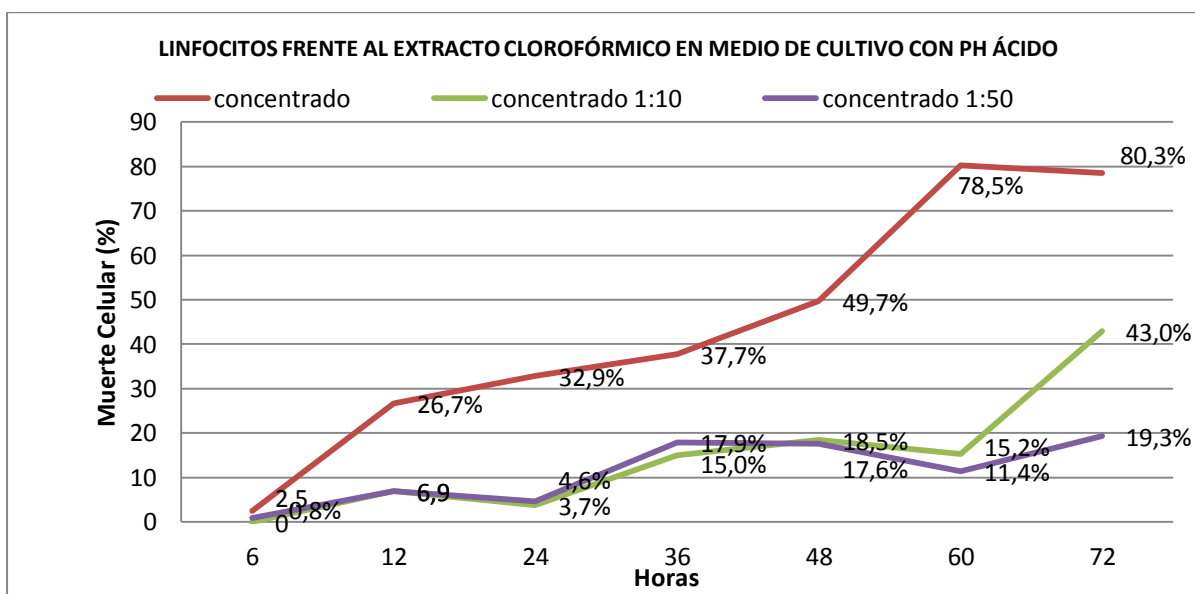
De acuerdo a los resultados obtenidos en la gráfica 2.2 indica que las células A549 (cáncer de pulmón) en un medio de cultivo con pH ácido frente al cisplatino concentrado produce una mortalidad del 89,2%, seguido de la dilución 1:10 con un 67,6% y la dilución 1:50 un 48,7% de citotoxicidad luego de un tiempo de 72 horas de incubación verificando que el medio de cultivo concentrado produce mayor citotoxicidad.

2.3 CULTIVO DE CÉLULAS NORMALES (LINFOCITOS) FRENTE AL EXTRACTO CLOROFÓRMICO EN MEDIO DE CULTIVO CON PH ÁCIDO.

Tabla # 2.3

Horas	Concentrado	Concentrado 1:10	Concentrado 1:50
6 Horas	2,5%	0%	0,8%
12 Horas	26,7%	6,9%	6,9%
24 Horas	32,9%	3,7%	4,6%
36 Horas	37,7%	15,0%	17,9%
48 Horas	49,7%	18,5%	17,6%
60 Horas	78,5%	15,2%	11,4%
72 Horas	80,3%	43,0%	19,3%

Gráfico #2.3



Fuente: Datos obtenidos por el tesista.

Autor: Cristian Augusto Loján Delgado

***Línea celular:** Cáncer de Pulmón Humano

** **Medio RPMI 1640**

*** **pH 6,5**

Interpretación.

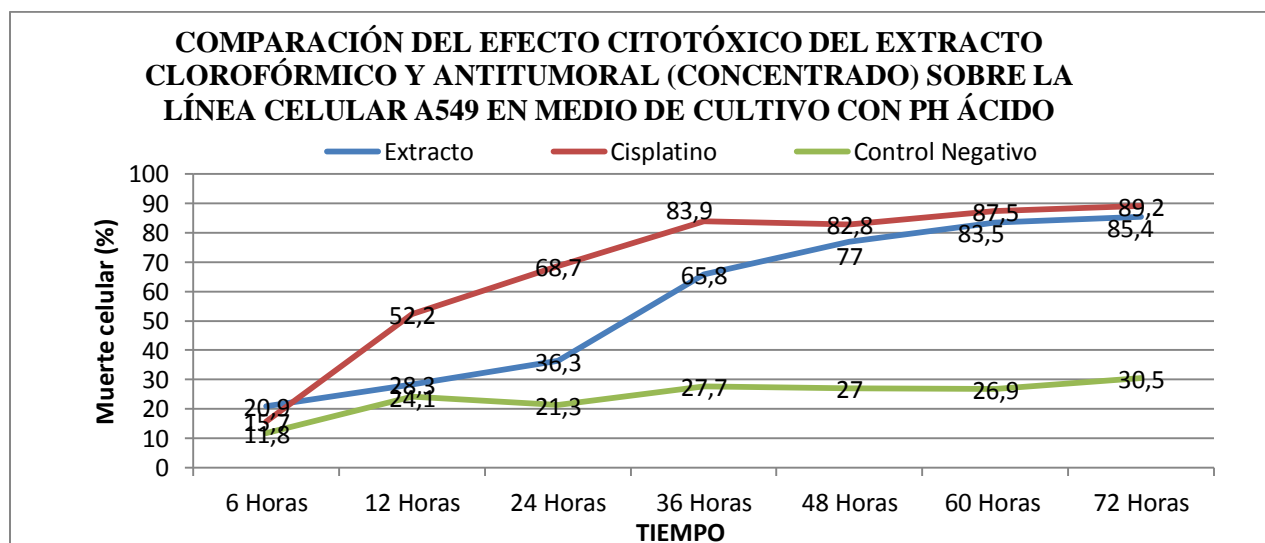
Conforme a lo observado en la gráfica 2.3 se observa que el extracto clorofórmico concentrado produce mayor muerte de linfocitos con un 80,3%, seguido de la dilución 1:10 con un 43,0% y la dilución 1:50 un 19,3% de muerte de linfocitos en un periodo de incubación de 72 horas.

2.4 COMPARACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO Y ANTITUMORAL (CONCENTRADO) SOBRE LA LÍNEA CELULAR A549 EN MEDIO DE CULTIVO CON PH ÁCIDO

Tabla # 2.4

Horas	6 Horas	12 Horas	24 Horas	36 Horas	48 Horas	60 Horas	72 Horas
Extracto	20.9%	28.3%	36.3%	65.8%	77.0%	83.5%	85.4%
Cisplatino	15.7%	52.2%	68.7%	83.9%	82.8%	87.5%	89.2%
Control Negativo	11.8%	24.1%	21.3%	27.7%	27.0%	26.9%	30.5%

Gráfico # 2.4



Fuente: Datos obtenidos por el tesista.

Autor: Cristian Augusto Loján Delgado

***Línea celular:** Cáncer de Pulmón Humano

** **Medio RPMI** 1640

*** **pH** 6,5

Interpretación.

En el gráfico 2.4 podemos observar que el extracto clorofórmico concentrado produce muerte celular en un 85,4% en relación al medicamento cisplatino tiene un mismo efecto citotóxico con un resultado de 87,5% de muerte celular y con el control negativo presenta un 30,5% de muerte de células cancerígenas.

7. DISCUSIÓN

La presente investigación se realizó en los laboratorios del centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja, con la finalidad de evaluar el efecto citotóxico del extracto clorofórmico de las hojas de *Annona cherimola* frente a la línea celular de cáncer de pulmón humano en un medio de cultivo con pH ácido.

Según un estudio realizado en Perú, en el año 2009, acerca del “Efecto citotóxico de las semillas de *Annona cherimola* en cultivos de cáncer de cérvix, mama y leucemia mieloide crónica” llevándose a cabo mediante Bioensayos de Citotoxicidad con Sulforodamina B (SRB) en las líneas celulares de Adenocarcinoma de mama (MCF-7) y ME-180 (carcinoma epidermoide de cérvix), resultados que fueron analizados dentro de un tiempo de 48 horas de incubación con valores del -45.5% y 67.3% para la línea (MCF-7) para la línea (ME180) los porcentajes de crecimiento variaron de -13,0 a 60,1 y respecto a la línea (K-562) expuesta al extracto de semillas, los porcentajes de crecimiento variaron entre -15,1 y 59,5, de tal forma que los resultados negativos representan la citotoxicidad y los valores positivos se refieren a la proliferación celular recalcando que a mayor concentración mayor muerte celular; nuestro estudio se orientó de igual manera en la evaluación citotóxica y proliferación celular que muestra el extracto clorofórmico en línea celular (A549) de cáncer de pulmón utilizando el método de Viabilidad celular con Azul de tripano donde presentó una muerte celular del 84.5% al cabo de 72 horas de incubación y una Proliferación celular del 64% a las 36 horas de incubación siendo el extracto menos concentrado donde se evidenció mayor proliferación celular, lo cual se relaciona con nuestro estudio ya que a mayor concentración mayor muerte celular y menor proliferación celular, se determinó que el extracto clorofórmico produce citotoxicidad en células cancerígenas.

Un segundo estudio realizado sobre el “Efecto citotóxico de *Annona Muricata* (Guanábana) en cultivo de líneas celulares de adenocarcinoma gástrico y pulmonar”, en el cual se determinó que el extracto etanólico de las hojas de *Annona Muricata* presenta mayor efecto citotóxico sobre las líneas tumorales C-678 (Adenocarcinoma gástrico de ratón) y H 460 (Cáncer de Pulmón); y para evaluar dicha actividad se empleó el estudio de citotoxicidad de la Sulforodamina B (SRB), se estipuló que las concentraciones del extracto etanólico son más citotóxicas que las

concentraciones de 5FU eliminando mayor parte de las células cancerígenas, a diferencia de nuestro estudio el extracto clorofórmico produjo una citotoxicidad de un 84.5% y el Fármaco Cisplatino un 87.5% por lo cual si existió una leve diferencia entre extracto y fármaco utilizado.

Un tercer estudio realizado sobre el “Efecto citotóxico in vivo de Muricin H (Acetogenina de Annona Muricata) en cultivos celulares de cáncer de pulmón” se determinó que el que Muricin H tiene una potente actividad citotóxica frente a la línea tumoral H460 (cáncer de pulmón) llegando a superar al 5-FU. Además la citotoxicidad en las células normales (3T3) fue mucho menor comparado con el 5-FU, demostrando su efecto citotóxico selectivo in vitro, esto se realizó con el método de Bioensayo de Citotoxicidad con Sulforodamina B. Si el valor es >1 , indica que la sustancia es más citotóxica para las células tumorales que para las células normales, si es <1 , lo contrario, es por ello con los resultados obtenidos del estudio del Muricin H en los índices de selectividad para la línea celular H460 de cáncer de pulmón fueron $>102,6$ es decir es tóxico para las células cancerígenas, lo que se relaciona con nuestro estudio ya que la Annona cherimola también posee diversos compuestos naturales de utilidad biológica como las acetogeninas que pueden inhibir selectivamente el crecimiento de células cancerígenas e inhibir el crecimiento de células resistentes lo cual se comprobó que al utilizar el extracto clorofórmico frente a la línea celular de cáncer de pulmón éste tuvo un efecto citotóxico de un 84.5% , cifra significativa, tomando en cuenta que nuestro ensayo se trabajó con toda la hoja de la annona cherimola a diferencia del estudio anteriormente mencionado que se llevó a cabo utilizando el principio activo puro de la annona muricata que fue la acetogenina Muricin H.

8. CONCLUSIONES

- ✓ El presente trabajo investigativo concluye que la proliferación celular de las células A549 de cáncer de Pulmón frente al extracto clorofórmico con pH ácido en una dilución 1:50 a las 36 horas presentó una proliferación de un 64,0%, la misma que disminuyó en un tiempo de 72 horas de incubación con un 45,9 %, lo que significa que a menor dilución del extracto existe mayor proliferación celular.
- ✓ Con los resultados obtenidos del presente trabajo investigativo se concluye que el extracto clorofórmico concentrado frente a la línea celular A549 produce mayor muerte celular con un resultado 85,4% en un tiempo de 72 horas de incubación, en comparación al medicamento utilizado el cisplatino tiene mayor efecto citotóxico de células con un 87,5%, indicando que el medicamento produce más citotoxicidad de células debido a que este es específico para el cáncer de pulmón.

9. RECOMENDACIONES

- Trabajar directamente con el principio activo de las plantas como el caso de las Acetogeninas ya se ha demostrado que aquellas actúan directamente sobre las mitocondrias, el ATP y el plasma celular de las células cancerígenas destruyéndolas sin dañar los tejidos sanos del paciente.
- Continuar realizando este tipo de investigaciones con el fin de crear nuevas alternativas para el tratamiento del cáncer.
- Trabajar con el extracto etanólico ya que estudios han demostrado que es mucho mejor porque presenta resultados favorables de citotoxicidad para las células tumorales.

10. BIBLIOGRAFÍA

Aguilar J; Díaz L. (2012). Biblioteca Electrónica de Géminis papeles de Salud. 24-11-2015, de Dica Plantas Medicinales uso, Preparación y Administración Sitio web: http://www.herbogeminis.com/IMG/pdf/plantas_medicinales_wikipedia.pdf

Adelina M, González R, Mercedes Luna. (2010). Las acetogeninas de Annonaceae: efecto antiproliferativo en líneas celulares neoplásicas. 24-09-2015, de Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas Sitio web: <http://www.redalyc.org/pdf/856/85611265004.pdf>

Avello M; Cisternas I. (2010). Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. 24-11-2015, de Departamento de Farmacia, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción Chile Sitio web: <http://www.scielo.cl/pdf/rmc/v138n10/art%2014.pdf>

Barbieri, R., Schwartz, E. Vanini, M., (2011). Uso De Plantas Medicinales Por Pacientes Oncológicos Y Familiares En Un Centro De Radioterapia. 24-11-2015, de Revista Electronica trimestral de enfermia Sitio web: <http://scielo.isciii.es/pdf/eg/v10n21/clinica5.pdf>

Buisan P. (2012). Interacciones entre agente antineoplasicos y drogas vegetales de uso comun.. 24-11-2015, de Revista de Fitoterapia. Sitio web: http://www.fitoterapia.net/revista/pdf/RdF12-1_Pique_antineoplasicos.pdf

Cañigueral S, Dellacassa E; Bandoni A. (2011). Plantas Medicinales y Fitoterapia. 24-11-2015, de Cátedra de Farmacognosia y Productos Naturales. Facultad de Química. Gral. Flores 2124. 11800 Montevideo (Uruguay). Sitio web: http://www.latamjpharm.org/trabajos/22/3/LAJOP_22_3_6_1_S966JS548J.pdf

Castillo G; Martínez S. (2007). Principios activos de los Metabólicos. En Manual de Fitoterapia (38-39). Barcelona-España:

<https://books.google.es/books?id=SgZjLFGBAAC&pg=PA29&dq=terpenos+en+cherimola&hl=es&sa=X&ved=0CBwQ6AEwAGoVChMIuovsmZuQyAIVQpiACh188Q8q#v=onepage&q=terpenos%20en%20cherimola&f=false>

Castaño, E. (2012). Cultivos Celulares. 11/02/015, de Biogénesis Sitio web: <http://editorialbiogenesis.udea.edu.co/index.php/biogenesis/article/viewFile/252/252>

García K. (2009). Aislamiento y caracterización estructural de acetogeninas obtenidas de semillas de *Annona Cherimola* y *Annona Muricata*. EVALUACIÓN GENOTÓXICA Y POTENCIAL QUIMIOTERAPÉUTICO. 30-09-2015, DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL ES CUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Sitio web: <http://itzamna.bnct.ipn.mx/dspace/bitstream/123456789/4071/1/AISLAMIENTOYCARACT.pdf>

Fernández J , Santos J, Rivera M. (2010). Modelos in vitro para la evaluación y caracterización de péptidos bioactivos. 26-11-2015, de OmniaScience. Sitio web: <http://omniascience.com/monographs/index.php/monograficos/article/viewFile/38/6>

Gallo M, Gómez V, Galán J. (2010). Las plantas medicinales de Perú ETNOBOTÁNICA Y VIABILIDAD COMERCIAL. 24/11/2015, de Instituto Nacional del Peru Sitio web: <http://www.reduniversitaria.es/ficheros/Plantas%20medicinales.%20LIBRO.pdf>

González M. (2013). CHIRIMOYA (*Annona cherimola* Miller), FRUTAL TROPICAL Y SUB-TROPICAL DE VALORES PROMISORIOS. 24-07-2015, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas Sitio web: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0258-59362013000300008&script=sci_arttext

González P, Garrido S, González José;. (2010). Actualidad de la Medicina Tradicional Herbolaria. 24-11-2015, de Centro Nacional de Investigaciones Científicas Ciudad de La Habana, Cuba Sitio web: <http://www.redalyc.org/pdf/1812/181226086004.pdf>

Itriago L; Silva N; Cortes G. (2013). Cáncer En Chile y El Mundo: UNA MIRADA EPIDEMIOLÓGICA, PRESENTE Y FUTURO. 13/08/2015, ACADÉMICO ESCUELA DE SALUD PÚBLICA. UNIVERSIDAD DE CHILE. Sitio web: http://www.clinicalascondes.cl/Dev_CLC/media/Imagenes/PDF%20revista%20m%C3%A9dica/2013/4%20julio/1_Dra.-Laura-Itriago-G.pdf

Kohler P. (2008). Calidad de los Fitofármacos.. En El poder Curativo del Gingko (60-61). Barcelona:<https://books.google.com.ec/books?id=qYgSISBL7VUC&pg=PA60&dq=fitofarmacos&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwifqdmnoqnJAhVI5iYKHRt7DdkQ6AEIGjAA#v=onepage&q=fitofarmacos&f=false>.

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

Montagud A; Espadalé R. (2009). Propiedades fisicoquímicas relevantes en la prevención del riesgo químico. 30-09-2015, de Ministerio de trabajo y asuntos sociales España Sitio web:http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/601a700/ntp_663.pdf

Onsalus. (2015). Extracto Clorofórmico. 11/02/015, de Onsalus Sitio web: <http://www.onsalus.com/diccionario/extracto-acuoso/11204>

Pardo, J. (2002). Patentabilidad de los extractos vegetales. 11/02/015, de Los lunes del Centro de Patentes Sitio web: http://www.ub.edu/centrepatents/pdf/docdilluns_CP/pardopatentesextractosplantas.pdf

Quispe, A. (2009). Efecto citotóxico de las semillas de Annona Cherimola en cultivos de cáncer de cérvix, 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

Ramón A, Escudero V. (2011). Farmacocinética poblacional de cisplatino aplicada a la personalización de su dosificación en pacientes oncológicos. 10-11-2015, de Farmacia Hospitalaria Sitio web: http://apps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet?_f=10&pident_articulo=90154214&pident_usuario=0&pcontactid=&pident_revista=121&ty=107&accion=L&origen=zonadelectura&web=www.elsevier.es&lan=es&fichero=121v36n05a90154214pdf001.pdf

Rojas E. (2006). Inmunidad Adquirida Sistema Linfoide. En Inmunología de Memoria (89). México DF: <https://books.google.com.ec/books?id=CtWACreo-BkC&pg=PA80&dq=celulas+linfoides&hl=es&sa=X&ved=0CDMQ6AEwBWoVChMI8vOGnbz0xgIVw4YNCh11XAJc#v=onepage&q=celulas%20linfoides&f=false>

Rojas M. (2010). Tratado de Medicina Tradicional. 24/11/2015, de Asociación Mexicana de Medicina Tradicional Sitio web: http://www.tlahui.com/libros/tmtmx_muestra.pdf

Romero O, García R. (2010). Conocimiento sobre fitomedicamentos entre médicos del segundo nivel de atención. 24-11-2015, de Centro de Investigación Biomédica del Sur, Instituto Mexicano del Seguro Social Sitio web: <http://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2007/im075f.pdf>

Serrano M, López M. (2010). Componentes Bioactivas de Origen Vegetal. 24-11-2015, de Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C. México Sitio web: [file:///C:/Users/fabian/Downloads/DialnetPrincipiosActivosYPreparacionesFarmaceuticasDeLasP-4989379%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/fabian/Downloads/DialnetPrincipiosActivosYPreparacionesFarmaceuticasDeLasP-4989379%20(1).pdf)

Torres M. (2013). “Determinación de la actividad antioxidante de Los Extractos Clorofórmico, Etanólico y Acuoso del Arrayán, Calaguala, Canayuyo, y Tipo. 24-07-2015, de la Facultad de ciencias Escuela de Bioquímica y Farmacia Sitio Web: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/1999/1/56T00307.pdf>

Yambay P. (2013). Medicina Tradicional. 24-11-2015, de FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA Sitio web: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/handle/123456789/2473/56T00343.pdf;jsessionid=102933EB54BA8E3B934E18A78153D7AE?sequence=1>

Zapata J. (2012). Cultivos Celulares. 11/02/015, de Biogénesis Sitio web: <http://editorialbiogenesis.udea.edu.co/index.php/biogenesis/article/viewFile/252/252>

11. ANEXOS

ANEXO 1



EVALUACIÓN DEL EFECTO INMUNOESTIMULANTE DEL EXTRACTO DE *ANNONA CHERIMOLA*. Y SUS COMPONENTES EN LA ACTIVACIÓN DE CÉLULAS LINFOIDES

Loja, 28 de mayo de 2015

Doctor.

Miguel Marín Gómez, Mg. Sc,

DIRECTOR DEL LABORATORIO DE CULTIVO CELULAR

A petición verbal de la interesada:

CERTIFICO:

Que el Sr. **Cristian Augusto Loján Delgado**, estudiante del **VIII MÓDULO** de la Carrera de **LABORATORIO CLÍNICO**, con cédula de identidad 1105172876 fue aceptado para ser parte del grupo de estudiantes para que participe en la realización del proyecto “**Evaluar el efecto citotóxico de las hojas de Annona cherimola en líneas celulares cancerígenas**”, el mismo que forma parte del trabajo final de investigación que debe realizar el estudiante previo a la obtención del título de Licenciada en Laboratorio Clínico.


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

Atentamente,

Dr. Miguel Marín Gómez Mg, Sc.

DIRECTOR DEL PROYECTO

OBTENCIÓN DE LA LÍNEA CELULAR A549.




ATCC


Product Sheet

A549 (ATCC® CCL-185™)

Please read this **FIRST**



Storage Temp.
liquid nitrogen
vapor phase



Biosafety Level
1

Intended Use


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

Complete Growth Medium

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


Citation of Strain

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


 **Description**

Organism: *Homo sapiens*, human
Tissue: lung
Disease: Carcinoma
Age: 58 years
Gender: male
Morphology: epithelial
Growth Properties: adherent
Isoenzymes:
G6PD, B
DNA Profile:
Amelogenin: X,Y
CSF1PO: 10,12
D13S317: 11
D16S538: 11,12
D5S818: 11
D7S820: 8,11
TH01: 8,9,3
TPOX: 8,11
vWA: 14


Cytogenetic Analysis: This is a hypotriploid human cell line with the modal chromosome number of 66, occurring in 24% of cells. Cells with 64 (22%), 65, and 67 chromosome counts also occurred at relatively high frequencies; the rate with higher ploidies was low at 0.4%. There were 6 markers present in single copies in all cells. They include der(8)t(1;8)(q11;q27); ?del(8)(p23); del(11)(q21), del(2)(q11), M4 and M5. Most cells had two X and two Y chromosomes. However, one or both Y chromosomes were lost in 40% of 50 cells analyzed. Chromosomes N2 and N6 had single copies per cell; and N12 and N17 usually had 4 copies. Note: Cytogenetic information is based on initial seed stock at ATCC. Cytogenetic instability has been reported in the literature for some cell lines.

 **Batch-Specific Information**

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

 **SAFETY PRECAUTION**

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

 **Unpacking & Storage Instructions**

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





ATCC

Product Sheet

A549 (ATCC® CCL-185™)

Please read this **FIRST**

	Storage Temp. liquid nitrogen vapor phase
	Biosafety Level 1

Intended Use

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

Complete Growth Medium

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

Citation of Strain

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

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



Handling Procedure for Flask Cultures

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

1. 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).
2. If the cells are still attached, aseptically remove all but 5 to 10 mL of the shipping medium. The shipping medium can be saved for reuse. Incubate the cells at 37°C in a 5% CO₂ in air atmosphere until they are ready to be subcultured.
3. If the cells are not attached, aseptically remove the entire contents of the flask and centrifuge at 125 x g for 5 to 10 minutes. Remove shipping medium and save. Resuspend the pelleted cells in 10 mL of this medium and add to 25 cm² flask. Incubate at 37°C in a 5% CO₂ in air atmosphere until cells are ready to be subcultured.



Subculturing Procedure

Volumes used in this protocol are for 75 cm² flask; proportionally reduce or increase amount of dissociation medium for culture vessels of other sizes. Corning® T-75 flasks (catalog #430841) are recommended for subculturing this product.

1. Remove and discard culture medium.
2. 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.
3. 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.
4. Add 6.0 to 8.0 mL of complete growth medium and aspirate cells by gently pipetting.
5. Add appropriate aliquots of the cell suspension to new culture vessels.
Cultures can be established between 2 x 10³ and 1 x 10⁴ viable cells/cm². Do not exceed 7 x 10⁴ cells/cm².
6. Incubate cultures at 37°C.

Interval: Maintain cultures at a cell concentration between 6 X 10³ and 6 X 10⁴ cell/cm².

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

Medium Renewal: 2 to 3 times per week



Cryopreservation Medium

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



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



Product Sheet

A549 (ATCC® CCL-185™)

Please read this FIRST

	Storage Temp. liquid nitrogen vapor phase
	Biosafety Level 1

Intended Use

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

Complete Growth Medium

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

Citation of Strain

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

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

Disclaimers

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

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

Additional information on this culture is available on the ATCC web site at www.atcc.org.

© ATCC 2014. All rights reserved. ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection. [10/30]

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 500ul de células y agregar 500ul de medio de cultivo de congelación
- Rotular cada criovial y colocarlo en congelación a -20°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.

Fuente: Protocolos realizados en el centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.

ANEXO 4

DESCONGELACIÓN CELULAR

- Encender cabina de bioseguridad y esterilizar 15 minutos antes de usar, de igual manera el baño maría a 37°C
- Tener listo el medio de cultivo RPMI completo e incompleto, el tubo falcón
- Extraer del tanque de nitrógeno líquido el criovial que deseemos con la cantidad conocidas de cel/ml.
- Incubar durante 1 minuto el criovial a 37°C hasta que esté descongelado. Evitar que las células permanezcan demasiado tiempo descongeladas.
- Añadir las células descongeladas rápidamente a un tubo Falcón y añadir 10 ml de medio de cultivo completo para así diluir el DMSO y disminuir su toxicidad.
- Centrifugar el Falcón a 800 rpm durante 3 minutos para obtener el pellet de células en el fondo.
- Eliminar el sobrenadante con una pipeta Pasteur y dejar el pellet de células.
- Resuspender el pellet de células en 4 ml de medio cultivo completo en el caso de criovilaes con 1.5×10^6 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 CO₂.
- Cambiar el medio de cultivo al día siguiente para eliminar posibles restos de DMSO y células muertas.

Fuente: Protocolos realizados en el centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.

ANEXO 5

PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO RPMI COMPLETO pH ÁCIDO

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

Una solución 1N se prepara de la siguiente manera:

- $V1 * N1 = V2 * N2$

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

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

5

V1: quiero preparar

N1: concentración que quiero preparar

V2: lo que quiero calcular

N2: La mayor concentración del HCL que es 5N

2. En un matraz se colocan 10 ml de HCL concentrado y se afora a 50 ml de H₂O destilada y queda la solución de HCL al 1N.

3. En el medio de cultivo incompleto se coloca esta solución gota a gota hasta que el peachímetro marque el valor necesario hasta que se haga ácido.

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

Fuente: Protocolos realizados en el centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.

ANEXO 6

PREPARACIÓN DE EXTRACTOS EN DIFERENTES CONCENTRACIONES

EXTRACTO CLOROFÓRMICO

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

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

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

Fuente: Protocolos realizados en el centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.

ANEXO 7

PREPARACIÓN DE CONTROLES POSITIVOS CON EL FÁRMACO CISPLATINO EN DIFERENTES CONCENTRACIONES

PREPARACIÓN DE CONTROLES POSITIVOS

CISPLATINO

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

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

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

Fuente: Protocolos realizados en el centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.

ANEXO 8

OBTENCIÓN DE LINFOCITOS O CÉLULAS NORMALES

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

1. Extraer 5 ml 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 contaje de las células con 20ul de las mismas y 20ul de azul de tripano.

Fuente: Protocolos realizados en el centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.

ANEXO 9

TRIPSINIZACIÓN DE CÉLULAS A549

1. Eliminar todo el contenido de medio de la botella
2. Agregar 5 ml de medio de cultivo incompleto, dejar unos minutos y sacar completamente
3. Agregar 2 ml de tripsina al 0,25%, especial para el cultivo, con esto las células comienzan a desprenderse.
4. Mantener moviendo dando golpes suaves a la botella, si no se sueltan las células se pueden incubar de 2 a 3 minutos a 37°C.
5. Seltas 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 20ul de las mimas y 20ul de azul de tripano.

Fuente: Protocolos realizados en el centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.

ANEXO 10

COLOCACIÓN DE CÉLULAS EN LOS RESPECTIVOS POCILLOS

LINEAS CELULARES (en el caso de los extractos clorofórmico)

- Una vez realizado el conteo de las líneas celulares ambas resuspendidas en 2 ml de medio de cultivo se debe distribuir la cantidad de células que irá en cada pocillo, en este caso fueron 500.000 cel/pocillo en 500 ul de medio de cultivo
- En este caso se necesitaron 12000000 de células resuspendidas en 12 ml de medio de cultivo.
- Se colocan los 500ul del medio con 500.000 células en cada una y luego se añaden los extractos y los medicamentos como controles positivos en diferentes concentraciones por triplicado.
- Se procede a incubar las placas de cultivo en la incubadora de CO₂ al 5% y con humedad del 98%.

Fuente: Protocolos realizados en el centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.

ANEXO 11

CONTAJE DE CÉLULAS CON AZUL DE TRIPANO (VIABILIDAD CELULAR)

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

Fuente: Protocolos realizados en el centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.

ANEXO 12

PROLIFERACIÓN CELULAR

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

$$\text{Confluencia} = \frac{\text{Número de células elongadas} * 100}{\text{Total de células vivas.}}$$

Fuente: Protocolos realizados en el centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.

ANEXO 13

CÁLCULOS CORRESPONDIENTES A LA VIABILIDAD CELULAR CÉLULAS VIVAS Y MUERTAS 6 Horas

ENSAYO DE: <u>EXTRACTO CLONAL DE UNAS DE ANCHOA FRESCA A CELULAS VIVAS Y MUERTAS</u>					
FECHA: 18-05-15		HORA: 12:00		RESPONSABLE: Cristian Pizarra	
6 HORAS		M 100%		M 100%	
A549 + EXTRACTO 1 V 52 = 54.2% M 2 = 45.8%	A549 + EXTRACTO 2 V 55 = 80.8% M 13 = 19.2%	A549 + EXTRACTO 3 V 68 = 88.3% M 9 = 11.7%	A549 + CISPLATINO 1 V 67 = 81.4% M 8 = 18.6%	A549 + CISPLATINO 2 V 42 = 79.2% M 11 = 20.8%	A549 + CISPLATINO 3 V 62 = 89.4% M 8 = 10.6%
V 62 = 87.1% M 10 = 12.9%	V 81 = 95.2% M 4 = 4.8%	V 67 = 94.7% M 5 = 5.3%	V 67 = 81.0% M 10 = 19.0%	V 70 = 87.5% M 10 = 12.5%	V 43 = 81.0% M 7 = 19.0%
V 50 = 96.1% M 2 = 3.9%	V 50 = 92.5% M 4 = 7.5%	V 34 = 74.7% M 5 = 5.3%	V 52 = 77.6% M 15 = 22.4%	V 52 = 81.2% M 12 = 18.8%	V 40 = 85.4% M 7 = 14.6%
LH + EXTRACTO 1 V 66 = 97% M 2 = 3%	LH + EXTRACTO 2 V 42 = 100 M 0 = 0	LH + EXTRACTO 3 V 35 = 77.5% M 7 = 22.5%	A549+25 uisOLVENTE V 60 = 90.9% M 6 = 9.1%	A549CON MC V 47 = 81.2% M 6 = 18.8%	
V 48 = 97.9% M 1 = 2.1%	V 51 = 100 M 0 = 0	V 45 = 100% M 0 = 0	V 58 = 86.5% M 9 = 13.5%	V 42 = 89.3% M 5 = 10.7%	MU = 11.8%
V 44 = 97.7% M 1 = 2.3%	V 62 = 100 M 0 = 0	V 54 = 100% M 0 = 0	V 50 = 86.2% M 8 = 13.8%	V 44 = 88% M 6 = 12%	

Fuente: Datos obtenidos por el tesista.
Autor: Cristian Augusto Loján Delgado.

12 Horas

A549 + EXTRACTO 1 V 48 = 75% M 16 = 25%	A549 + EXTRACTO 2 V 60 = 76% M 19 = 24%	A549 + EXTRACTO 3 V 33 = 64.7% M 18 = 35.3%	A549 + CISPLATINO 1 V 28 = 43% M 37 = 57%	A549 + CISPLATINO 2 V 17 = 32.6% M 25 = 67.4%	A549 + CISPLATINO 3 V 21 = 35.5% M 28 = 64.5%
V 45 = 69.2% M 20 = 30.8%	V 61 = 80.2% M 15 = 19.8%	V 22 = 59.4% M 15 = 40.6%	V 20 = 40.8% M 29 = 59.2%	V 46 = 47.4% M 51 = 52.6%	V 33 = 58.9% M 23 = 41.1%
V 54 = 71.0% M 22 = 29.0%	V 58 = 73.4% M 21 = 26.6%	V 26 = 55.3% M 24 = 44.7%	V 17 = 59.5% M 25 = 40.5%	V 39 = 48.7% M 41 = 51.3%	V 44 = 63.7% M 25 = 36.3%
LH + EXTRACTO 1 V 34 = 79.0% M 9 = 21%	LH + EXTRACTO 2 V 62 = 95.3% M 3 = 4.7%	LH + EXTRACTO 3 V 52 = 74.5% M 3 = 5.5%	A549+25 uisOLVENTE V 24 = 64.8% M 13 = 35.2%	A549 CON MC V 20 = 44.4% M 25 = 55.6%	
V 42 = 73.6% M 15 = 26.4%	V 40 = 90.9% M 4 = 9.1%	V 43 = 72.4% M 4 = 7.6%	V 33 = 64.7% M 18 = 35.3%	V 16 = 59.2% M 11 = 40.8%	
V 31 = 67.3% M 15 = 32.7%	V 54 = 93.1% M 4 = 6.9%	V 48 = 92.3% M 4 = 7.7%	V 34 = 62.9% M 20 = 37.1%	V 41 = 77.3% M 12 = 22.7%	

Fuente: Datos obtenidos por el tesista.
Autor: Cristian Augusto Loján Delgado.

24 Horas

A549+EXTRACTO 1 V = 20 = 52.6% M = 18 = 47.4%	A549+EXTRACTO 2 V = 45 = 81.8% M = 10 = 18.2%	A549+EXTRACTO 3 V = 35 = 71.4% M = 14 = 28.6%	A549+CISPLATINO 1 V 16 = 31.3% M 35 = 68.7%	A549+CISPLATINO 2 V 27 = 44.2% M 34 = 55.8%	A549+CISPLATINO 3 V 32 = 62.7% M 19 = 37.3%
V = 41 = 75.2% M = 15 = 26.8%	V = 41 = 78.8% M = 11 = 21.2%	V = 32 = 64% M = 18 = 36%	V 15 = 27.2% M 40 = 72.8%	V 47 = 70.1% M 20 = 29.9%	V 35 = 62.5% M 21 = 37.5%
V = 30 = 62.2% M = 16 = 34.8%	V = 34 = 68% M = 16 = 32%	V = 34 = 67.9% M = 20 = 37.1%	V 21 = 35.5% M 38 = 64.5%	V 40 = 69.0% M 22 = 31.0%	V 40 = 70.1% M 17 = 29.9%
LH+EXTRACTO 1 V = 28 = 70% M = 12 = 30%	LH+EXTRACTO 2 V = 48 = 96% M = 2 = 4%	LH+EXTRACTO 3 V = 38 = 92.6% M = 3 = 7.4%	A549+25 uISOLVENTE V 34 = 69.3% M = 15 = 30.7%	A549 CON MC V 42 = 82.3% M 19 = 17.7%	
V = 29 = 65.9% M = 15 = 34.1%	V = 40 = 95.2% M = 2 = 4.8%	V = 48 = 96% M = 2 = 4%	V = 36 = 66.6% M = 18 = 33.4%	V 41 = 78.0% M 11 = 21.2%	
V = 25 = 65.7% M = 13 = 34.3%	V = 45 = 97.8% M = 7 = 2.2%	V = 40 = 97.5% M = 1 = 2.5%	V = 39 = 78% M = 11 = 22%	V 39 = 75% M 13 = 25%	

Fuente: Datos obtenidos por el tesista.

Autor: Cristian Augusto Loján Delgado.

36 Horas

A549+EXTRACTO 1 V 16 = 30.1% M 27 = 69.9%	A549+EXTRACTO 2 V 30 = 50% M 30 = 50%	A549+EXTRACTO 3 V 32 = 64% M 18 = 36%	A549+CISPLATINO 1 V 9 = 13.2% M 59 = 86.8%	A549+CISPLATINO 2 V 21 = 44.1% M 30 = 58.9%	A549+CISPLATINO 3 V 34 = 60.7% M 22 = 39.3%
V 22 = 35.4% M 40 = 64.6%	V 20 = 44.4% M 25 = 55.6%	V 34 = 57.1% M 25 = 42.9%	V 12 = 19.3% M 50 = 80.7%	V 27 = 46.5% M 31 = 53.5%	V 37 = 60.6% M 24 = 39.4%
V 20 = 37.0% M 34 = 63.0%	V 25 = 44.6% M 31 = 55.4%	V 30 = 55.5% M 24 = 44.5%	V 10 = 15.9% M 53 = 84.2%	V 20 = 43.4% M 26 = 56.6%	V 30 = 57.6% M 22 = 42.4%
LH+EXTRACTO 1 V 20 = 52.6% M 18 = 47.4%	LH+EXTRACTO 2 V 42 = 84% M 8 = 16%	LH+EXTRACTO 3 V 44 = 86.2% M 7 = 13.8%	A549+25 uISOLVENTE V 32 = 65.3% M 17 = 34.7%	A549 CON MC V 40 = 68.9% M 18 = 31.1%	
V 40 = 64.5% M 22 = 35.5%	V 40 = 84.6% M 9 = 18.4%	V 40 = 83.3% M 8 = 14.7%	V 35 = 66.0% M 18 = 34.0%	V 38 = 73.0% M 14 = 27.0%	
V 44 = 69.8% M 19 = 30.2%	V 60 = 89.5% M 7 = 10.5%	V 30 = 76.9% M 9 = 23.1%	V 40 = 66.6% M 20 = 33.4%	V 45 = 75% M 15 = 25%	

Fuente: Datos obtenidos por el tesista.

Autor: Cristian Augusto Loján Delgado.

48 Horas

A549 +EXTRACTO 1 ✓ 10 = 18.1% M 45 = 81.9%	A549 +EXTRACTO 2 ✓ 15 = 30.6% M 34 = 69.4%	A549 +EXTRACTO 3 ✓ 21 = 43.7% M 27 = 56.3%	A549 +CISPLATINO 1 ✓ 10 = 15.6% M 54 = 84.4%	A549 + CISPLATINO2 ✓ 24 = 48% M 26 = 52%	A549 + CISPLATINO 3 ✓ 36 = 41.8% M 50 = 58.2%
✓ 14 = 24.5% M 43 = 75.5%	✓ 19 = 35.1% M 35 = 64.9%	✓ 24 = 48% M 26 = 52%	✓ 13 = 19.1% M 55 = 80.9%	✓ 20 = 40% M 30 = 60%	✓ 30 = 46.8% M 34 = 53.2%
✓ 15 = 26.3% M 42 = 73.7%	✓ 17 = 29.8% M 40 = 70.2%	✓ 29 = 52.7% M 26 = 47.3%	✓ 10 = 17.2% M 48 = 82.8%	✓ 21 = 52.5% M 19 = 47.5%	✓ 25 = 48.0% M 27 = 52.0%
LH + EXTRACTO 1 ✓ 30 = 66.6% M 15 = 33.4%	LH + EXTRACTO 2 ✓ 45 = 48.9% M 12 = 21.1%	LH + EXTRACTO 3 ✓ 45 = 84.9% M 8 = 15.1%	A549+25 uISOLVENTE ✓ 40 = 68.9% M 18 = 31.1%	A549 CON MC ✓ 36 = 75% M 12 = 25%	
✓ 45 = 71.4% M 18 = 28.6%	✓ 39 = 79.5% M 10 = 20.5%	✓ 42 = 82.3% M 9 = 17.7%	✓ 26 = 72.2% M 10 = 27.8%	✓ 35 = 70% M 15 = 30%	
✓ 42 = 67.7% M 20 = 32.3%	✓ 50 = 86.2% M 8 = 13.8%	✓ 40 = 80% M 10 = 20%	✓ 30 = 71.4% M 12 = 28.6%	✓ 40 = 74% M 14 = 26%	

Fuente: Datos obtenidos por el tesista.

Autor: Cristian Augusto Loján Delgado.

60 Horas

A549 +EXTRACTO 1 ✓ 7 = 14.3% M 40 = 85.7%	A549 +EXTRACTO 2 ✓ 15 = 28.3% M 38 = 71.7%	A549 +EXTRACTO 3 ✓ 18 = 37.5% M 30 = 62.5%	A549 +CISPLATINO 1 ✓ 4 = 6% M 62 = 94%	A549 + CISPLATINO2 ✓ 19 = 36.5% M 33 = 63.5%	A549 + CISPLATINO 3 ✓ 27 = 47.3% M 30 = 52.7%
✓ 8 = 13.3% M 52 = 86.7%	✓ 15 = 24.5% M 46 = 75.5%	✓ 15 = 37.5% M 25 = 62.5%	✓ 12 = 14.6% M 70 = 85.4%	✓ 21 = 33.3% M 42 = 66.7%	✓ 32 = 52.1% M 29 = 47.9%
✓ 6 = 12.5% M 42 = 87.5%	✓ 18 = 31.5% M 39 = 68.5%	✓ 19 = 33.9% M 37 = 66.1%	✓ 10 = 11.9% M 74 = 88.1%	✓ 16 = 34.0% M 31 = 66.0%	✓ 35 = 46.6% M 40 = 53.4%
LH + EXTRACTO 1 ✓ 8 = 17.3% M 38 = 82.7%	LH + EXTRACTO 2 ✓ 38 = 84.4% M 7 = 15.6%	LH + EXTRACTO 3 ✓ 45 = 94.8% M 4 = 8.2%	A549+25 uISOLVENTE ✓ 30 = 65.2% M 16 = 34.8%	A549 CON MC ✓ 40 = 76.9% M 12 = 23.1%	
✓ 6 = 13.3% M 39 = 86.7%	✓ 39 = 86.6% M 6 = 13.4%	✓ 44 = 89.7% M 5 = 10.3%	✓ 38 = 64.4% M 21 = 35.6%	✓ 36 = 69.2% M 16 = 30.8%	
✓ 12 = 28.5% M 30 = 71.5%	✓ 40 = 83.3% M 8 = 16.7%	✓ 32 = 84.2% M 6 = 15.8%	✓ 39 = 70.9% M 16 = 29.1%	✓ 30 = 73.1% M 11 = 26.9%	

Fuente: Datos obtenidos por el tesista.

Autor: Cristian Augusto Loján Delgado.

72 Horas

A549 +EXTRACTO 1	A549 +EXTRACTO 2	A549 +EXTRACTO 3	A549 +CISPLATINO 1	RKO + CISPLATINO 2	RKO + CISPLATINO 3
V = 9 = 19.1% n = 38 = 80.9%	V = 20 = 37% n = 34 = 63%	V 17 = 45.9% n 20 = 54.1%	V 8 = 11.7% n 60 = 88.3%	V 20 = 32.2% n 42 = 67.8%	V 36 = 56.2% n 28 = 43.8%
V = 10 = 20.8% n = 38 = 79.2%	V = 15 = 39.4% n = 23 = 60.6%	V 20 = 48.7% n 21 = 51.3%	V 6 = 9.3% n 58 = 90.7%	V 16 = 29.6% n 38 = 70.4%	V 31 = 50.8% n 30 = 49.2%
V = 2 = 3.8% n = 50 = 96.2%	V 21 = 41.1% n 30 = 58.9%	V 20 = 46.5% n 23 = 53.5%	V 16 = 16.6% n 80 = 83.4%	V 22 = 35.4% n 40 = 64.6%	V 31 = 59.6% n 21 = 40.4%
LH + EXTRACTO 1	LH + EXTRACTO 2	LH + EXTRACTO 3	A549+25 uISOLVENTE	A549 CON MC	
V 11 = 23.4% n 36 = 76.6%	V 20 = 43.4% n 26 = 56.6%	V 36 = 78.2% n 10 = 21.8%	V 28 = 70% n 12 = 30%	V 32 = 64.5% n 20 = 38.5%	
V 10 = 31.2% n 22 = 68.8%	V 25 = 60.9% n 26 = 39.1%	V 29 = 80.5% n 7 = 19.5%	V 30 = 66.6% n 15 = 33.4%	V 58 = 73.4% n 21 = 26.6%	
V 15 = 40.5% n 22 = 59.5%	V 30 = 66.6% n 15 = 33.4%	V 40 = 83.3% n 8 = 16.7%	V 35 = 63.6% n 20 = 36.4%	V 50 = 73.5% n 18 = 26.5%	

Fuente: Datos obtenidos por el tesista.

Autor: Cristian Augusto Loján Delgado.

ANEXO 14

PROLIFERACIÓN CELULAR A549

ENSAYO DE: EFECTO CITOTÓXICO DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO DE LAS HOJAS DE ANNONA CHERIMOLA EN UNA LINEA CELULAR DE CÁNCER DE PULMÓN HUMANO EN UN MEDIO DE CULTIVO CON pH ÁCIDO

FECHA..... HORA: 18:00.

6 HORAS

A 549 + EXTRACTO 1	A 549 + EXTRACTO 2	A 549 + EXTRACTO 3	A 549 + CISPLATINO 1	A 549 + CISPLATINO 2	A 549 + CISPLATINO 3
Proliferación: 0 %	Proliferación: 0 %	Proliferación: 0 %	Proliferación: 0 %	Proliferación: 0 %	Proliferación: 0 %
A549 + UL SOLVENTE	A549 CON MC				
Proliferación: 0 %	Proliferación: 0 %				

Fuente: Datos obtenidos por el tesista.

Autor: Cristian Augusto Loján Delgado.

36 HORAS

A 549 + EXTRACTO 1	A 549 + EXTRACTO 2	A 549 + EXTRACTO 3	A 549 + CISPLATINO 1	A 549 + CISPLATINO 2	A 549 + CISPLATINO 3
Proliferación: 30.1%	Proliferación: 50%	Proliferación: 64%	Proliferación: 13.2%	Proliferación: 41.1%	Proliferación: 60.7%
A549 + UL SOLVENTE	A549 CON MC				
Proliferación: 65.3%	Proliferación: 68.9%				

Fuente: Datos obtenidos por el tesista.

Autor: Cristian Augusto Loján Delgado.

72 HORAS

A 549 + EXTRACTO 1	A 549 + EXTRACTO 2	A 549 + EXTRACTO 3	A 549 + CISPLATINO 1	A 549 + CISPLATINO 2	A 549 + CISPLATINO 3
Proliferación: 19.1%	Proliferación: 37%	Proliferación: 45.9%	Proliferación: 11.7%	Proliferación: 32.2%	Proliferación: 56.2%
A549 + UL SOLVENTE	A549 CON MC				
Proliferación: 70%	Proliferación: 61.5%				

Fuente: Datos obtenidos por el tesista.

Autor: Cristian Augusto Loján Delgado.

ANEXO 15

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

EXTRACTO CLOROFÓRMICO CON PH ÁCIDO + A549

ADEVA

Variable Dependiente

F.V	G.L	F. Calc	Fac. Tab
Trat.	27	42.30	1.72

R- Cuadrado	Coef. Varia.	Raiz MSE	Media. Resul.
0.954943	14.82096	6.272090	42.31905

DUCAN

Prueba de Rango Múltiple de Duncan por su valor.

Alfa	0.05
------	------

T. STUDENTS.

Análisis Variable

Valor Medio	T. Calculado	F. Tabular
11.5142857	7.49	1.72

CISPLATINO + A549

ADEVA

Variable Dependiente

F.V	G.L	F.C	F. Tab.
Trat	27	61.71	1.72

R-Cuadrado	Coef. Var.	Raiz MSE	Media. Resul.
0.968683	11.19704	5.109318	45.63095

DUCAN

Prueba de Rango Múltiple de Duncan por su valor.

Alfa	0.05
-------------	-------------

T. STUDENTS.

Análisis Variable

Valor Medio	T. Calculado	F. Tabular
19.4714286	4.23	2.16

EXTRACTO + LINFOCITOS

ADEVA

Variable Dependiente

F.V	G.L	F. Valor	F.T
Trat	27	54.19	1.72

R-Cuadrado	Coef. Var	Raiz MSE	valor significar
0.964465	20.11131	4.767578	23.70595

DUNCAN

Prueba de Rango Múltiple de Duncan por su valor.

Alfa	0.05
-------------	-------------

T. STUDENTS

Análisis variable

Valor. Medio	T. Calculado	F.T
19.1142857	2.11	2.16

ANEXO 16



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

Loja, 28 de mayo de 2015

Doctor.

Miguel Marín Gómez, Mg. Sc,

DIRECTOR DEL LABORATORIO DE CULTIVO CELULAR

A petición verbal de la interesada:

CERTIFICO:

Que el Sr. **Cristian Augusto Loján Delgado**, estudiante del **VIII MÓDULO** de la Carrera de **LABORATORIO CLÍNICO**, con cédula de identidad 1105172876 realizó sus prácticas en el laboratorio de cultivos celulares como parte de su tesis (ensayos de citotoxicidad) en el Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja, los días 25, 26, 27,28 de mayo de 2015, en los horarios de 8H00 a 10H30 y de 16H30 a 18H30

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

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

CRONOLOGÍA GRÁFICA DE TRABAJO DE CAMPO

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO, COLOCACIÓN DE CÉLULAS EN CADA POCILLO.

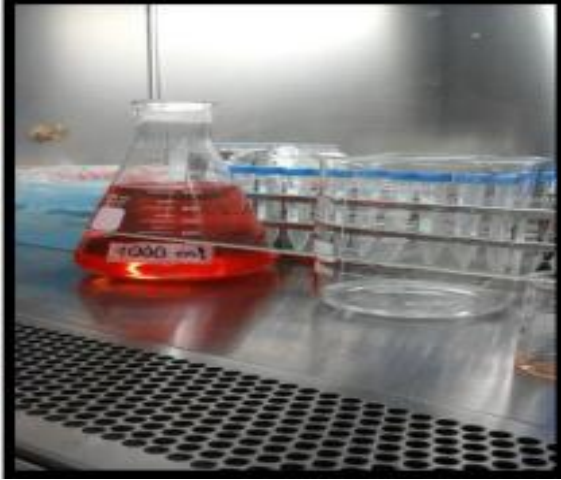


Fig. 1 Preparación del medio de cultivo RPMI.

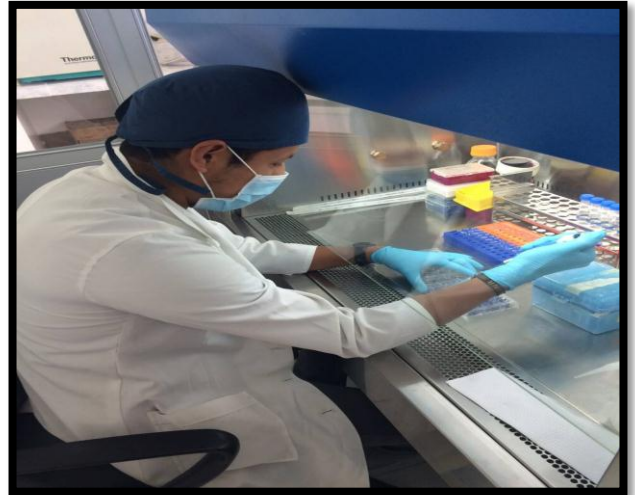


Fig. 2 Colocación de las células en cada uno de los pocillos de la placa.

TRIPSINIZACIÓN DE CÉLULAS:



Fig. 3 Incubación de las células en la cámara de CO₂.



Fig. 4 Observación de la (Tripsinización) de las células en el microscopio invertido.

PREPARACIÓN DE CISPLATINO EN DIFERENTES CONCENTRACIONES:

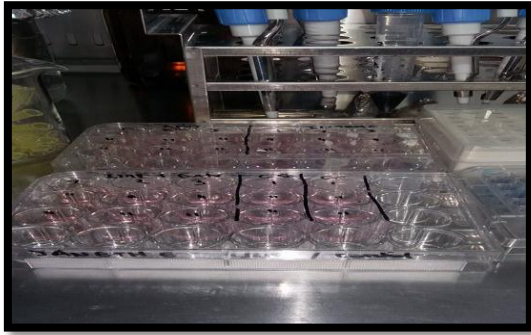


Fig. 5 Preparación de los controles positivos

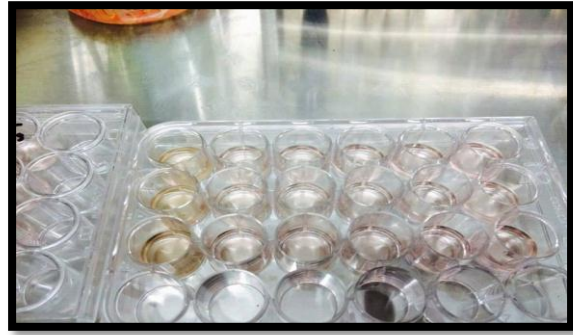


Fig. 6 Preparación de los controles positivos con el fármaco en sus diferentes concentraciones.

SEPARACIÓN DE LINFOCITOS: (Técnica de técnica de Ficoll Hypaque).

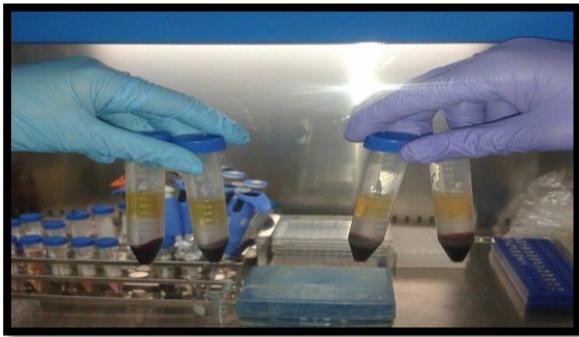


Fig. 7 Centrifugación de los tubos para la separación de los linfocitos



Fig. 8 Linfocitos separados de los otros componentes de la sangre.

CONTAJE: Viabilidad Celular: de las células A549 Cáncer de Pulmón



Fig. 9 Observación de las células A549 y su respectivo conteo diferenciando las células vivas y las muertas.

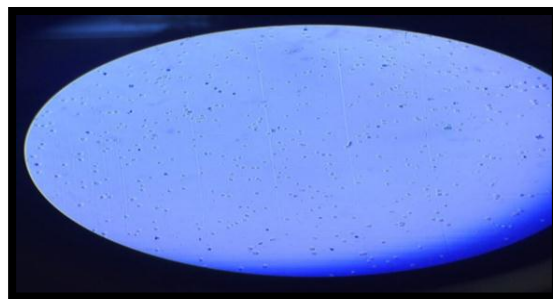


Fig. 10 Presencia de células cancerígenas A549 vivas y muertas en la cámara de Neubauer.

OBSERVACIÓN DE LINFOCITOS.



Fig. 11 Contaje de los linfocitos en el microscopio con ayuda de la cámara de Neubauer.

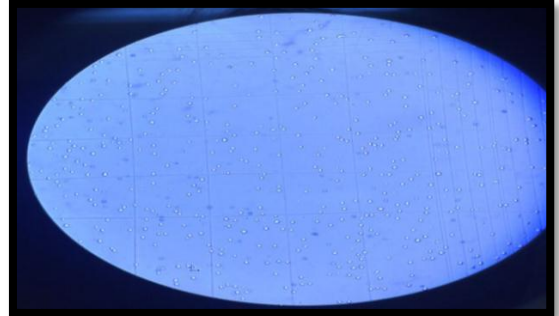


Fig. 12 Observación de linfocitos vivos y muertos

PROLIFERACIÓN CELULAR: (Confluencia) de las células A549 Cáncer de Pulmón



Fig. 13 Observación de las células A549 de de cáncer pulmón en el microscopio inverso.

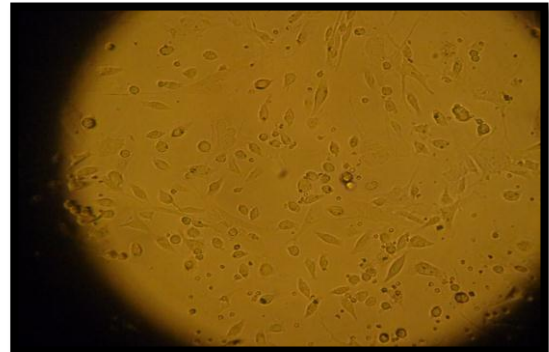


Fig. 14 Proliferación y crecimiento de las células A549.

12. ÍNDICE

CONTENIDOS	Págs.
PORTADA.....	I
CERTIFICADO DEL DIRECTOR.....	II
AUTORÍA.....	III
CARTA DE AUTORIZACIÓN.....	IV
DEDICATORIA.....	V
AGRADECIMIENTO.....	VI
1. TÍTULO.....	1
2. RESUMEN.....	2
2.1 ABSTRACT.....	3
3. INTRODUCCION.....	4
4. REVISIÓN LITERARIA.....	6
4.1 Medicina Tradicional.....	6
4.2 Plantas Medicinales.....	6
4.3 Fitofármacos.....	7
4.4 Fitoterapia.....	8
4.5 Fitomedicamentos.....	8
4.6 Principio Activo.....	9
4.7 Cisplatino.....	9
4.8 El pH.....	10
4.8.1 pH Ácido.....	10
4.9 Annona Cherimola.....	10
4.9.1 Taxonomía y Morfología.....	10
4.9.1.1 Familia Annonaceae.....	10
4.9.1.2 Genero Annona.....	11
4.9.1.3 Especie Annona Cherimola.....	11
4.10 Acetogeninas.....	11
4.11 Alcaloides.....	12

4.12	Actividad Citotóxica.....	12
4.13	Usos y Beneficios.....	13
4.14	Aplicación Medica.....	13
4.15	Extracto.....	13
4.15.1	Extracto Clorofórmico.....	14
4.15.2	Métodos de obtención del Extracto Clorofórmico.....	14
4.16	Cultivo.....	14
4.16.1	Cultivo Celular.....	14
4.17	Tipos de Cultivo Celular.....	14
4.17.1	Cultivo Primario.....	14
4.17.2	Líneas Celulares.....	15
4.18	Células Linfoides.....	15
4.19	Obtención de Células Linfoides.....	15
4.20	Cepas Celulares.....	15
4.21	Tipos de Crecimiento Celular.....	16
4.21.1	Células Adherentes o cultivos Fijos.....	16
4.21.2	Células no Adherentes o Cultivos en suspensión.....	16
4.21.3	Factores básicos de supervivencia celular.....	16
4.22	Medios de Cultivo.....	17
4.23	Clasificación de los Medios de Cultivo.....	17
4.23.1	Medio Esencial Mínimo (MEM).....	17
4.23.2	Medio Esencial de Crecimiento.....	17
4.23.3	Medio de Mantenimiento.....	17
4.23.4	Medios Selectivos.....	18
4.23.5	Medios de Congelación.....	18
4.23.6	Preparación de Medios de Cultivo.....	18
4.24	Criopreservación.....	19
4.25	Viabilidad Celular.....	19
4.26	Proliferación Celular.....	19
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
6.	RESULTADOS.....	23

7. DISCUSIÓN.....	30
8. CONCLUSIONES.....	32
9. RECOMENDACIONES.....	33
10. BIBLIOGRAFÍA.....	34
11. ANEXOS.....	39
12. ÍNDICE.....	67