



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

TÍTULO

**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 NEUTRO.**

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

AUTOR:

Luis Gustavo Riofrío Gaona

DIRECTOR:

Lcda. María del Cisne Loján González Mg Sc.

Loja – Ecuador

2015



CERTIFICACIÓN

Lcda. María del Cisne Loján González Mg Sc.

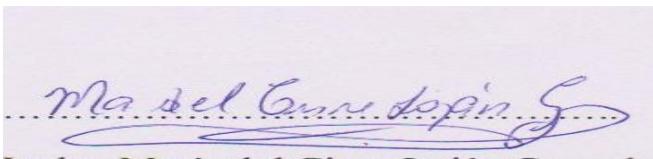
DIRECTORA DE TESIS

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación: **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 NEUTRO** presentado por la estudiante Sr. Luis Gustavo Riofrío Gaona, previo a optar el grado de licenciado en Laboratorio Clínico, ha sido elaborado bajo mi dirección y una vez revisado, autorizo su presentación ante el tribunal correspondiente:

Loja, 04 de Diciembre de 2015

Atentamente:

A photograph of a handwritten signature in blue ink on a light-colored background. The signature is written in a cursive style and reads "María del Cisne Loján González". The signature is written over a horizontal dashed line.

Lcda. María del Cisne Loján González Mg Sc.

AUTORÍA

Yo, Luis Gustavo Riofrío Gaona, 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 NEUTRO**, 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.

Autor: Luis Gustavo Riofrío Gaona.



Firma:

Número de Cédula: 1105668204

Fecha: 04 de Diciembre de 2015

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

Yo Luis Gustavo Riofrío Gaona, con cédula 1105668204, 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 NEUTRO**, como requisito para optar el grado de Licenciado en Laboratorio Clínico, autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional del Loja para que con fines académicos, muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional.

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el RDI en las redes de información del País y del exterior, con cuales tenga convenio la Universidad la misma que no se responsabiliza por el plagio o la copia de la tesis que realice un tercero.

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

Firma:



Autor:

Luis Gustavo Riofrío Gaona

Cédula: 1105668204

Dirección: Loja

Correo: lgustavo79@hotmail.com

Celular: 0988832085

Datos complementarios:

Director de tesis: Lcda. María del Cisne Loján González Mg Sc.

Tribunal de Grado: *Dra. Elsa Cumanda Ramírez Sanmartín Mg Sc.

*Dra. Diana Alexandra Montaña Peralta Mg Sc.

* Lcda. Carmen Alejandra Ullauri González Mg Sc.

DEDICATORIA

El presente trabajo investigativo está dedicado especialmente a mis padres, quienes me han apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por los ejemplos de perseverancia, motivación y constancia, que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

A Dios por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr con éxito mis objetivos.

A mis hermanos por apoyarme en cada decisión que tomo, y por estar a mi lado en cada momento hoy, mañana y siempre. Así también a mis familiares y amigos, por quererme y apoyarme siempre, por compartir buenos y malos momentos y darme fuerzas para seguir adelante y cumplir con esta meta tan importante en mi vida.

A mis compañeros universitarios con los cuales he compartido gran parte de mi vida, apoyándonos mutuamente en nuestra formación profesional.

En general a todas las personas que estuvieron a mi lado durante todo este tiempo apoyándome, contribuyendo así al logro de mis objetivos.

Luis Gustavo Riofrío Gaona.

AGRADECIMIENTO

Primero me gustaría agradecer a la Universidad Nacional de Loja por haberme abierto las puertas de su seno científico para poder estudiar mi carrera, así como también a los distinguidos catedráticos que brindaron sus conocimientos, siendo así gestores de nuestra formación profesional.

Agradezco también a mi Directora Lic. María del Cisne Loján por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico, así como también muchas horas de amable dedicación, sacrificio y confianza durante todo el desarrollo del presente estudio investigativo.

Mi agradecimiento también va dirigido al personal encargado del Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja en especial al Dr. Miguel Marín por permitirme formar parte de la investigación.

Así mismo a la Lic. Carmen Pineda encargada del laboratorio de cultivo de células por todo el apoyo que me brindó durante la realización del trabajo de campo en dicho laboratorio.

Luis Gustavo Riofrío Gaona.

1. 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 NEUTRO.**

2. RESUMEN.

En el mundo el cáncer de pulmón y las muertes relacionadas con el mismo se han incrementado en proporciones epidémicas, especialmente en aquellos países como los asiáticos, en correlación muy estrecha con un crecimiento sostenido y significativo del tabaquismo. La estimación mundial de muertes anuales por cáncer de pulmón es de alrededor de un millón de personas (Chimondeguy D, 2010).

Ante este problema de salud pública esta investigación tiene como objetivo determinar el efecto citotòxico del extracto clorofòrmico de las hojas de *Annona cherimola* en una línea celular de cáncer de pulmón en un medio de cultivo con pH neutro aplicando un modelo de estudio de tipo Experimental – Prospectivo , el mismo que se lo realizó en la ciudad de Loja, en los laboratorios de Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja empleando métodos estadísticos y técnicas establecidas para determinar viabilidad y proliferación celular , se efectuó la preparación del medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute (**RPMI**) completo con pH neutro utilizado en el cultivo de células y cultivo de tejidos, de igual forma se realizó la preparación del extracto clorofòrmico en diferentes concentraciones para evaluar su efecto (concentrado, 1:10 y 1:50), obteniendo los siguientes resultados como: el extracto concentrado que presentó mayor citotoxicidad de 70.9 % de células A549 a diferencia de los extractos diluidos 1:10 y 1:50 que presentaron menor efecto citotòxico de 61.5 % y 36.3% respectivamente.

Palabras clave: *Annona cherimola*, viabilidad, proliferación, citotoxicidad, células A549, pH, extracto, tabaquismo, RPMI.

SUMMARY

In the world of lung cancer and deaths related to it they have increased to epidemic proportions, especially in Asian countries like, in close correlation with sustained and significant growth of smoking. The global estimate of annual deaths from lung cancer is about one million people.

Faced with this public health problem this study aims to determine the cytotoxic effect of chloroform extract from the leaves of *Annona cherimola* in a cell line of lung cancer in a culture medium with neutral pH using a model of experimental study - Prospective , the same as it did in the city of Loja, in the laboratories of the Biotechnology Center of the National University of Loja established using statistical techniques to determine cell viability and proliferation methods and the preparation of the culture medium was carried Roswell Park Memorial Institute (RPMI) complete with neutral pH used in cell culture and tissue culture, similarly chloroform extract preparation was performed in varying concentrations to evaluate their effect (concentrate, 1:10 and 1:50), obtaining results as follows: the concentrated extract showed higher cytotoxicity of 70.9% of A549 cells unlike extracts diluted 1:10 and 1:50 that showed less cytotoxic effect of 61.5% and 36.3% respectively.

Keywords: *Annona cherimola*, viability, proliferation, cytotoxicity, A549 cells, pH, abstract, smoking, RPMI.

3. INTRODUCCIÓN.

El cáncer pulmonar hoy en día es una de las principales causas de muerte alrededor del mundo. Anualmente se diagnostican 2 millones de casos nuevos, y mueren 1.1 millones de individuos alrededor del mundo. El cigarrillo es el factor principal causante del cáncer pulmonar, aunque se espera que el 10% de fumadores lo desarrollen. Se requieren pues de factores genéticos, dietarios, ambientales para desarrollar tal evento. A diferencia de otros tumores, el de pulmón usualmente se diagnostica en una etapa tardía de la historia natural, lo que explica el pronóstico pobre (Paz J, 2006).

La incidencia de cáncer de pulmón ha crecido a lo largo del siglo XX como consecuencia del hábito de fumar. En un mundo sin tabaco el cáncer de pulmón sería una enfermedad excepcional. Nueve de cada diez casos de cáncer de pulmón se deben al tabaco, aunque en ocasiones, puede presentarse en no fumadores. La mejor forma de prevenir el cáncer de pulmón es dejar de fumar o no empezar a fumar nunca (Euguino A, Fernadez B, Garcia G, Garcia J , 2005).

A nivel mundial el índice de casos es de 1,4 millones de casos. En el año 2006 en Europa se estimó alrededor de 236.000 muertes relacionadas con cáncer de pulmón, 172.000 muertes entre los hombres, representando el 26,3 % del total de muertes por cáncer y 64.000 muertes entre las mujeres que corresponde al 12,5 % del total de muertes por cáncer (Rubio A, Raviña A. 2009).

En España el número de casos de cáncer de pulmón ha venido aumentando de modo permanente con mayor incidencia en hombres, estimándose que cada año se diagnostican alrededor de 20.000 casos nuevos representando un 12% de todos los cánceres. Según datos del Instituto Nacional de Estadística (INE), en España el cáncer de pulmón es una patología que se encuentra en aumento, y cuenta con una mortalidad más elevada por enfermedades oncológicas (Jiménez A, 2011).

En Ecuador para el año 2006, los tumores malignos fueron la tercera causa de muerte después de las enfermedades del sistema circulatorio y causas externas de morbilidad y mortalidad. Su incidencia es mucho menor a diferencia de otros países,

dando así que para el año 2013 el número de personas con cáncer de pulmón fue de 468 casos, representando una tasa de 5.99 por cada 100. 000 habitantes (Cueva, P. 2013).

Entre los años 2013 a 2014 en la ciudad de Loja se han registrado una disminución de casos de cáncer de pulmón encontrando 6 casos en mujeres y 5 hombres dando un total de 11 casos según el registro de tumores de SOLCA Núcleo de Loja del año 2014 (Solca, 2014).

En la actualidad se han logrado grandes avances en cuanto al tratamiento y diagnóstico de cáncer de pulmón desarrollando nuevas terapias más específicas y con menor toxicidad. Uno de los grandes avances, es el hallazgo de la actividad que presenta la *Annona cherimola* (chirimoya), un árbol tropical originario del país de Perú y Ecuador que tiene mucha acogida en la medicina tradicional.

Esta planta posee diversos compuestos naturales de interés biológico tales como alcaloides y acetogeninas las mismas que tienen una acción directa sobre la membrana de las células cancerosas destruyéndolas en forma selectiva sin causar daño evidente en células y tejidos sanos, además contiene otros componentes que actúan a nivel enzimático y molecular y que han mostrado citotoxicidad frente a las líneas tumorales humanas como A-549 (carcinoma de pulmón), MCF-7 (carcinoma de mama) entre otros, demostrando así excepcionales beneficios los mismos que pueden ser aplicados en el tratamiento contra el cáncer (Quispe A. Riva D. Rojas J. Zavala D. Margarita C. Rivera P. Abraham J. Vaisberg W, 2009).

Es por ello que el objetivo de la presente investigación es evaluar y demostrar si existe actividad citotóxica del extracto clorofórmico obtenido de las hojas de la *Annona cherimola* frente al cultivo de línea celular de cáncer de pulmón humano (A-549) con pH neutro, esperando obtener resultados satisfactorios, los mismos que pueden beneficiar y aportar al mejoramiento de la calidad de vida de la población en general que padecen de este mal.

En esta investigación se aplicó un tipo de estudio Experimental – Prospectivo, el mismo que se lo realizó en los laboratorios de Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja empleando protocolos establecidos para determinar: viabilidad y proliferación celular, realizar la preparación del medio de cultivo Roswell

Park Memorial Institute (**RPMI**) completo con pH neutro y preparación del extracto clorofórmico en diferentes concentraciones (concentrado, 1:10 y 1:50) obteniendo resultados variables tales que el extracto concentrado presento mayor citotoxicidad de 70.9 % de células A-549 a diferencia de los extractos diluidos (1:10 y 1:50) que presentaron menor efecto citotòxico de 61.5 % y 36.3% respectivamente.

4. REVISIÓN DE LITERATURA.

4.1 Cáncer de Pulmón:

El cáncer de pulmón es un tumor maligno que se desarrolla a partir de células pulmonares y bronquiales el cual consiste en un crecimiento descontrolado con una diseminación de células anormales en el organismo que dañan tejidos y órganos. Cuando algunos de estos agentes, denominados carcinógenos por ejemplo las sustancias que contiene el tabaco como la nicotina actúan sobre el organismo producen un daño a la célula sana (Álvarez G. Villegas A. 2005).

4.1.1 Factores de riesgo:

Un factor de riesgo es cualquier cosa que aumente las probabilidades que tiene una persona de contraer una enfermedad como el cáncer del pulmón. Algunos factores de riesgo, como el fumar, se pueden controlar, mientras que otros, tales como la edad de la persona, no se pueden cambiar. Fumar es el factor de riesgo principal del cáncer del pulmón. Se cree que más de 8 de cada 10 cánceres de pulmón son consecuencia del fumar. Mientras más tiempo haya fumado una persona, y más cajetillas diarias hayan fumado, mayor es el riesgo de contraer la enfermedad (James A, 2001).

4.2 Medicina tradicional:

La medicina tradicional es una parte importante y con frecuencia subestimada de los servicios de salud. En algunos países, la medicina tradicional o medicina no convencional suele denominarse medicina complementaria. Históricamente, la medicina tradicional se ha utilizado para mantener la salud, y prevenir y tratar enfermedades, en particular enfermedades crónicas. La medicina tradicional tiene una larga historia. Es la suma total de los conocimientos, capacidades y prácticas basados en las teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas, bien sean explicables o no, utilizadas para mantener la salud y prevenir, diagnosticar, mejorar o tratar enfermedades físicas y mentales (OMS, 2013).

4.3 Plantas medicinales:

La OMS define a las plantas medicinales como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos (OMS, 2013).

Muchos de los remedios tradicionales son fabricados a partir de poblaciones silvestres cuyo contenido químico puede variar debido a razones genéticas o ambientales (OMS, 2013).

El potencial de las plantas para curar la enfermedad es conocido desde siempre en todas las sociedades y este conocimiento ha sido aplicado en la medicina tradicional (Schlaepfer L, 2015).

Las plantas medicinales también tienen importantes aplicaciones en la medicina moderna en tanto que son fuente directa de agentes terapéuticos y/o materia prima para la obtención de medicamentos sintéticos más complejos (Schlaepfer L, 2015).

4.3.1 Importancia de las plantas medicinales:

Las plantas medicinales son importantes para la investigación farmacológica y el desarrollo de medicamentos, no solo cuando los constituyentes de plantas se usan directamente como agentes terapéuticos sino también como materiales de base para la síntesis de los medicamentos o como modelos para compuestos farmacológicamente activos. (Lopez M , 2012).

Por consiguiente, la reglamentación de la explotación y la exportación, junto con la cooperación y la coordinación internacionales, son esenciales para su conservación a fin de asegurar su disponibilidad para el futuro (Lopez M , 2012).

4.4 Fitofármacos:

La Organización Mundial de la Salud (OMS), define a los fitofármacos, como: productos obtenidos por procesos tecnológicamente adecuados, empleando exclusivamente materias primas vegetales, con finalidad profiláctica, curativa, o para fines de diagnóstico (Amaya R, 2013).

La aplicación de los fitofármacos debe efectuarse sobre una base científica, para ello se han establecido pautas a seguir en la evaluación de los mismos, que permite la homogenización de los estudios en el mundo, de manera que la calidad de los productos elaborados sean confiables (Amaya R, 2013).

4.5 Cisplatino:

Es un agente antitumoral que contiene platino, utilizado en un amplio rango de tumores malignos. Tiene como función actuar inhibiendo la síntesis de ADN en varias células. Se cree que mata a las células en todas las etapas del ciclo celular (Vardaro A, 2011).

El cisplatino además posee propiedades inmunosupresoras, radiosensibilizantes entre otras. Puede ser administrado en pacientes que ya no responden a tratamiento local, como cirugía, y radioterapia (Vardaro A, 2011).

4.6 Principio activo:

Sustancia química responsable de la actividad farmacológica y del uso terapéutico de una droga. Una droga puede contener varios principios activos (Arana G, 2014).

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 entre otros (Arana G, 2014).

4.7 Acetogeninas:

Las acetogeninas (ACG) son metabolitos secundarios aislados exclusivamente de plantas de especie de la familia Annonaceae, presentes en raíces hojas y semillas y presentan una extensa gama de actividades biológicas: antitumoral, citotóxica, antimicrobiana, antiprotozoaria entre otras. Las acetogeninas afectan a producción de adenosin trifosfato (ATP) en la mitocondria (Flores L. Mesa V, 2010).

4.8 *Annona cherimola*:

El chirimoyo (*Annona cherimola*) es una de las muchas especies frutales en el género *Annona* (familia Annonaceae). El nombre chirimoya parece derivarse de ‘chirimuya’ que en Quechua significa ‘semilla fría’. Esto se refiere a la región andina donde está

presente esta especie, que es relativamente fría comparada con las regiones donde están presentes el resto de las especies de *Annona* (Renata J. 2007).

4.8.1 Taxonomía y morfología:

Familia: Annonaceae.

Género: *Annona*

Especie: *Annona cherimola* (Renata J. 2007).

4.8.2 Origen:

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

4.8.3 Usos y beneficios:

La decocción de estas semillas, especialmente de aquellas especies que se encontraban sembradas a mayor altitud; servía para la eliminación de ectoparásitos generalmente ubicados en el cuero cabelludo (Renata J. 2007).

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

4.8.4 Actividad Citotóxica:

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. Rivera M. Abraham J, 2009).

4.8.5 Aplicación Médica:

En su totalidad el árbol de guanábana es utilizado en la medicina natural en los trópicos; inclusive la corteza, las hojas, las raíces, las flores, las semillas y la fruta. Las propiedades y los usos diferentes son atribuidos a las partes diferentes del árbol. Generalmente el jugo de fruta se toma para expulsar parásitos, para calmar la fiebre, para aumentar la leche materna; la corteza, las hojas y las raíces se consideran sedante, antiasmódica, hipertensiva y nerviosa, el cocimiento de sus hojas se usa contra la tos, catarros y en fomentos contra inflamaciones (Aguirre P. Parra M. Quinaloa G, 2003).

4.9 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 (Pardo J, 2002).

4.9.1 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).

4.9.2 Métodos de obtención del extracto clorofórmico:

- Secar el material vegetal, a temperatura ambiente.
- Luego, triturar y colocar en un dedal de un equipo soxhlet de extracción continua (80 g de planta y 750 ml de disolvente cloroformo. La extracción se realiza durante 8 a 16 horas, de forma sucesiva sobre el mismo material vegetal.
- La solución obtenida concentrar a extracto seco con la utilización de un rotoevaporador al vacío, calculando su rendimiento por gravimetría.

- Guardar en desecadora hasta el momento de efectuar su evaluación biológica. (Guerrero J, 2006).

4.10 pH:

El pH puede definirse como una medida que expresa el grado de acidez o basicidad de una solución en una escala que varía entre 0 y 14. La acidez aumenta cuando el pH disminuye. Una solución con un pH menor a 7 se dice que es ácida, mientras que si es mayor a 7 se clasifica como básica. Una solución con pH 7 será neutra (Goyenola G, 2007).

4.11 Cultivo Celular:

El cultivo celular se refiere al mantenimiento o crecimiento in vitro de células, tejidos u órganos de origen animal o vegetal preservando al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. El procedimiento consiste en liberar las células del tejido original y llevarlas a un ambiente artificial que permita su crecimiento, multiplicación y mantenimiento del metabolismo, de una manera controlada (Castaño M. Zapata J, 2010).

4.12 Líneas celulares:

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

- Diploides: se originan de un tejido normal y continúan normales a medida que se cultivan.
- Heteroploides o continuas: se originan de un tejido normal o anormal, pero se considera que estas células han sufrido una transformación que le confiere características de crecimiento diferentes (Castaño M. Zapata J, 2010).

4.13 Obtención de Células Linfoides:

Existe 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 lo utiliza para la obtención de linfocitos 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).

4.14 Factores Básicos para la supervivencia celular:

- Gases (oxígeno)
- Dióxido de carbono
- Iones orgánicos
- Agua
- Carbohidratos
- Aminoácidos
- L- Glutamina
- Vitaminas
- Suero
- Antibióticos y antimicóticos (Castaño M. Zapata J, 2010).

4.15 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 M. Zapata J, 2010).

4.15.1 Clasificación de los medios de cultivo:

4.15.2 Medio esencial mínimo (MEM):

Medio que contiene los requerimientos mínimos de un medio. Está compuesto de soluciones salinas balanceadas (SSB), aminoácidos, vitaminas; a partir de estos se separan los otros tipos de medios (Castaño M. Zapata J, 2010).

4.15.3 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 M. Zapata J, 2010).

4.15.4 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; y segundo la naturaleza o propósito del cultivo, tiempo de supervivencia, crecimiento y utilización (Castaño M. Zapata J, 2010).

4.16 Criopreservación:

Una aspecto interesante que presentan los cultivos celulares es la de poder conservarlos por largos periodos de tiempo (meses o años) a bajas temperaturas (-150°C) en la que las células se mantienen en un estado de animación suspendida hasta que se necesiten; así, si es necesario trabajar varias líneas celulares pero no todas a la vez, es posible, ahorrar reactivos, dinero y tiempo (Castaño M. Zapata J, 2010).

Este procedimiento es útil, además, para resolver la pérdida por contaminación, minimizar los cambios genéticos en líneas celulares continuas y evitar el envejecimiento y posible transformación o la pérdida de las funciones originales de las células. La función del criopreservante es actuar como agente higroscópico; esto es, que puede absorber agua dentro y fuera de la célula para evitar la formación de cristales que, de otro modo, romperían las membranas celulares. La elevada concentración de suero

contribuye probablemente a mantener la integridad conservando la concentración intracelular de proteínas en las células permeabilizadas (Castaño M. Zapata J, 2010).

4.17 Viabilidad celular:

En un cultivo es posible conocer el porcentaje de células viables luego de un determinado estímulo o tratamiento, esto se puede realizar gracias a la tinción de azul de tripano en células que se introduce en la membrana tiñéndolas de azul cuando ésta no es viable, caso contrario se consideran células viables cuando se van a mostrar como puntos blancos en la cámara de Neubauer (Cultek, 2010).

4.18 Proliferación Celular:

La proliferación celular participa en numerosos procesos fisiológicos y patológicos como el crecimiento, la reparación, hipertrofia, hipertermia y el desarrollo de tumores. Las células en proceso de proliferación pasan por lo que se conoce como ciclo celular durante el cual las células replican todos sus componentes y se dividen en dos células hijas idénticas (Rang H. Dale M. Ritter M. Flower R, 2006).

5. MÉTODOS, TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS DEL ANÁLISIS.

Tipo de investigación

- El estudio se realizó a través de un diseño experimental de tipo prospectivo.

Área de estudio

- La presente investigación se llevó a cabo en los laboratorios del Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.
- **Técnicas y procedimientos**

Fase pre-analítica

- Oficio dirigido al director del proyecto que permita ser parte del presente proyecto de Investigación (ANEXO 1)
- Mantenimiento de la Línea Celular A- 549 (ANEXO 2)

Mantenimiento celular: (ANEXO 3)

- Medio de Congelación.
- Criocongelación.
- Descongelación celular.

Fase analítica

En el presente proyecto se efectuó la:

- Preparación de medios de cultivo RPMI a pH neutro y del extracto clorofórmico en diferentes concentraciones (ANEXO 4)
- Preparación de controles positivos con el fármaco cisplatino en diferentes Concentraciones (ANEXO 5)
- Obtención de linfocitos o células normales mediante la **técnica de ficoll hypaque** (ANEXO 6)
- Tripsinización de células A549 (ANEXO 7)

- Colocación de células en cada pocillo por cálculo para extracto clorofórmico (ANEXO 8)

Determinación de viabilidad celular: para ello se usó el colorante azul de tripano, en donde primero se realizó una suspensión que permitirá diferenciar las células vivas de las células muertas. Se contó el número de células presentes en cada campo visual. (ANEXO 9).

Determinación de la proliferación celular: se realizaron dos cultivos con pH neutro, el primero que permitirá el crecimiento de células tumorales en medios de cultivo, el cual contará con los nutrientes necesarios para favorecer el crecimiento de la línea celular, mientras que en el segundo cultivo se colocó la línea celular tumoral y el extracto clorofórmico. Finalmente se incubaron los cultivos a 37°C en la cámara de CO₂ al 5% (ANEXO 10).

Controles Negativos y Controles positivos.

Control positivo:

- Medio de cultivo más línea celular de cáncer de pulmón más el fármaco (Cisplatino) que es el de elección para este tipo de cáncer a nivel local.

Control negativo:

- Medio de cultivo más línea celular de cáncer de pulmón (A-549).

Control Guía:

- Medio de cultivo más la línea celular de cáncer de pulmón y Dimetil sulfoxido (DMSO) al 10%.

Fase Post-analítica

- Certificado de haber realizado los ensayos de campo correspondiente en los laboratorios de Investigaciones del centro de Biotecnología de la UNL. (ANEXO 11)

- Realización de los cálculos correspondientes a la Viabilidad Celular obteniendo el porcentaje de células vivas y muertas (**ANEXO 12**)
- Realización de 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 13**)
- Se realizó el análisis estadístico mediante un programa denominado Sistemas de Análisis Estadístico (S.A.S), utilizando tres métodos como la prueba de **ADEVA** que nos sirve para conocer si existe diferencias significativas entre tratamientos de una manera general, en caso de haber diferencias entonces aplicamos las pruebas de **DUNCAN** son complementarias al Adeva y nos sirven para determinar diferencias significativas entre tratamientos en forma individual. Además utilizamos las pruebas de **T- STUDENT** que son similares a las pruebas de Duncan pero se la aplica a todo un ensayo y buscan la diferencia entre las medias y las analiza por grupos entre los mejores. (**ANEXO 14**).

Descripción gráfica. (ANEXO 15).

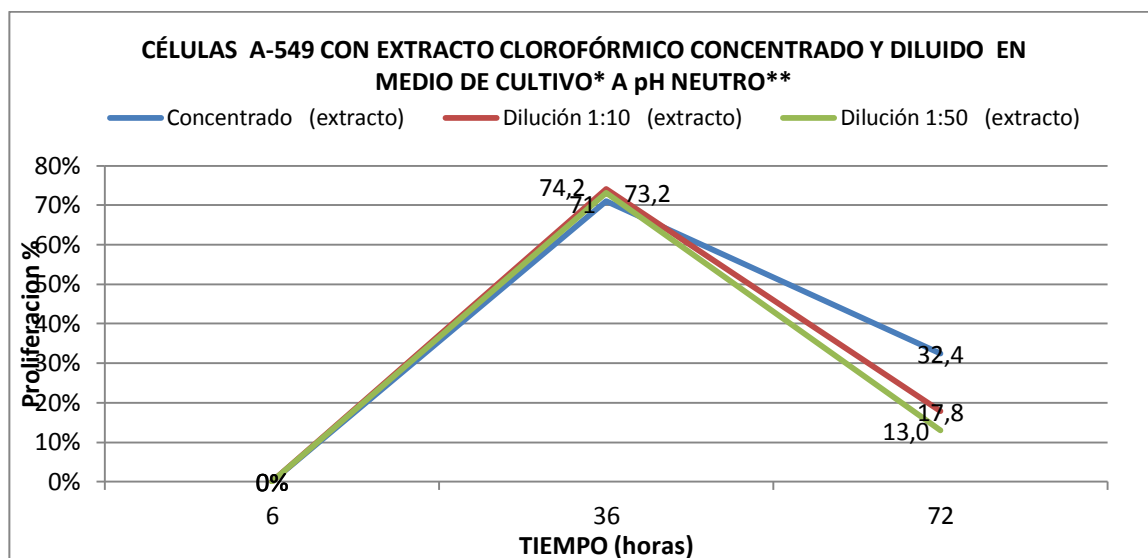
6. RESULTADOS:

PROLIFERACIÓN CELULAR.- Determinar el grado de proliferación celular de acuerdo al grado de concentración del extracto clorofórmico con pH neutro.

PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS A-549 CON EXTRACTO CLOROFÓRMICO EN MEDIO DE CULTIVO A pH NEUTRO

Horas	6	36	72
Concentrado (extracto)	0%	71%	32.4%
Dilución 1:10 (extracto)	0%	74.2%	17.8%
Dilución 1:50 (extracto)	0%	73.2%	13.0%

GRÁFICO # 1



Autor: Luis Gustavo Riofrío Gaona

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

*Línea celular de cáncer de pulmón humano.

**Medio RPMI 1640.

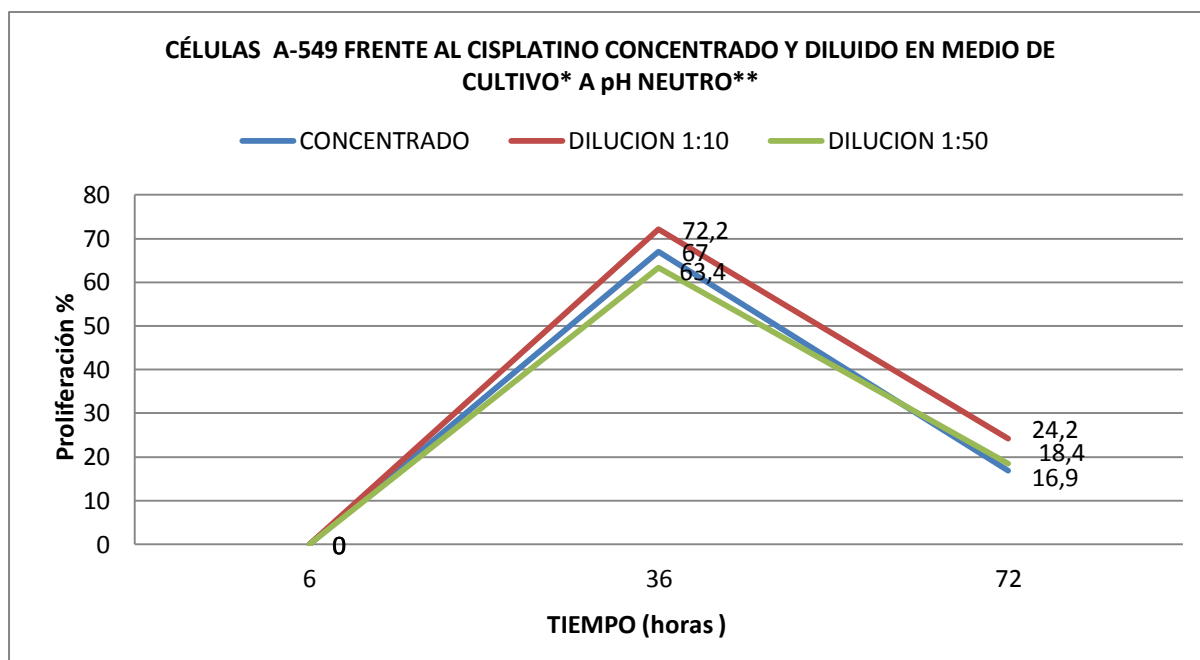
*** pH neutro.

En el gráfico número 1 se determinó un grado de proliferación de 0% a las 6 horas, 71 % a las 36 horas y 32.4 % a las 72 horas en medio de cultivo con extracto concentrado. En el cultivo con dilución 1:10 la proliferación fue de 0% a las 6 horas, 74.2 % a las 36 horas y 17.8% a las 72 horas de incubación. Así mismo el cultivo con dilución 1:50 presentó una proliferación de 0% a las 6 horas, 73.2 % a las 36 horas y 13% a las 72 horas de incubación. Demostrando que existe una proliferación mayor a las 36 horas y disminuye a las 72 horas.

PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS A-549 CON EL CISPLATINO EN MEDIO DE CULTIVO* A pH NEUTRO**

Horas	6	36	72
Concentrado (cisplatino)	0%	67%	16.9%
Dilución 1:10 (cisplatino)	0%	72.2%	24.2%
Dilución 1:50 (cisplatino)	0%	63.4%	18.4%

GRÀFICO # 2



Autor: Luis Gustavo Riofrío Gaona

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

*Línea celular de cáncer de pulmón humano.

**Medio RPMI 1640.

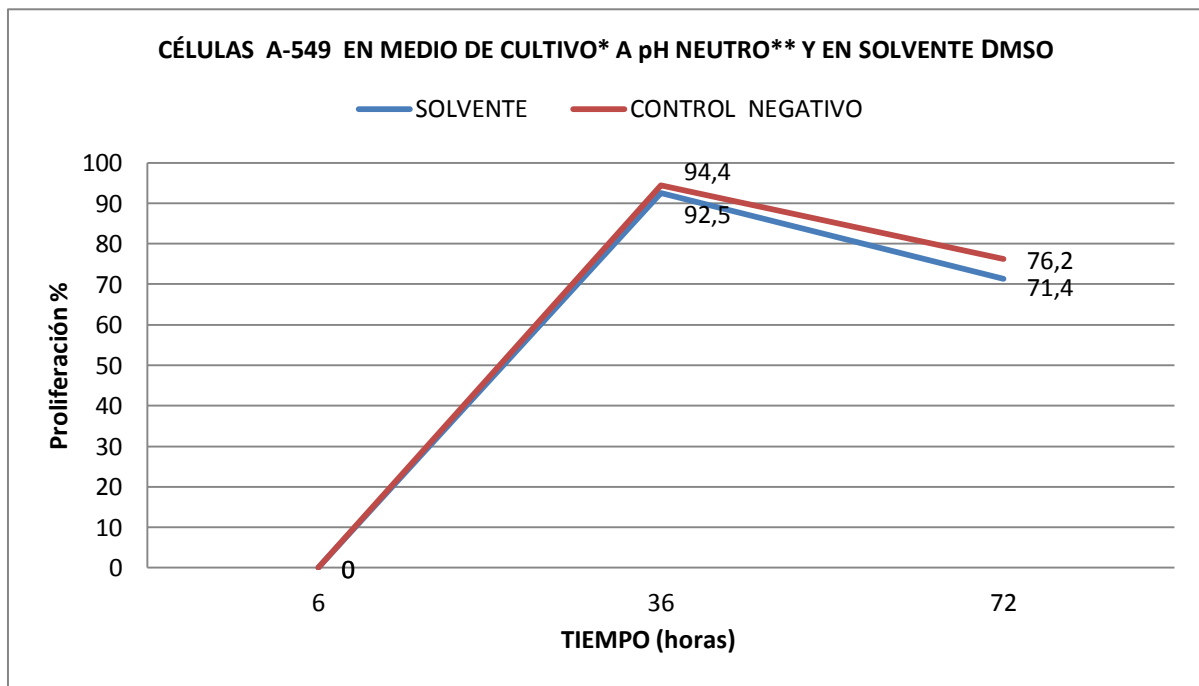
*** pH neutro.

En el gráfico número 2 se determinó un grado de proliferación de 0% a las 6 horas, 67 % a las 36 horas y 16.9 % a las 72 horas en el cultivo con cisplatino concentrado. En el cultivo con la dilución 1:10 la proliferación fue de 0% a las 6 horas, 72.2 % a las 36 horas y 24.2 % a las 72 horas de incubación. Así mismo el cultivo con dilución 1:50 se produjo una proliferación de 0% a las 6 horas, 63.4 % a las 36 horas y 16.9 % a las 72 horas de incubación demostrando que existe un grado de proliferación mayor a las 36 horas y disminuye a las 72 horas.

PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS A-549 EN MEDIO DE CULTIVO* A pH NEUTRO Y EN SOLVENTE DIMETIL SULFOXIDO (DMSO).**

Horas	6	36	72
Solvente DMSO	0%	92.5%	71.4%
Control negativo	0%	94.4%	76.2%

GRÁFICO # 3



Autor: Luis Gustavo Riofrío Gaona

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

*Línea celular de cáncer de pulmón humano.

**Medio RPMI 1640.

*** pH neutro.

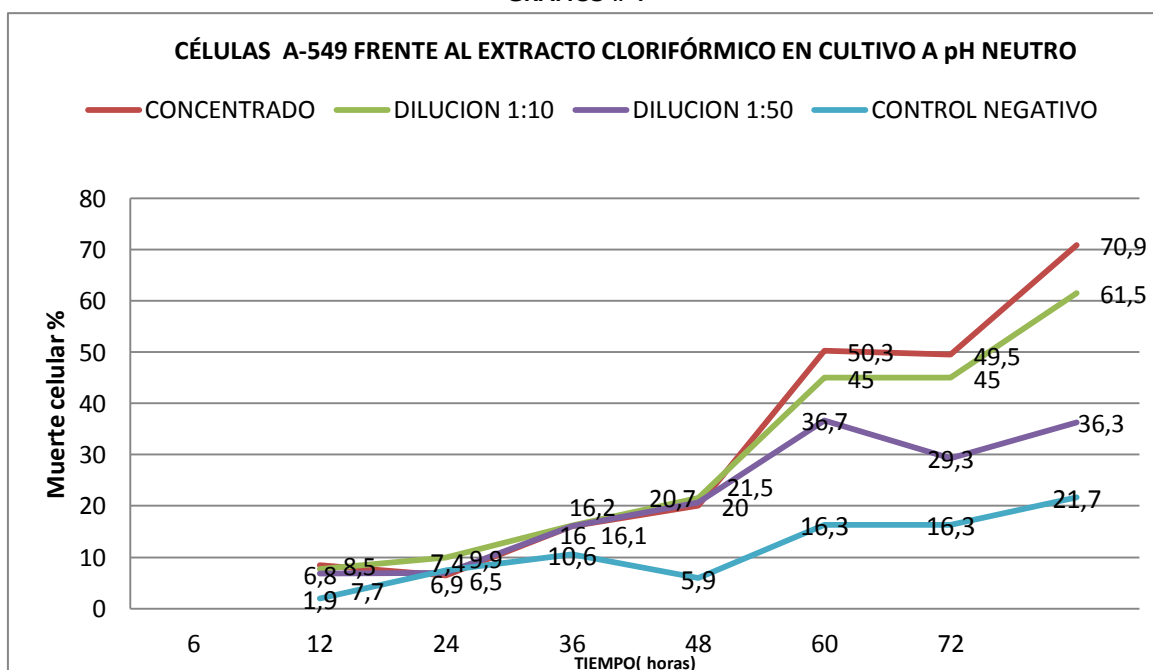
En el gráfico número 3 se determinó un grado proliferación de 0% a las 6 horas tanto para el solvente como para el control negativo. De igual manera a las 36 horas se observó una proliferación mucho mayor de 94.4 % para el control negativo y 92.5 % para el solvente. A las 72 horas de incubación el grado de proliferación fue mucho menor tanto para el solvente que presentó un 71.4% que para el control negativo presentando un 76.2 % de proliferación.

VIABILIDAD CELULAR: del cultivo de la línea celular tumoral de cáncer de pulmón en extracto clorofórmico con un pH neutro.

CÉLULAS A-549 FRENTE AL EXTRACTO CLOROFÓRMICO DE HOJAS DE ANNONA CHERIMOLA EN UN MEDIO DE CULTIVO * A pH NEUTRO***.**

Horas	Concentrado	Dilución 1:10	Dilución 1:50	Control negativo
6	8.5%	7.7%	6.8%	1.9%
12	6.5%	9.9%	6.9%	7.4%
24	16.1%	16.2%	16.0%	10.6%
36	20.0%	21.5%	20.7%	5.9%
48	50.3%	45.0%	36.7%	16.3%
60	49.5%	45.0%	29.3%	16.3%
72	70.9%	61.5%	36.3%	21.7%

GRÁFICO # 4



Autor: Luis Gustavo Riofrío Gaona

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

*Línea celular de cáncer de pulmón humano.

**Medio RPMI 1640.

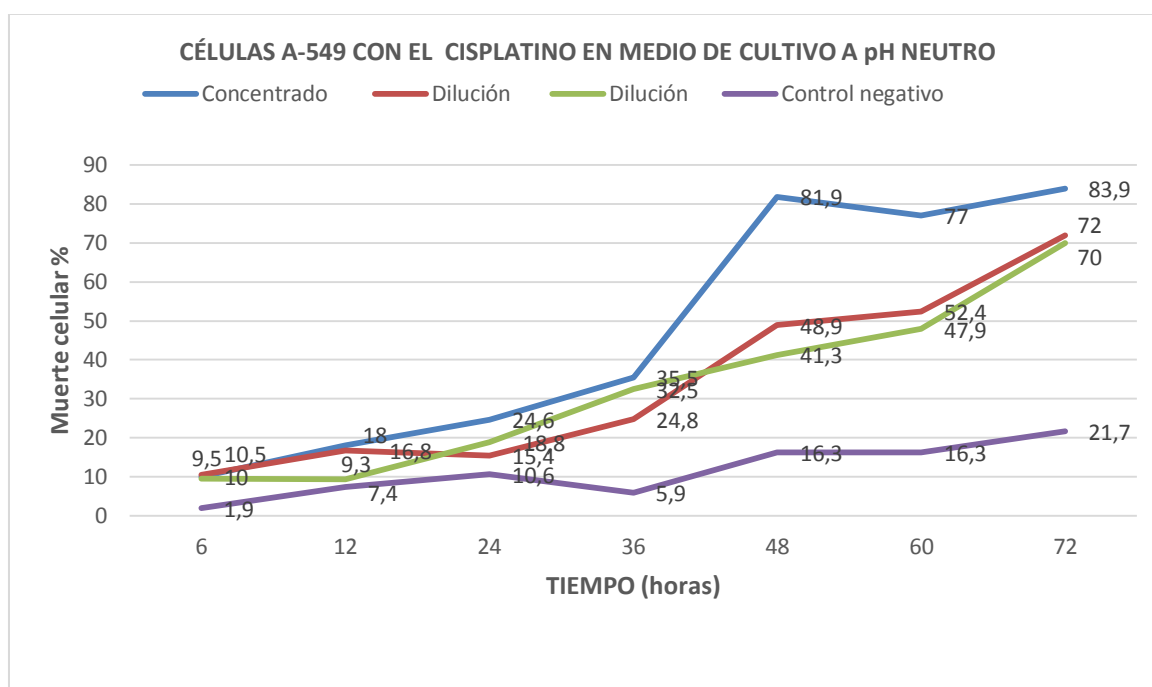
*** pH neutro.

En el gráfico número 4 podemos observar que el cultivo con extracto concentrado presentó mayor grado de muerte celular de 79.9 %, seguido del extracto diluido 1:10 que presentó un 61.5 % y en último lugar el extracto diluido 1:50 que presentó un porcentaje menor de 36.3 % luego de 72 horas de incubación

CÉLULAS A-549 CON EL CISPLATINO EN UN MEDIO DE CULTIVO * A pH NEUTRO*****

Horas	Concentrado	Dilución 1:10	Dilución 1:50	Control negativo
6	10.0%	10.5%	9.5%	1.9%
12	18.0%	16.8%	9.3%	7.4%
24	24.6%	15.4%	18.8%	10.6%
36	35.5%	24.8%	32.5%	5.9%
48	81.9%	48.9%	41.3%	16.3%
60	77%	52.4%	47.9%	16.3%
72	83.9%	72%	70%	21.7%

GRÁFICO # 5



Autor: Luis Gustavo Riofrío Gaona

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

*Línea celular de cáncer de pulmón humano.

**Medio RPMI 1640.

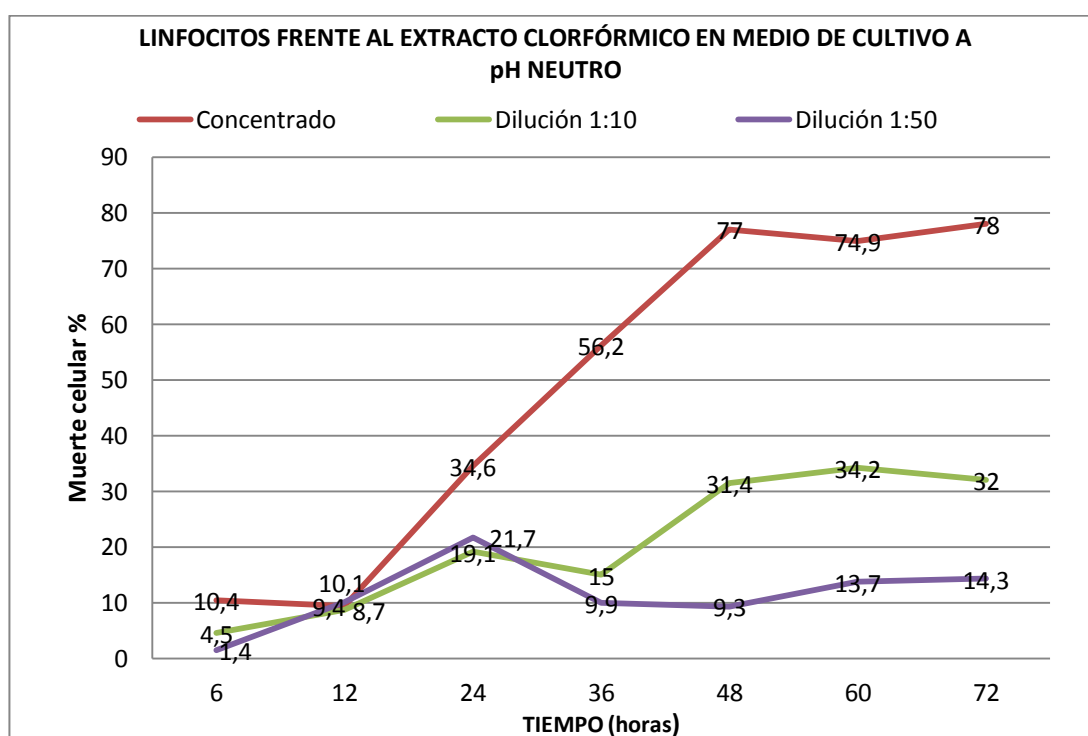
*** pH neutro.

El gráfico número 5 demuestra que el cultivo de células A-549 frente al cisplatino concentrado produce una muerte celular de 83.9% seguido del cisplatino diluido 1:10 con un 72 % y el cisplatino con dilución 1:50 presentando un 70% luego de 72 horas de incubación siendo el cisplatino concentrado el que produce mayor citotoxicidad.

CULTIVO DE CÉLULAS NORMALES (LINFOCITOS) FRENTE AL EXTRACTO CLOROFÓRMICO EN MEDIO DE CULTIVO A pH NEUTRO.

Horas	Concentrado	Dilución 1:10	Dilución 1:50
6	10.4%	4.5%	1.4%
12	9.4%	8.7%	10.1%
24	34.6%	19.1%	21.7%
36	56.2%	15.0%	9.9%
48	77.0%	31.4%	9.3%
60	74.9%	34.2%	13.7%
72	78%	32.0%	14.3%

GRÁFICO # 6



Autor: Luis Gustavo Riofrío Gaona

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

*Línea celular de cáncer de pulmón humano.

**Medio RPMI 1640.

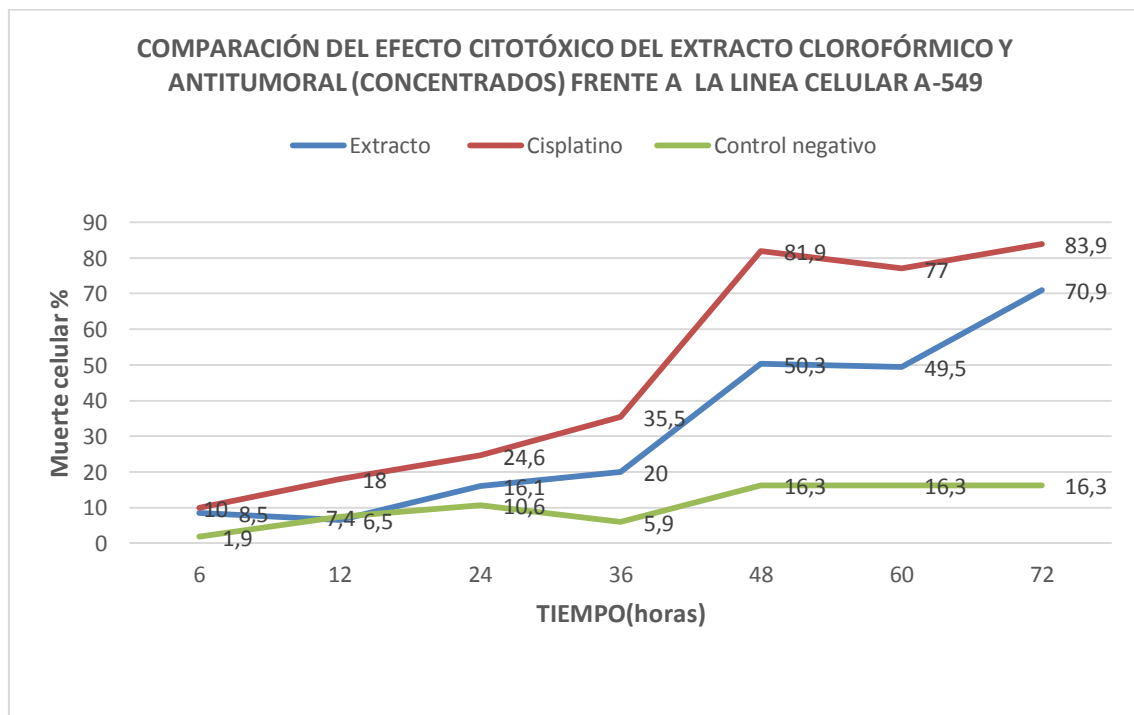
*** pH neutro.

En el gráfico número 6 se observa que el extracto clorofórmico concentrado produce un mayor grado de muerte celular con un 78 % produciendo una mayor citotoxicidad en relación al extracto diluido 1:10 y 1:50 con porcentajes de 32 % y 14.3 % respectivamente luego de un periodo de incubación de 72 horas.

COMPARACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO DEL EXTRACTO CLOROFÒRMICO Y ANTITUMORAL (CONCENTRADOS) SOBRE LA LÍNEA CELULAR A-549 EN MEDIO DE CULTIVO A pH NEUTRO.

Horas	6	12	24	36	48	60	72
Extracto (Concentrado)	8,5%	6,5%	16,1%	20%	50,3%	49,5%	70,9%
Cisplatino(concentrado)	10%	18%	24,6%	35,5%	81,9%	77%	83,9%
Control negativo	1,9%	7,4%	10,6%	5,9%	16,3%	16,3%	16,3%

GRÁFICO # 7



Autor: Luis Gustavo Riofrio Gaona

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

*Línea celular de cáncer de pulmón humano.

**Medio RPMI 1640.

*** pH neutro.

En el gráfico número 7 podemos observar que el extracto produce una muerte celular de 79.9 % sobre las células tumorales siendo relativamente menor en comparación con la producida por el medicamento cisplatino que es de 83.9 %.

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 neutro. Los resultados obtenidos demuestran que existe un efecto citotóxico en medio de cultivo RPMI a pH de neutro. La capacidad citotóxica del extracto clorofórmico a las 72 horas (periodo de tiempo en el que hubo mayor muerte celular) alcanzó un porcentaje de 70,9% de citotoxicidad, a diferencia del medicamento cisplatino usado como control positivo que presentó un efecto relativamente superior de 83.9% de citotoxicidad, sin embargo, frente a células normales como linfocitos de sangre periférica, el extracto es tóxico alcanzando un 78% de muerte celular lo cual no es muy alentador en esta investigación.

Según un estudio publicado en el 2006 por la Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública, sobre el efecto citotóxico selectivo in vitro de Muricin H (acetogenina de *Annona muricata*) en cultivos celulares de cáncer de pulmón se determinó que esta sustancia posee una potente actividad citotóxica frente a la línea tumoral H-460 (cáncer de pulmón de células grandes), llegando a superar al medicamento antitumoral 5-fluorouracilo y cisplatino de selección.

Todo esto se realizó in vitro mediante una ecuación de línea recta. Es decir que si el valor es >1 , indica que la sustancia es más citotóxica para las células tumorales que para las células normales, si es <1 , indica lo contrario, es por ello que con los resultados obtenidos de este estudio se demostró que los índices de selectividad para la línea celular (H- 460) de cáncer de pulmón fueron $>102,6$ es decir, es tóxico para las células cancerígenas, lo que presenta cierta similitud con nuestra investigación debido a que la *Annona cherimola* posee diversos compuestos naturales de utilidad biológica tales como alcaloides y acetogeninas las mismas que presentan un alto grado de citotoxicidad sobre diferentes líneas celulares tumorales.

Tal propiedad actúa sobre las mitocondrias y otras partes de las células cancerosas destruyéndolas, en su mayoría sin causar daño severo a células y tejidos sanos.

Otro estudio realizado por la Sociedad Científica de San Fernando Lima, Perú en el 2007 denominado efecto citotóxico de *Annona Muricata* (Guanábana) en cultivo de líneas celulares de adenocarcinoma gástrico y pulmonar, se comprobó que el extracto etanólico de las hojas de *Annona muricata* mostró tener mayor efecto citotóxico sobre las líneas tumorales C-678 (Adenocarcinoma gástrico de ratón) y H- 460 (cáncer de pulmón de células grandes), en comparación a nuestro estudio, se pudo apreciar que el efecto citotóxico del extracto clorofórmico concentrado en la línea celular A-549 luego de un periodo de incubación de 72 horas, produjo una elevada citotoxicidad que es significativa en nuestros resultados.

Como se observa en los resultados, el perfil citotóxico del extracto clorofórmico de las hojas de *Annona cherimola* en nuestro estudio es muy alentador por su alta citotoxicidad para células tumorales (A- 549) pero presenta una desventaja en cuanto a su toxicidad para las células normales (linfocitos humanos), La demostración in vitro de actividad citotóxica estudiada sería un poco escasa para validar cualquier efecto terapéutico y mucho más en el caso de enfermedades complejas y graves como el cáncer, por lo que se requiere disponer de más estudios que permitan hacer ensayos con mayores perspectivas que demuestren la eficacia y efectividad en humanos, antes de recomendar su uso.

8.- CONCLUSIONES:

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo investigativo se concluye lo siguiente:

- ❖ Se identificó que el grado de proliferación celular de células A-549 frente al extracto clorofórmico con dilución 1:10 a las 36 horas es mayor con 71 % en comparación con las demás diluciones y concentrado. Además el grado de proliferación disminuyó a las 72 horas presentando un resultado de 32.4 %. El relación al medicamento con dilución 1:10 el grado de proliferación fue de 0% a las 6 horas, 72.2 % a las 36 horas y 24.2 % a las 72 horas de incubación demostrando que existe un grado de proliferación mayor a las 36 horas y disminuye a las 72 horas.

- ❖ El extracto clorofórmico concentrado frente a los linfocitos produce un mayor grado de muerte celular de 78 % en un tiempo de 72 horas de incubación en relación a las demás concentraciones 1:10 y 1:50 que presentaron resultados menores de 32 % y 14.3 % respectivamente.

- ❖ Así mismo el extracto clorofórmico concentrado produjo un índice de citotoxicidad de 70.9 % en un tiempo de 72 horas de incubación, a diferencia del medicamento usado (cisplatino) que presentó un efecto mayor de 83.9 % citotoxicidad debido a que es específico para el tratamiento contra el cáncer.

9.- RECOMENDACIONES:

- Trabajar más con extractos: etanólico y acuoso debido a que el extracto clorofórmico durante los ensayos inhibe la liberación de acetogeninas de la hoja de la *Annona cherimola*.
- Continuar realizando investigaciones que evalúen las propiedades de la *Annona cherimola*, las cuales poseen un gran potencial como fuente de nuevas sustancias anticancerígenas para de esta manera crear nuevas alternativas de tratamiento contra el cáncer.
- Realizar estudios fitoquímicos de mayor profundidad sobre esta planta empleando técnicas modernas de la biología molecular que permitan identificar, evaluar y separar compuestos más puros de la planta en estudio.

10. BIBLIOGRAFÍA:

- ❖ Aguirre P, Parra M, Quinaloa G. (2003). Annona Cherimola. 09-02-2015, de ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL (ESPOL) Sitio web: http://www.cib.espol.edu.ec/Digipath/D_Tesis_PDF/D-32243.pdf
- ❖ Amaya R. (07 de 11 de 2013). Fitofármacos. Sitio web: <http://www.dbbe.fcen.uba.ar/contenido/objetos/Cea2013.pdf>
- ❖ Arana G. (26 de 06 de 2014). Principios Activos y Actividades Biológicas de Especies Vegetales Amazónicas. Sitio web: <http://www.iiap.org.pr/Upload/Conferencia/CONF247.pdf>
- ❖ Álvarez G, Villegas A. (2005.). Cáncer de pulmón Una Guía práctica. 19-01-2015, de Asociación Española Contra el Cáncer. Sitio web: https://www.aecc.es/comunicacion/publicaciones/documents/guia_ca_pulmon.pdf
- ❖ Castaño M, Zapata J. (06 de 03 de 2010). CULTIVOS CELULARES. Sitio web: <http://editorialbiogenesis.udea.edu.co/index.php/biogenesis/article/viewFile/252/252>
- ❖ Cueva P. (2013). El Cáncer en el Ecuador. 19/01/015, de SOLCA Quito Sitio web: <http://www.taringa.net/posts/salud-bienestar/17638672/El-Cancer-en-el-Ecuador.html>
- ❖ Cultek. (2010). Cultivos Celulares. 20/10/015: Sitio web: http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Cultivos%20Celulares/Aplica_Cultivos_Celulares_2010.pdf
- ❖ Chimondeguy D. (2010). Cáncer de Pulmón. Obtenido de SOCIEDAD ARGENTINA DE CIRUGIA:Sitio web: http://www.sact.org.ar/docs/relato_chimondeguy_.pdf
- ❖ Euguino A, Fernadez B, Garcia G, Garcia J. (2005). Canceer de pulmon . Asociacion española contra el cancer, 87. Sitio web: https://www.aecc.es/comunicacion/publicaciones/documents/guia_ca_pulmon.pdf
- ❖ Flores L, Mesa V. (03 de 06 de 2010). MONOGRAFIA SOBRE PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLOGICA CON DO ORGANISMOS MODELOS EN ACETOGENINAS DE ANNONACEAE CON ANTICIDAD BIOPESTICIDA. Sitio web: <http://repositorio.utpl.edu.co/dspace/bitstream/11059/351/1/58322F634ms.pdf>
- ❖ Goyenola G. (2007). Determinacion del pH. Guia para la utilizacion de las valijas viajeras, 2. Sitio web: http://imasd.fcien.edu.uy/difusion/educamb/propuestas/red/curso_2007/cartillas/tematicas/Determinacion%20del%20pH.pdf

- ❖ Guerrero J. (01 de 2006). QUÍMICA ANALÍTICA INSTRUMENTAL. Sitio web: <http://es.scribd.com/doc/91298304/quimica-analitica#scribd>
- ❖ James A. (2001). Cáncer Del Pulmón Guías De Tratamiento Para Los Pacientes Versión I. 8-02-2015, Sociedad Americana Del Cáncer Sitio web: http://www.hispasante.be/documentacion/guias/med/cancer/Cancer_pulmon_guias_pacientes.pdf
- ❖ Jiménez A. (2011). Departamento de medicina departemento de medicina preventiva, salud pública y microbiología médica. 19/01/15, de universidad de salamanca facultad de medicina departemento de medicina departemento de medicina preventiva, salud pública y microbiología médica Sitio web: http://gredos.usal.es/jspui/bitstream/10366/83284/1/DMPSPMM_Jim%C3%A9nezMassa_AnaEsther_C%C3%A1ncer.pdf
- ❖ Lomonte B. (2009). Técnicas de Laboratorio en Inmunología Clínica. 11/02/015, de Universidad de Costa Rica Sitio web: http://www.medic.ula.ve/idic/docs/clases/iahula/curso_2010/suplementario-tema16.pdf
- ❖ López M. (31 de 05 de 2012). MANUAL DE PLANTAS DE MEDICINA PARA GUINEA ECUATORIAL VADEMECUM plantas medicinales: Sitio web http://www.fundacionfrs.es/archivos/manual_plantas_medicinales_v2.pdf
- ❖ OMS. (20 de 11 de 2013). Estrategias de la OMS sobre la medicina tradicional. Obtenido de <http://web.minsal.cl/sites/default/files/files/s21201es.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/doc_dilluns_CP/pardo_patentesextractos plantas.pdf
- ❖ Paz J. (2006). Cáncer pulmonar. Guías de práctica clínica, 10. Sitio web: <http://www.neumologica.org/Archivos/ADULTOS/CANCER%20PULMONAR%20GPC.pdf>
- ❖ Quispe A. Riva D. Rojas J. Zavala D. Margarita C. Rivera P. Abraham J. Vaisberg W, 2009 . (2009). Efecto citotóxico de las semillas de Annona cherimola en cultivos de cáncer de cérvix, mama y leucemia mieloide crónica. Obtenido de Acta Médica Peruana: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172009000300003
- ❖ Rang H. Dale M. Ritter M. Flower R, (2006). Farmacología. Barcelona España: ELSEVIER

- ❖ Renata J. (2007). CULTIVO DE LA ANONA (*Annona cherimola*). 08-02-2015, de MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERÍA Sitio web: <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/a00109.PDF>
- ❖ Rubio A, Raviña A. (2007). Cribado de Cáncer de Pulmón. 19-01-2014, de Plan de Calidad para el Sistema Nacional de Salud del Ministerio de Sanidad y Política Social España Sitio web: <http://www.sergas.es/docs/Avalia-t/CribCancerPulmonMemFinal.pdf>
- ❖ Sociedad de lucha contra el cáncer. Registros Hospitalarios 2014 Solca Loja.
- ❖ Schlaepfer L, M J. (24 de 03 de 2015). Las plantas medicinales en la lucha contra. Obtenido de Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C. Sitio web: <http://www.redalyc.org/pdf/579/57916060003.pdf>
- ❖ Vardaro A. (2011). Cisplatino. 15/10/015, de Tuteur Sitio web: <http://www.tuteur.com.ar/www/prospectos/cisplatino.pdf>

11.- ANEXOS:

ANEXO 1 (OFICIO DIRIGIDO AL DIRECTOR DEL PROYECTO QUE PERMITA SER PARTE DEL PRESENTE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN).



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

Loja, de Julio de 2015

Doctor.

Miguel Marín Gómez, Mg. Sc,

DIRECTOR DEL LABORATORIO DE CULTIVO CELULAR

A petición verbal del interesado:

CERTIFICO:

Que el Sr, LUIS GUSTAVO RIOFRIO GAONA estudiante del **VIII MÓDULO** de la Carrera de **LABORATORIO CLÍNICO**, con cédula de identidad 1105668204 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 Licenciado en Laboratorio Clínico.

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

Atentamente.

Una firma manuscrita en tinta azul sobre un recuadro que contiene el texto "Atentamente".

Dr. Miguel Marín Gómez Mg, Sc.

DIRECTOR DEL PROYECTO

ANEXO 2: MANTENIMIENTO DE LA LÍNEA CELULAR A-549.



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

D18S539: 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 N8 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 10⁵ 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 500 ul de células y agregar 500 ul 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.

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 q esté descongelado. Evitar que las células permanezcan demasiado tiempo descongeladas.
- Añadir las células descongeladas rápidamente a un tubo Falcón y añadir 10 ml de medio de cultivo completo para así diluir el **DMSO** y disminuir su toxicidad.
- Centrifugar el Falcón a 800 rpm durante 3 minutos para obtener el pellet de células en el fondo.
- Eliminar el sobrenadante con una pipeta Pasteur y dejar el pellet de células.
- Resuspender el pellet de células en 4 ml de medio cultivo completo en el caso de crioviales con 1.5×10^6 cel. /ml y pipetear suavemente para homogenizar la suspensión.

- Pasar el contenido del tubo a una botella de cultivo el cual ya contiene 8ml de medio de cultivo completo y mezclar suavemente.
- Incubar a 37°C al 5% de CO₂.

ANEXO 4 (PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO RPMI COMPLETO CON pH NEUTRO).

1. Atemperar el medio de cultivo RPMI completo, Suero bovino fetal, penicilina/estreptomicina y anfotericina B.
2. En un matraz colocar 5 ml de suero bovino fetal.
3. Agregar 0,5 ml de penicilina.
4. Agregar 0,5 ml de anfotericina B.
5. Agregar 44 ml de RPMI incompleto.
6. Medir el pH con la ayuda del Peachímetro, el cual debe estar en 7 a 7.2.
7. Mezclar bien y guardar en refrigeración, rotulado.

PREPARACIÓN DEL EXTRACTO:

- **Solución de extracto 1 (concentrado):** Pesar 1 mg de extracto y disolver en 1 ml de DMSO al 10% (100 ul de DMSO + 900 ul de medio de cultivo completo), para esto disolver 100 ul de DMSO con 1 mg del extracto y luego añadir 900 ul de medio de cultivo.
- **Solución de extracto 2 (1:10):** Tomar 100 ul de la solución 1 de extracto y agregar 900 ul del medio de cultivo completo.
- **Solución de Extracto 3 (1:50):** Tomar 20 ul de la solución de extracto 1 y agregar 980 ul de medio de cultivo completo.

ANEXO 5 (PREPARACIÓN DE CONTROL POSITIVO).

CISPLATINO:

Solución concentrada 1: Se colocan directamente 25 ul de cisplatino, concentración de 50 mg/50 ml.

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

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

ANEXO 6 (TÉCNICA DE FICOLL HYPaque). (Técnica de centrifugación por gradiente de densidad para separar Células Mononucleares de Sangre Periférica (CMSP) de otras células sanguíneas).

1. Extraer 5ml de sangre venosa en un tubo tapa verde con anticoagulante heparina.
2. Colocar en un tubo Falcón, 4 ml de PBS o solución salina y adicionar 4 ml de sangre heparinizada.
3. En otro tubo colocar 4 ml de Reactivo Hystopaque y adicionar 4 ml de la sangre diluida con la solución PBS. Incorporar la sangre lentamente 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 (parte media de la separación) y trasvasarlos a otro tubo Falcón.
6. Agregar 1 ml de PBS y centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos.
7. Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet con 2 ml de medio de cultivo RPMI completo.
8. Realizar el conteo de las células con 20 ul del medio y 20 ul de azul de tripano.

ANEXO 7 (TRIPSINIZACIÓN DE CÉLULAS A-549).

1. Eliminar todo el contenido del 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 desprenden incubar de 2 a 3 minutos a 37°C.
5. Una vez desprendidas las células, agregar 10 ml de medio RPMI completo, eliminar, ese contenido a un tubo falcón y centrifugar 10 minutos a 1500 rpm.
6. Eliminar el sobrenadante, dejando el pellet de células.
7. Resuspender el pellet con 2 ml de medio de cultivo RPMI completo.
8. Contar las células tomando 20 ul del medio y 20 ul de azul de tripano.

ANEXO 8 (COLOCACIÓN DE CÉLULAS EN CADA POCILLO POR CÁLCULO PARA EXTRACTO CLOROFÓRMICO).

- Una vez realizado el contaje de las líneas celulares, distribuir 500.000 cel. /pocillo en 500 ul de medio de cultivo.
- Se podrá utilizar alrededor de 12 000.000 de células resuspendidas en 12 ml de medio de cultivo.
- Colocar 500 ul del medio con 500.000 células en cada una y añadir los extractos y los medicamentos como controles positivos en diferentes concentraciones, realizar este procedimiento por triplicado.
- Incubar las placas de cultivo en una incubadora de CO₂ al 5% y humedad del 98%.

ANEXO 9 (CONTAJE DE CÉLULAS CON AZUL DE TRIPANO, VIABILIDAD CELULAR).

1. Realizar el conteo de las células vivas y muertas para evaluar la viabilidad y citotoxicidad celular.
2. En placas de cultivo de 96 pocillos colocar 20 ul de cada una de las células con los extractos en las diferentes concentraciones, esto es: los medicamentos antitumorales, los linfocitos humanos y los controles negativos.
3. Extraer dichas células de manera mecánica frotando los pocillos donde se encuentran incubadas ya que estas células son adherentes y tienden a pegarse en el fondo.
4. En cada pocillo cargado con células, colocar 20 ul de azul de tripano y cargar en la cámara de Neubauer para su conteo.
5. Contar en los cuatro cuadrantes externos y el valor final multiplicar por 10, por 1000 y por 2.
6. Se realiza el mismo procedimiento a las seis horas después de la incubación, es decir: 6, 12, 24, 36, 48, 60 y 72 horas.

ANEXO 10 (PROLIFERACIÓN CELULAR).

- Las células que fueron incubadas con los diferentes extractos y medicamentos concentrados y diluidos se observaron luego de un periodo de 6, 36 y 72 horas de incubación en el microscopio invertido observando la forma típica de elongación.
- Posteriormente se contaron las células vivas en la cámara de Neubauer.
- De las células vivas contadas se calculó el porcentaje para evaluar el grado de proliferación celular.
- Para ello empleamos el cálculo siguiente:

$$\text{Proliferación \%} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ Cel. Elongadas} * 100}{\text{Total cel. Vivas}}$$

(ANEXO 11) CÁLCULOS CORRESPONDIENTES A LA VIABILIDAD CELULAR OBTENIENDO EL PORCENTAJE DE CÉLULAS VIVAS Y MUERTAS.

A las 6 horas de incubación:

ENSAYO DE: H2789 D.S. ANCHA GRUPO SUDORFÉTICO P4 NEUTRO con células A549

FECHA: 29-4-2015 HORA: 14:00 RESPONSABLE: Carmen Pineda

6 HORAS

A549 + EXTRACTO 1 500 000 cel./poquito V 73 91,2% M 7 8,2% 500 000 cel.	A549 + EXTRACTO 2 500 000 cel. V 80 90,1% M 6 9,1%	A549 + EXTRACTO 3 500 000 cel. V 75 91,4% M 7 8,5%	A549 + CISPLATINO 1 500 000 cel. V 60 81,5% M 7 10,4%	A549 + CISPLATINO 2 500 000 cel. V 65 81,0% M 8 10,5%	A549 + CISPLATINO 3 500 000 cel. V 71 89,2% M 8 10,1%
V 67 91,2% M 6 8,2%	V 63 91,3% M 6 8,6%	V 78 93,5% M 5 6,0%	V 68 89,4% M 8 10,5%	V 60 81,5% M 7 10,4%	V 62 88,5% M 8 11,4%
V 75 91,3% M 7 8,6%	V 72 94,7% M 4 5,2%	V 62 93,9% M 4 6,0%	V 60 90,9% M 6 9,0%	V 70 89,7% M 8 10,2%	V 65 92,2% M 5 7,1%
LH + EXTRACTO 1 V 55 91,2% M 3 5,1%	LH + EXTRACTO 2 V 50 92,5% M 4 7,1%	LH + EXTRACTO 3 V 48 91,3% M 2 2,0%	A549+25 uISOLVENTE 500 000 cel. V 45 91,2% M 2 2,1%	A549 CON MC 500 000 cel. V 47 97,5% M 1 2,1%	
V 48 88,2% M 6 11,1%	V 45 91,2% M 2 2,1%	V 45 100% M 0 0%	V 42 97,6% M 1 2,3%	V 52 98,1% M 1 1,8%	
V 45 89,1% M 8 10,9%	V 50 96,1% M 2 3,8%	V 46 97,2% M 1 2,1%	V 51 94,4% M 3 5,5%	V 58 98,3% M 1 1,6%	

7: 820 000 / 2 ml.
 V: 89,7%
 M: 10,2%

4: 360 000 / 2 ml.
 V: 100%
 M: 0%

100%
 100%
 100%
 100%
 100%
 100%

7: 4,4%
 7: 1,3%
 7: 3,3%
 7: 1,8%

Azul → Confluencia
 Rojo → Alteraciones en tamaño.
 → Alteraciones

C+
 C-
 PASTEUR

A las 12 horas de incubación:

12 HORAS

A549 + EXTRACTO 1 V 85 92,3% M 7 7,6% M: 6,4%	A549 + EXTRACTO 2 V 80 88,2% M 10 11,1%	A549 + EXTRACTO 3 V 90 91,8% M 8 8,1%	A549 + CISPLATINO 1 V 62 83,7% M 12 16,2%	A549 + CISPLATINO 2 V 68 83,9% M 13 15,0%	A549 + CISPLATINO 3 V 67 87,0% M 10 12,9%
V 88 93,6% M 6 6,3%	V 82 90,1% M 9 9,8%	V 90 92,7% M 7 7,2%	V 60 81,0% M 14 18,3%	V 65 89,2% M 16 19,7%	V 66 92,9% M 5 7,0%
V 85 91,1% M 7 5,5%	V 83 91,2% M 8 8,7%	V 88 91,6% M 5 5,3%	V 68 89,5% M 16 19,0%	V 62 85,1% M 11 14,8%	V 68 91,2% M 6 8,1%
LH + EXTRACTO 1 V 60 92,3% M 5 7,6%	LH + EXTRACTO 2 V 56 88,8% M 7 11,1%	LH + EXTRACTO 3 V 56 88,8% M 7 11,1%	A549+25 uISOLVENTE V 88 93,6% M 6 6,3%	A549 CON MC V 80 91,9% M 7 8,0%	
V 55 90,1% M 6 9,8%	V 55 88,7% M 7 11,2%	V 50 92,5% M 4 7,1%	V 76 95% M 4 5%	V 80 91,1% M 5 5,2%	
V 58 89,2% M 7 10,9%	V 50 96,1% M 2 3,8%	V 52 88,1% M 7 11,8%	V 75 92,5% M 6 7,4%	V 77 91,6% M 7 8,3%	

100%
 100%
 100%
 100%
 100%
 100%

7: 2,3%
 7: 10,1%
 7: 6,2%
 7: 7,2%

C-

A las 24 horas de incubación:

24 HORAS					
A549 +EXTRACTO 1	A549 +EXTRACTO 2	A549 +EXTRACTO 3	A549 +CISPLATINO 1	A549 + CISPLATINO2	A549 + CISPLATINO 3
V 100 83,3 M 20 16,6%	V 115 79,3% M 30 13,7%	V 118 84,8% M 21 15,1%	V 120 75% M 40 25%	V 120 85,7% M 20 14,2%	V 100 79,3% M 31 23,6%
V 120 82,7% M 25 17,2%	V 110 83,3% M 22 16,6%	V 120 85,7% M 20 14,2%	V 121 76,5% M 38 23,4%	V 120 86,9% M 18 13,0%	V 110 83,3% M 22 16,6%
V 118 85,5% M 20 14,4%	V 121 81,7% M 27 18,2%	V 125 81,4% M 29 18,8%	V 123 74,5% M 42 25,4%	V 118 80,8% M 28 19,1%	V 128 83,6% M 25 16,3%
LH + EXTRACTO 1	LH + EXTRACTO 2	LH + EXTRACTO 3	A549+25 uISOLVENTE	A549 CON MC	
V 40 66,6% M 20 33,3%	V 50 81,9% M 11 18,0%	V 48 84,7% M 10 17,2%	V 62 91,1% M 6 8,8%	V 58 93,5% M 4 6,4%	
V 38 64,4% M 21 35,5%	V 42 80,7% M 10 19,2%	V 40 76,9% M 12 23,0%	V 55 91,7% M 6 9,2%	V 56 88,8% M 7 11,1%	
V 37 64,5% M 20 35,5%	V 48 80% M 12 20%	V 39 75% M 13 25%	V 56 88,2% M 7 11,7%	V 48 85,7% M 8 14,2%	

Handwritten notes: $M: 16,0\%$, $M: 16,1\%$, $M: 16,0\%$, $M: 24,6\%$, $M: 15,4\%$, $M: 18,2\%$, $M: 13,0\%$, $M: 21,7\%$, $M: 9,9\%$, $M: 10,5\%$, $M: 34,6\%$, $M: 26,5\%$, $M: 32,8\%$, $M: 24,2\%$, $M: 24,8\%$, $M: 24,2\%$, $M: 32,8\%$, $M: 63,4\%$, $M: 26,1\%$, $M: 15\%$, $M: 9,2\%$, $M: 7,6\%$, $M: 5,9\%$, $M: 26,1\%$, $M: 15\%$, $M: 45\%$, $M: 9,2\%$, $M: 92,1\%$, $M: 71,6\%$, $M: 94,4\%$, $M: 5,9\%$.

A las 36 horas de incubación:

36 HORAS					
A549 +EXTRACTO 1	A549 +EXTRACTO 2	A549 +EXTRACTO 3	A549 +CISPLATINO 1	A549 + CISPLATINO2	A549 + CISPLATINO 3
V: 68 82,5% M 14 17,5%	V 58 74,2% M 12 25,7%	V: 52 73,2% M 19 26,7%	V: 61 67,0% M 30 32,9%	V: 65 74,2% M 25 27,7%	V: 52 63,4% M 30 36,5%
V: 66 81,4% M 15 18,5%	V: 56 77,7% M 16 22,2%	V 55 82,0% M 12 17,9%	V 52 61,9% M 32 38,0%	V: 70 77,7% M: 20 22,2%	V 60 68,9% M 27 31,0%
V: 55 75,8% M: 18 24,6%	V: 60 83,8% M: 12 16,1%	V 61 82,4% M 14 17,5%	V: 54 64,2% M 30 35,7%	V: 55 75,7% M: 18 24,6%	V 58 69,0% M 26 30,9%
LH + EXTRACTO 1	LH + EXTRACTO 2	LH + EXTRACTO 3	A549+25 uISOLVENTE	A549 CON MC	
V 46 73,0% M 17 26,9%	V: 50 83,3% M: 10 16,6%	V: 52 91,2% M: 5 8,77%	V: 62 92,5% M: 5 7,44%	V: 68 91,4% M 4 5,1%	
V: 50 73,5% M: 18 26,4%	V: 48 85,7% M 8 14,2%	V: 57 89,0% M: 7 10,9%	V: 65 92,2% M: 5 7,44%	V: 70 93,3% M: 5 6,6%	
V: 45 75% M: 15 25%	V 42 85,7% M: 7 14,2%	V 54 90% M: 6 10%	V: 64 91,4% M: 6 21,5%	V: 67 91,3% M: 4 5,6%	

Handwritten notes: $M: 20,0\%$, $M: 21,5\%$, $M: 20,7\%$, $M: 35,5\%$, $M: 24,2\%$, $M: 32,8\%$, $M: 63,4\%$, $M: 26,1\%$, $M: 15\%$, $M: 9,2\%$, $M: 7,6\%$, $M: 5,9\%$, $M: 26,1\%$, $M: 15\%$, $M: 45\%$, $M: 9,2\%$, $M: 92,1\%$, $M: 71,6\%$, $M: 94,4\%$, $M: 5,9\%$, $M: 26,1\%$, $M: 15\%$, $M: 45\%$, $M: 9,2\%$, $M: 92,1\%$, $M: 71,6\%$, $M: 94,4\%$, $M: 5,9\%$.

A las 48 horas de incubación:

48 HORAS					
A549 +EXTRACTO 1 V: 31 52,5% n: 28 47,5%		A549 +EXTRACTO 2 V: 37 59,6% n: 25 40,4%		A549 +EXTRACTO 3 V: 47 60,2% n: 31 39,7%	
A549 + CISPLATINO 1 V: 15 20,2% n: 59 79,7%		A549 + CISPLATINO 2 V: 40 51,2% n: 38 48,7%		A549 + CISPLATINO 3 V: 47 55,9% n: 34 44,0%	
LH + EXTRACTO 1 V: 10 22,2% n: 35 77,7%		LH + EXTRACTO 2 V: 30 66,6% n: 15 33,3%		LH + EXTRACTO 3 V: 32 76,7% n: 10 23,8%	
A549+25 uISOLVENTE V: 45 73,7% n: 16 26,2%		A549 CON MC V: 46 73,3% n: 12 20,8%			
V: 30 50% n: 30 50%		V: 40 51,2% n: 38 48,7%		V: 46 60,5% n: 30 39,4%	
V: 28 46,6% n: 32 53,3%		V: 35 53,8% n: 30 46,1%		V: 26 38,8% n: 41 61,1%	
V: 9 23,0% n: 30 76,9%		V: 34 69,3% n: 15 30,6%		V: 38 79,1% n: 10 20,8%	
V: 11 23,1% n: 36 76,8%		V: 30 69,7% n: 16 30,2%		V: 32 80,0% n: 8 20,0%	
V: 45 73,7% n: 16 26,2%		V: 44 70,5% n: 18 29,5%		V: 40 70,0% n: 17 29,2%	
V: 46 73,3% n: 12 20,8%		V: 47 79,6% n: 12 20,3%		V: 38 69,0% n: 17 30,9%	
n: 31,3%		n: 27,5%		n: 28,3%	
n: 45,0%		n: 50,0%		n: 32,7%	
n: 43,7%		n: 76,9%		n: 43,7%	
n: 40,5%		n: 45,0%		n: 52,5%	
n: 47,5%		n: 47,5%		n: 47,5%	

A las 60 horas de incubación:

60 HORAS					
A549 +EXTRACTO 1 V: 35 53,8% n: 30 46,1%		A549 +EXTRACTO 2 V: 33 55,1% n: 26 44,9%		A549 +EXTRACTO 3 V: 40 59,7% n: 27 40,2%	
A549 + CISPLATINO 1 V: 18 23,6% n: 58 76,3%		A549 + CISPLATINO 2 V: 38 48,7% n: 40 51,2%		A549 + CISPLATINO 3 V: 40 53,3% n: 35 46,6%	
LH + EXTRACTO 1 V: 15 33,3% n: 30 66,6%		LH + EXTRACTO 2 V: 40 66,6% n: 20 33,3%		LH + EXTRACTO 3 V: 30 65,2% n: 16 34,7%	
A549+25 uISOLVENTE V: 47 72,3% n: 18 27,6%		A549 CON MC V: 42 77,7% n: 12 22,2%			
V: 27 46,5% n: 31 53,4%		V: 32 54,2% n: 27 45,7%		V: 37 54,4% n: 31 45,5%	
V: 30 50,8% n: 29 49,1%		V: 30 54,5% n: 25 45,4%		V: 36 54,5% n: 30 45,4%	
V: 19 40,4% n: 28 59,5%		V: 38 69,8% n: 18 30,1%		V: 28 65,4% n: 15 34,8%	
V: 18 39,1% n: 28 60,8%		V: 32 62,7% n: 21 37,2%		V: 27 72,9% n: 10 27,0%	
V: 47 72,3% n: 18 27,6%		V: 46 75,4% n: 15 24,5%		V: 39 76,4% n: 12 23,5%	
V: 42 77,7% n: 12 22,2%		V: 41 69,4% n: 18 30,5%		V: 39 67,2% n: 19 32,7%	
n: 62,3%		n: 34,2%		n: 25,2%	
n: 40,5%		n: 45,0%		n: 52,5%	
n: 47,5%		n: 47,5%		n: 47,5%	

A las 72 horas de incubación:

72 HORAS

AS4 g/l

86,1% 73,8% 83,5% 72,1% 79,5%

RKO + EXTRACTO 1	RKO + EXTRACTO 2	RKO + EXTRACTO 3	RKO + FLUORACILO 1	RKO + FLUORACILO 2	RKO + FLUORACILO 3
V 24 32,4% M 50 67,5%	V 10 17,8% M 46 82,1%	V 15 13,0% M 37 86,9%	V 10 16,9% M 49 83,0%	V 16 24,2% M 50 75,7%	V 12 18,4% M 53 81,5%
V 15 23,8% M 48 76,1%	V 5 9,0% M 50 90,9%	V 17 31,4% M 37 68,5%	V 8 12,6% M 55 87,3%	V 25 32,0% M 53 67,9%	V 20 18,7% M 57 81,2%
V 20 30,7% M 45 69,2%	V 8 14,5% M 47 85,4%	V 18 33,9% M 35 66,0%	V 12 18,4% M 52 81,5%	V 20 27,0% M 54 72,9%	V 17 23,9% M 54 76,0%
LH + EXTRACTO 1	LH + EXTRACTO 2	LH + EXTRACTO 3	RKO + 25 UI SOLVENTE	RKO CON MC	
V 5 11,9% M 37 88,0%	V 25 71,4% M 10 28,5%	V 28 60,8% M 18 39,1%	V 35 71,4% M 14 28,5%	V 45 76,1% M 14 23,7%	
V 3 7,8% M 35 92,1%	V 21 65,6% M 11 34,3%	V 30 75% M 10 25%	V 32 76,1% M 10 23,8%	V 46 74,1% M 16 25,8%	
V 4 11,7% M 30 88,2%	V 20 66,6% M 10 33,3%	V 32 68,0% M 15 31,9%	V 42 71,2% M 17 28,8%	V 50 72,4% M 19 27,5%	

M: 83,9%
 M: 72,1%
 M: 79,5%
 M: 32,0%
 M: 25,6%
 M: 27,0%
 M: 25,1%
 M: 25,1%

X no confluyen

(ANEXO 12) CÁLCULOS CORRESPONDIENTES A ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR.

A LAS 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
Cel. vivas: 0 Cel. elongadas: 0 Proliferación: 0%	0 0 0%	0 0 0%	0 0 0%	0 0 0%	0 0 0%
A 549 + SOL	A 549 + MC				
Cel. vivas: 0 Cel. elongadas: 0 Proliferación 0%	0 0 0%				

A LAS 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
Cel. Vivas: 68 Cel. elongadas : 54 Proliferación: 79%	58 43 74%	52 38 73%	61 41 67%	65 47 72%	52 33 63%
A 549 + SOL	A 549 + MC				
Cel. Vivas: 62 Cel. Elongadas: 59 Proliferación: 95%	68 64 94%				

A LAS 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
Cel. Vivas: 24 Cel. Elongadas: 8 Proliferación: 32.4 %	10 2 17 %	15 2 13. %	10 2 16 %	16 4 24 %	12 2 18. %
A 549 + SOL	A 549 + MC				
Cel. Vivas: 35 Cel. Elongadas: 25 Proliferación: 71. %	45 34 76 %				

ANEXO 13 (PRUEBAS DE ESTADISTICA).

PRUEBAS APLICADAS EN EL ENSAYO CON EXTACTO CLOROFÓRMICO EN MEDIO DE CULTIVO A pH NEUTRO FRENTE A CÉLULAS A-549

ADEBA:

Variable dependiente:

Factores Var.	GL	F cal	F Tabular
Tratamiento	27	95.07	1.72

R-cuadrado	Coefficiente Var
0.979423	14.02170

PRUEBA DE DUNCAN

Prueba de Rango Múltiple de Duncan por su valor:

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

T - STUDENT:

Análisis Variable:

T calculado	T tabular
1.27	2.16

PRUEBAS APLICADAS EN EL ENSAYO CON CISPLATINO FRENTE A CÉLULAS
A-549

ADEBA:

Variable dependiente:

Factores Var	GL	F cal	F tabular
Tratamiento	27	103.16	1.72

R-cuadrados	Coef Var
0.980984	11.20918

PRUEBA DE DUNCAN

Prueba de Rango Múltiple de Duncan por su valor.

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

T STUDENT

Análisis Variable:

T calculado	T tabular
3.40	2.16

**PRUEBAS APLICADAS EN EL ENSAYO CON LINFOCITOS FRENTE AL
EXTRACTO CLOROFÓRMICO**

ADEBA:

Variable dependiente:

Factores Var	G L	F cal	F tabular
Tratamiento	27	107.67	1.72

R-cuadrado	Coef Var
0.981769	3.919531

PRUEBA DE DUNCAN:

Prueba de Rango Múltiple de Duncan por su valor

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

T - STUDENT

Análisis Variable:

T valor	T Tabular
3.57	2.16

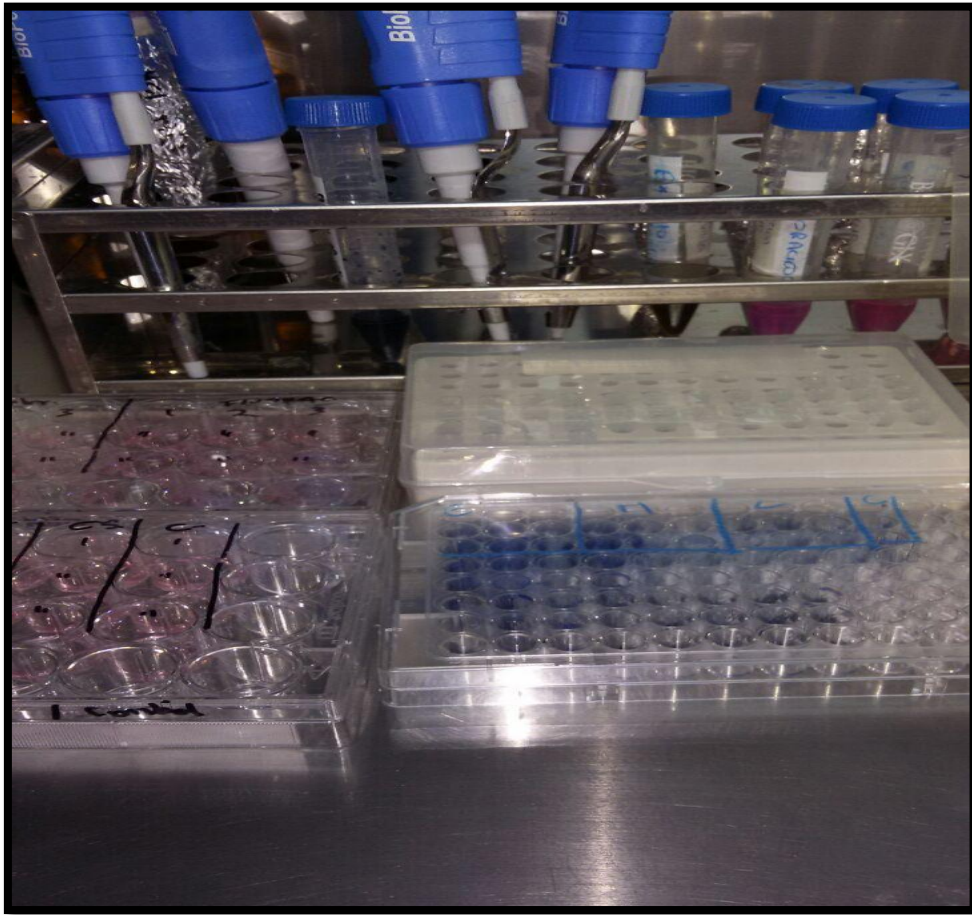
ANEXO 15: FOTOS

PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO.



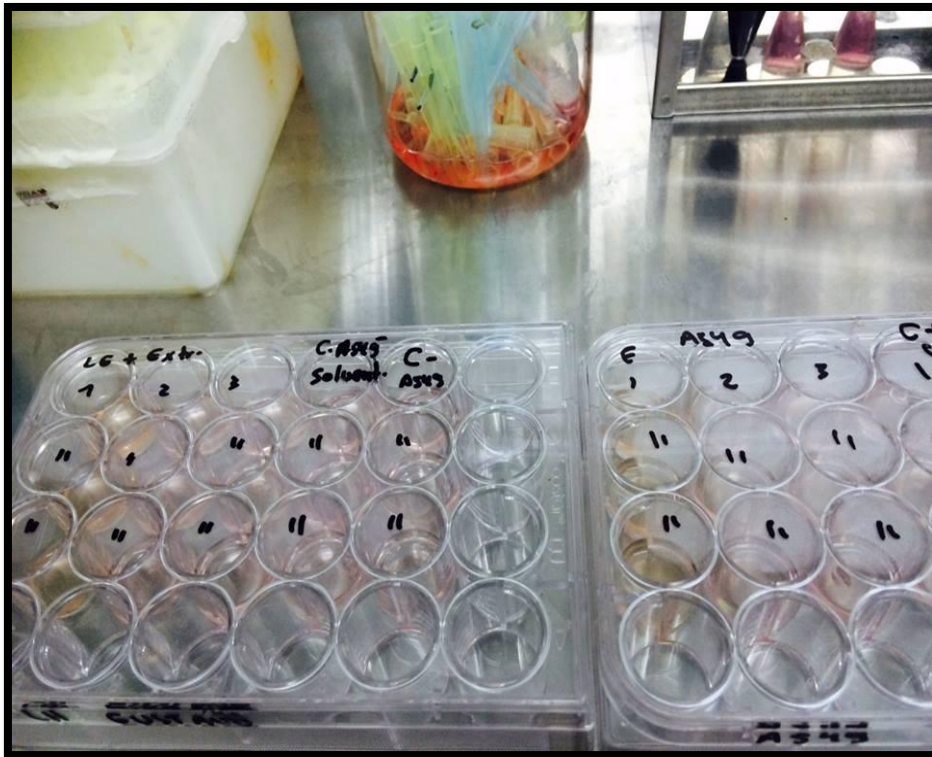
- Atemperar el medio de cultivo, suero bovino, penicilina/ esteptomicina y anfotericina B.
- En un matraz colocar 5ml de suero bovino, 0,5 ml de anfotericina B y penicilina.
- Agregar 44 ml de RPMI incompleto y medir el pH (nuetro).
- Mezclar, rotular y refrigerar .

TRIPSINIZACIÓN DE CÉLULAS.



- Eliminar todo el contenido de la botella y agregar medio de cultivo.
- Agregar la tripsina especial para cultivo.
- Incubar a 37 ° C por 2 a 3 minutos para luego centrifugar por 10 minutos.
- Eliminar el sobrenadante.
- Contar las células tomando 20 ul de medio y 20 ul de azul de tripano.

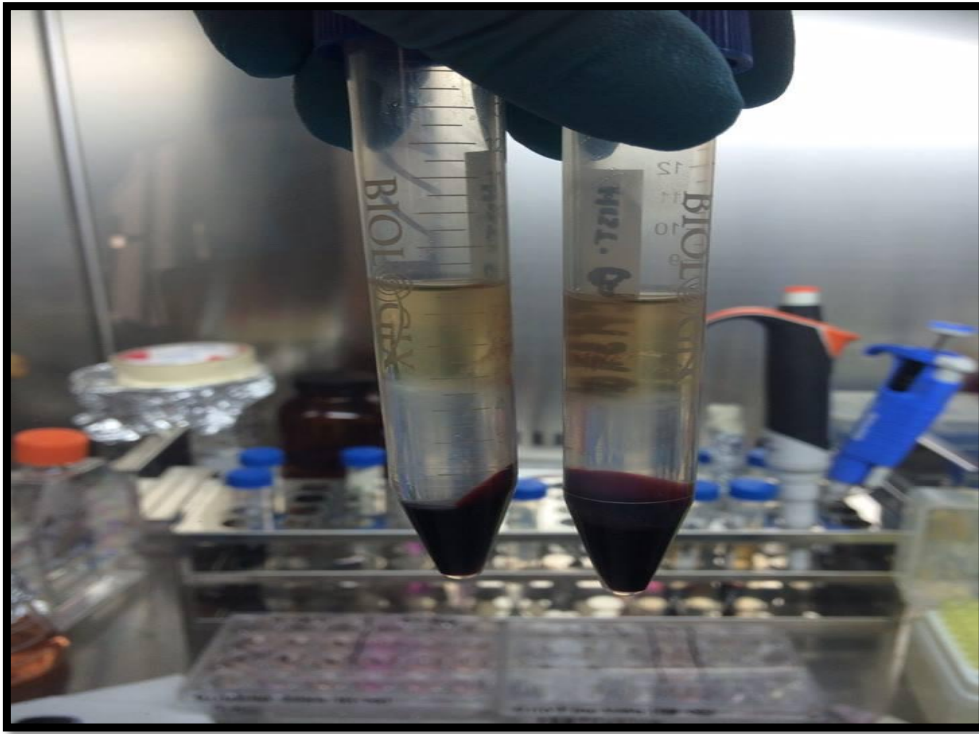
PREPARACIÓN DE EXTRACTO Y CISPLATINO EN DIFERENTES CONCENTRACIONES.



- Solución de extracto 1 (concentrado).
- Solución de extracto 2 (1:10).
- Solución de Extracto 3 (1:50).

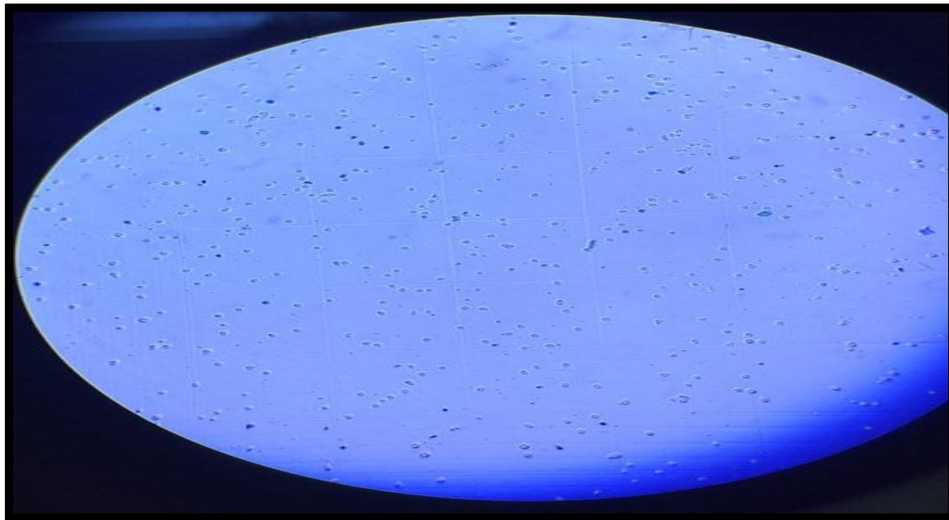
- Solución cisplatino 1 (concentrada)
- Solución cisplatino 2 (1:10).
- Solución cisplatino 3 (1:50).

SEPARACIÓN DE LINFOCITOS: (Técnica de técnica de ficoll hypaque).



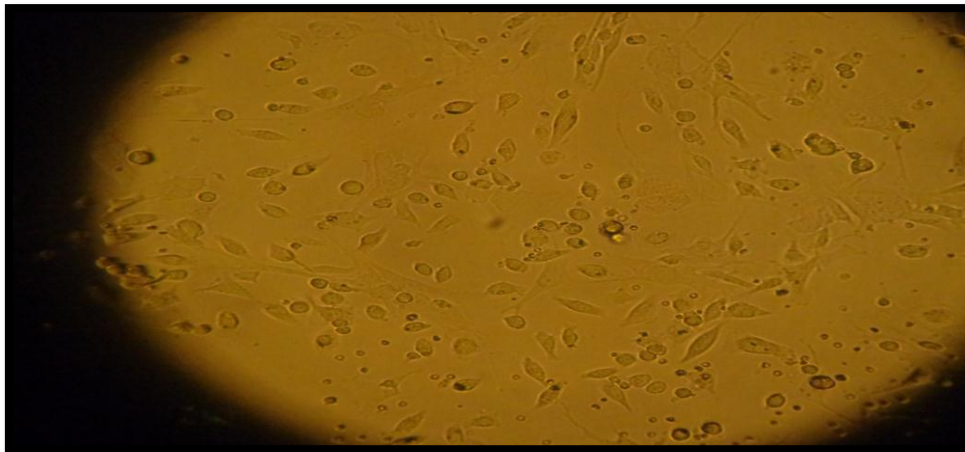
- Extraer 5ml de sangre venosa.
- Centrifugar a 2000 rpm durante 15 minutos.
- Extraer 1ml de los linfocitos que se encuentran en la interfase
- Eliminar el sobrenadante.
- Realizar el conteo de las células.

CONTAJE: Viabilidad Celular y linfocitos humanos.



- Realizar el conteo de las células vivas.
- En placas de cultivo de 96 pocillos colocar 20 ul de cada una de las células.
- En cada pocillo con células colocar 20 ul de azul de tripano
- Contar en un intervalo de 6, 12, 24, 36, 48, 60 y 72 horas.

PROLIFERACIÓN CELULAR.



- Las células que fueron incubadas con los diferentes extractos y medicamentos concentrados y diluidos se observaron luego de un periodo de 6, 36 y 72 horas.
- Contar células vivas en la cámara de Neubauer.
- De las células vivas se calculó el porcentaje para evaluar el grado de proliferación celular.

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
PORTADA.....	I
CERTIFICACIÓN.....	II
AUTORÍA.....	III
CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS.....	IV
DEDICATORIA.....	V
AGRADECIMIENTO.....	VI
1. TÍTULO.....	1
2. RESUMEN.....	2
SUMMARY.....	3
3. INTRODUCCIÓN.....	4
4. REVISIÓN DE LITERATURA.....	7
4.1 Cáncer de pulmón.....	7
4.2 Medicina tradicional.....	7
4.3 Plantas medicinales.....	8
4.4 Fitofármacos.....	8
4.5 Cisplatino.....	9
4.6 Principio activo.....	9
4.7 Acetogeninas.....	9
4.8 Annona Cherimola.....	9
4.9 Extracto.....	11
4.10 pH.....	12
4.11 Cultivo celular.....	12
4.12 Líneas celulares.....	12
4.13 Obtención de células linfoides.....	13
4.14 Factores básicos para la supervivencia celular.....	13
4.15 Medios de cultivo.....	13

4.16	Criopreservación.....	14
4.17	Viabilidad celular.....	15
4.18	Proliferación celular	15
5.	MÉTODOS, TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS DEL ANÁLISIS.....	16
6.	RESULTADOS.....	19
7.	DISCUSIÓN.....	26
8.	CONCLUSIONES.....	28
9.	RECOMENDACIONES.....	29
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	30
11.	ANEXOS	33

**PROYECTO DE TESIS PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
LICENCIADO EN LABORATORIO CLÍNICO.**

TEMA: 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 NEUTRO.

1. PROBLEMÁTICA

En el mundo, el cáncer es un padecimiento responsable de un sin número de muertes. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que en el año 2008, fallecieron 7.6 millones de personas, aproximadamente 13% del total de fallecimientos, y se estima que para el año 2030, aumentará a 13.1 millones (OMS, 2013).

En América el número de fallecidos fue de 1.2 millones de personas en 2008 por cáncer; afectando en su mayoría a hombres principalmente en la próstata, pulmón, colonorrectal y estómago; y las mujeres en la mama, pulmón, colonorrectal y cervicouterino (OPS, 2013).

El cáncer de pulmón, enfermedad oncológica que representa un problema de salud pública a nivel mundial, por lo general sus manifestaciones clínicas se presentan en relación a la ubicación del tumor primario o de su metástasis. (Ochoa F, Chávez M, Mac G, Renner D, Schneeweiss L, 2003).

La incidencia anual del cáncer de pulmón a nivel mundial es de 1,4 millones de casos y la mitad de estos tumores (49.9%) se localizan en los países industrializados, como Canadá, Dinamarca y Australia. En el año 2006 en Europa se estimó alrededor de 236.000 muertes relacionadas con cáncer de pulmón, 172.000 muertes entre los hombres, representando el 26,3 % del total de muertes por cáncer y 64.000 muertes entre las mujeres que corresponde al 12,5 % del total de muertes por cáncer (Rubio A., Raviña A. 2009).

En España el número de casos de cáncer de pulmón ha venido aumentando de modo permanente de permanencia con mayor incidencia en hombres, estimándose que cada año se diagnostican alrededor de 20.000 casos nuevos representando un 12% de todos los cánceres. Según datos del Instituto Nacional de Estadística (INE), en España el cáncer de pulmón es una patología que se encuentra aumentando en forma permanente y cuenta con una mortalidad más elevada por enfermedades oncológicas (Jiménez A, 2011)

Para el año 2009 en Estados Unidos el número de casos por este mal fue de 219.000 dando un total de 159.000 muertes. En efecto, el carcinoma colorrectal, mama y próstata e han sido responsables de 118.000 muertes. (Jiménez A, 2011).

En Ecuador para el año 2006, los tumores malignos fueron la tercera causa de muerte después de las enfermedades del sistema circulatorio y causas externas de morbilidad y mortalidad. La tasa de mortalidad de cáncer en el Ecuador se ha ido incrementando progresivamente durante el año 2004 al 2006, situándose para el año 2006 en 61 x 100.000 habitantes. (Campozano J. y Salazar C. 2010)

Su incidencia es mucho menor a diferencia de otros países, dando así que para el año 2013 el número de personas con cáncer de pulmón fue de 468 casos, representando una tasa de 5.99 por cada 100. 000 habitantes (Cueva, P. 2013).

En la ciudad de Loja desde el año 1997 hasta el 2007, se han presentado 55 casos de pulmón: 23 casos en mujeres, y 32 casos en hombres. Entre los años 2013 a 2014 se ha registrado una disminución de casos de cáncer de pulmón encontrando 6 en mujeres y 5 hombres dando un total de 11 casos según el registro de tumores de SOLCA, Núcleo de Loja(SOLCA LOJA. 2014)

El cáncer de pulmón ha sido un tema de discusión de salud en la ciudad de Loja, por lo general esta se ha convertido en una enfermedad que en los últimos años aumentado su incidencia. Se sitúa entre los canceres más comunes tanto en hombres como en mujeres. Alrededor del 11% de las personas fumadoras presentan cáncer de pulmón lo que puede significar que su etiología es de tipo genético que predisponen a determinadas personas a sufrir esta enfermedad. (Larráyo, M., 2011).

El cáncer de pulmón distingue dos tipos de cáncer con distinta epidemiología, factores de riesgo, tratamiento, y pronóstico y se ha dividido en: el cáncer microcítico de pulmón (SCLC), que constituye el 11% (más agresivo), y el cáncer no microcítico de pulmón (NSCLC), que representa el 85%, que a su vez presenta varios subtipos: el Adenocarcinoma 30% (común en no fumadores), el carcinoma escamoso 50% (menos frecuente) y el carcinoma de células grandes 5% (no diferenciado) (Larráyo, M., 2011).

Ahora en la actualidad se han logrado grandes avances en cuanto al tratamiento y diagnóstico de cáncer de pulmón, desarropando así nuevas terapias mucho más específicas y menos tóxicas, cuyo propósito es bloquear el desarrollo y crecimiento de las células que originan el cáncer de pulmón. (Coso A. 2011-2014).

Uno de los grandes avances es el hallazgo de la actividad que presenta la *Annona cherimola*, un árbol tropical originario del país de Perú y Ecuador, que es usado en la medicina tradicional.

Esta planta posee diversos compuestos naturales de interés biológico tales como alcaloides y acetogeninas las mismas que tienen una acción directa sobre las mitocondrias, el ATP, el aparato de Golgi y las membranas y plasmas celular de las células cancerosas destruyéndolas selectivamente sin dañar las células y tejidos sanos, además de estos, contienen otros componentes que actúan a nivel enzimático y molecular y que han mostrado citotoxicidad frente a las líneas tumorales humanas como A-549 (carcinoma de pulmón), MCF-7 (carcinoma de mama) entre otros, demostrando así excepcionales beneficios los mismos que pueden ser aplicados en el tratamiento de cáncer. (Quispe, A., Riva., D. Rojas, J. Zavala., D. Margarita. Rivera., P. Abraham J. 2009)

FUNDAMENTACION DEL PROBLEMA:

¿Cuál es el efecto citotóxico del extracto clorofórmico de las hojas de *Annona cherimola* contra la proliferación de células malignas de cáncer de pulmón

2. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de pulmón es un tipo de cáncer que afecta a ambos sexos, generalmente en personas mayores de 44 años, encentrándose como una de las principales enfermedades de causa de muertes dentro de las patologías oncológicas.

En los últimos años, se han producido grandes e importantes avances en el tratamiento del cáncer de pulmón, nuevas terapias mucho más específicas y menos tóxicas, cuyo propósito es bloquear el desarrollo y crecimiento de las células que originan el cáncer de pulmón.

Ante este problema de salud pública se ha tratado de investigar productos naturales con plantas medicinales que contengan efectos positivos en el tratamiento, ya que la aplicación de tratamientos como la quimioterapia y radioterapia y la administración de fármacos pueden producir múltiples efectos secundarios en el paciente.

Diversos productos naturales que derivan del género *Annona* han sido utilizados en el tratamiento del cáncer. Esta planta ha sido una fuente invaluable de compuestos antitumorales relevantes en la terapia anticancerosa ya que posee diversos compuestos puros que han demostrado actividad antitumoral frente a células cancerígenas.

Se ha reportado diversos estudios acerca del efecto citotóxico y los compuestos naturales de interés biológico de la *Annona cherimola* tales como alcaloides y acetogeninas. Compuestos aislados de las semillas y de hojas de esta planta que han mostrado citotoxicidad frente a diferentes líneas tumorales.

Es por ello que el objetivo de la presente investigación es evaluar y demostrar la actividad citotóxica del extracto clorofórmico obtenido de las hojas de la *Annona cherimola* frente al cultivo de líneas celulares de cáncer de pulmón en un medio de cultivo con pH neutro, esperando obtener resultados satisfactorios en esta investigación, los mismos que podrían beneficiar y aportar al mejoramiento de la calidad de vida de la población en general que padecen de este mal.

3. OBJETIVOS

Objetivo General:

- Determinar el efecto citotóxico del extracto clorofórmico de las hojas de *Annona cherimola* en una línea celular de cáncer de pulmón en un medio de cultivo con pH neutro.

Objetivos Específicos:

- Determinar el grado de proliferación celular de acuerdo al grado de concentración del extracto clorofórmico con pH neutro
- Medir la viabilidad celular del cultivo de líneas celulares tumorales de cáncer de pulmón en el extracto clorofórmico con un pH neutro.

4. MARCO TEÓRICO

- 5.1 Cáncer de pulmón
 - 5.1.1 Anatomía del Pulmón
 - 5.1.2 Epidemiología de cáncer de Pulmón
 - 5.1.3 Factores de riesgo
 - 5.1.4 Tratamiento
- 5.2 *Annona cherimola*
 - 5.2.1 Taxonomía y morfología
 - 5.2.2 Origen
 - 5.2.3 Usos y beneficios
 - 5.2.4 Actividad Citotóxica
 - 5.2.5 Aplicación Médica
- 5.3 Extractos
 - 5.3.1 Extracto clorofórmico
 - 5.3.2 Obtención de extracto clorofórmico
- 5.4 Cultivo
 - 5.4.1 Cultivo Celular
 - 5.4.2 Tipos de cultivo celular
 - 5.4.3 Cultivo primario
 - 5.4.4 Líneas celulares
 - 5.4.5 Células linfocíticas
 - 5.4.6 Obtención de células linfocíticas en sangre periférica
 - 5.4.7 Cepas celulares
- 5.5 Tipos de crecimiento celular
 - 5.5.1 Células adherentes o cultivos fijos
 - 5.5.2 Células no adherentes o cultivos en suspensión
- 5.6 Factores básicos para la supervivencia celular
- 5.7 Medios de cultivo
- 5.8 Clasificación de los medios de cultivo
 - 5.8.1 Medio esencial mínimo (MEM):
 - 5.8.2 Medios de crecimiento
 - 5.8.3 Medios de mantenimiento
 - 5.8.4 Medios selectivos

- 5.8.5 Medios de congelación
- 5.9 Preparación de los medios de cultivo
- 5.10 Criopreservación
- 5.11 Viabilidad celular
- 5.12 Proliferación celular

5. METODOLOGÍA

Tipo de estudio:

La presente investigación será de diseño Experimental – Prospectiva.

Área de Estudio:

La presente investigación se la realizará en la ciudad de Loja, en los Laboratorios de biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.

Técnicas y procedimiento:

Proliferación Celular: realizaremos dos cultivos, el primero que permitirá el incremento de células tumorales en un medio de cultivo, el cual contará con los nutrientes necesarios para favorecer el crecimiento de la línea celular, y el segundo cultivo con la adición del extracto.

Viabilidad Celular: La viabilidad celular es la determinación simultánea de células vivas y muertas en una muestra total, tras un determinado estímulo o tratamiento; para su evaluación se utilizó el método cuantitativo de azul de tripano para teñir las estructuras y evaluar la integridad de la membrana, posteriormente se colocó en la cámara de Neubauer y se observó en el microscopio de inversión; se contó el número de células presentes en cada campo.

Fase Post-analítica

- Validación y entrega de resultados obtenidos

Controles dentro del estudio:

POSITIVOS:

- Línea celular de cáncer de pulmón, más el extracto clorofórmico en medio de cultivo celular RPMI a pH Neutro
- Línea celular de cáncer de pulmón, más el fármaco (Cisplatino), en medio RPMI a pH Neutro.

NEGATIVOS:

- Células normales, en medio de cultivo RPMI a pH Neutro

Evaluación de Resultados:

Los resultados obtenidos, se tabularan mediante el Sistema de Análisis Estadístico (SAS).

6. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Variable	Definición	Indicadores	Escala
Extracto clorofórmico	Sustancia que se obtiene a partir del secado de hojas por medio de trituración, rotoevaporación al vacío, centrifugación, y filtración.	Obtención del extracto	Peso/Volumen
Líneas celulares	Cultivo celular que tiene alta capacidad de multiplicarse in vitro, establecido a partir del primer subcultivo de un cultivo primario y que tiene las mismas características que el tejido de origen.	Adquisición de las mismas por medio de la Universidad Técnica Particular de Loja. (UTPL)	Viales

7. CRONOGRAMA

TIEMPO	2014				2015						
	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio
ACTIVIDADES											
Elaboración del proyecto de investigación	X	X	X	X							
Presentación y aprobación del proyecto de investigación					X	X					
Ejecución del proyecto en el laboratorio							X	X	X		
Obtención de resultados										X	
Elaboración de resultados										X	
Elaboración del informe final										X	X
Presentación del informe final											X

BIBLIOGRAFÍA:

- OPS. (2014). ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DE... DÍA MUNDIAL CONTRA EL CÁNCER (4 DE FEBRERO)". 19/01/2014, de INSTITUTO NACIONAL DE ESTADISTICA Y GEOGRAFIA Sitio web: <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2014/cancer0.pdf>
- Ochoa F, Chávez M, Mac G, Renner D, Schneeweiss L, 2003). (2003). Síndromes para neoplásicos. Su asociación con el carcinoma pulmonar. 19/01/15, de Cirugía y Cirujanos Sitio web: <http://www.medigraphic.com/pdfs/circir/cc-2003/cc0321.pdf>
- Rubio, A., Raviña, A. (2007). Cribado de Cáncer de Pulmón. 19-01-2014, de Plan de Calidad para el Sistema Nacional de Salud del Ministerio de Sanidad y Política Social España Sitio web: <http://www.sergas.es/docs/Avaliat/CribCancerPulmonMemFinal.pdf>
- Paz J. (2006). GUÍAS DE PRÁCTICA CLÍNICA. 19/01/15, de FUNDACIÓN NEUMOLÓGICA COLOMBIANA Sitio web: <http://www.neumologica.org/Archivos/ADULTOS/CANCER%20PULMONAR%20GPC.pdf>
- Isla, D, Sánchez J. (2011). Hablemos del Cáncer de Pulmón con Roche. 19-01-2014, de Asociación Roche; Sitio web: http://www.roche.es/content/dam/internet/corporate/roche/es_ES/documents/HABLEMOS_CANCER_PULMON_ok.pdf.
- Jiménez A. (2011). Departamento de medicina departamento de medicina preventiva, salud pública y microbiología médica. 19/01/15, de universidad de salamanca facultad de medicina departamento de medicina departamento de medicina preventiva, salud pública y microbiología médica Sitio web: http://gredos.usal.es/jspui/bitstream/10366/83284/1/DMPSPMM_Jim%C3%A9nezMassa_AnaEsther_C%C3%A1ncer.pdf
- Cueva P. (2013). El Cáncer en el Ecuador. 19/01/015, de SOLCA Quito Sitio web: <http://www.taringa.net/posts/salud-bienestar/17638672/El-Cancer-en-el-Ecuador.html>
- Larráyo, M. (2011). Relevancia Funcional del VEGFA y sus receptores en cáncer de pulmón. 19/01/015, de Universidad de Navarra Sitio web: <http://dadun.unav.edu/handle/10171/34913>

- Sociedad de lucha contra el cáncer. Registros Hospitalarios 2014. Solca Loja.
- Sociedad de Lucha contra el cáncer. Registro de tumores Loja
- Coso O. (2011-2014). FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES. 19/0115, de Universidad de Buenos Aires Sitio web: http://www.uba.ar/archivos_secyt/image/CTA%201%20-%20CS%20DE%20LA%20SALUD%20HUMANA.pdf
- Quispe A; Callacondo D; Rojas J; Zavala D; Posso M; Vaisberg A. 2009). (2009). Efecto citotóxico de las semillas de Annona cherimola en cultivos de cáncer de cérvix, mama y leucemia mieloide crónica. 19/01/15, de scielo Sitio web: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172009000300003.