



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

ÁREA DE LA SALUD HUMANA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

TÍTULO

“Efecto citotóxico del extracto etanólico de hojas de Annona Cherimola en una línea celular de cáncer de colon humano en medio de cultivo con pH ácido”

TESIS PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE LICENCIADA EN
LABORATORIO CLÍNICO

AUTORA:

Gianella Liseth Valarezo Blacio

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Fabiola Barba Tapia, Mg. Sc.

Loja - Ecuador
2015

1859

CERTIFICACIÓN

Dra. Fabiola Barba Tapia, Mg. Sc.
DIRECTORA DE TESIS

CERTIFICA:

Que la presente tesis titulada: **“EFECTO CITOTÓXICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE ANNONA CHERIMOLA EN UNA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE COLON HUMANO EN MEDIO DE CULTIVO CON pH ACIDO”**, elaborada por la Srta. Gianella Liseth Valarezo Blacio ha sido desarrollada, corregida y orientada bajo mi dirección, cumpliendo los requerimientos reglamentarios para su aprobación por lo tanto faculto a la autora para su presentación, disertación y defensa.

Loja, Diciembre 2015

Atentamente,



Dra. Fabiola Barba Tapia, Mg. Sc.
DIRECTORA DE TESIS

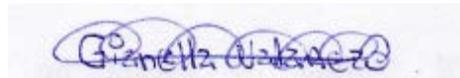
AUTORÍA

Yo, **GIANELLA LISETH VALAREZO BLACIO**, declaro ser la autora del presente trabajo de tesis y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a 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 – Biblioteca Virtual.

- **AUTOR:** GIANELLA LISETH VALAREZO BLACIO.

- **FIRMA:**



- **NÚMERO DE CÉDULA:** 0705745545.

- **FECHA:** 14 de Diciembre de 2015.

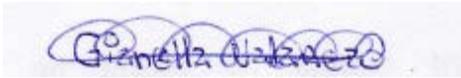
CARTA DE AUTORIZACIÓN

Yo, **GIANELLA LISETH VALAREZO BLACIO**, declaro ser la autora de la tesis titulada “EFECTO CITOTÓXICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE ANNONA CHERIMOLA EN UNA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE COLON HUMANO EN MEDIO DE CULTIVO CON pH ÁCIDO”.

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

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

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

- **Firma:** 
- **Autor:** GIANELLA LISETH VALAREZO BLACIO.
- **Cédula:** 0705745545.
- **Dirección:** El Oro - Piñas, Cdla. 28 de mayo; Av. Kennedy.
Loja – Loja, Calles: Manuel Monteros y Alfredo Mora.
- **Teléfono:** 072 977 414
- **Celular:** 0999754436
- **Correo electrónica:** giane_17@hotmail.es

DATOS COMPLEMENTARIOS

- **Director de Tesis:** Dra. Fabiola Barba Tapia, Mg. Sc.
- **Tribunal de Grado:**
- **Presidenta:** Dra. Paola Mercedes Benítez Castrillon, Mg. Sc
- **Vocal:** Dra. Maricela del Rosario López Morocho, Mg. Sc
- **Vocal:** Dra. Mariela Alexandra Idrovo Vallejo, Mg. Sc

DEDICATORIA

Al finalizar una más de las metas planteadas en mi vida, fruto de mi esfuerzo y sacrificio, quiero dedicar el presente primeramente a **DIOS** porque ha estado conmigo en cada paso que doy, cuidándome, guiándome y dándome fortaleza para continuar.

A toda mi familia especialmente a mis padres **Marilú** y **Luis** seres maravillosos a quienes quiero agradecerles por su apoyo incondicional y por ser el pilar fundamental en mi vida, en todo momento depositaron su entera confianza en cada reto que se me presentaba, motivándome para seguir superándome profesionalmente; quienes además a lo largo de mi carrera han velado por mi bienestar y educación; a mis hermanos con mucho amor y cariño de quienes recibí absoluto apoyo.

Pues es a ellos a quienes les debo por su apoyo incondicional mi infinita gratitud.

AGRADECIMIENTO

En primer instancia expreso mis más sincero agradecimiento a la Universidad Nacional de Loja, Área de la Salud Humana y en forma particular a la carrera de Laboratorio Clínico quien formó mi haber profesional, y en ella a mis queridos docentes quienes con mucha dedicación, profesionalismo y ética puesto de manifiesto en las aulas, supieron impartirme sus conocimientos y sabias enseñanzas que significaron un ejemplo de superación ayudándome así al progreso en mi vida profesional

Al Sr. Dr. Miguel Marín Director del Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja quien me permitió formar parte de su proyecto investigativo, así como también de realizar el trabajo de investigación en dicha institución y particularmente a la Lic. Carmen Pineda quién labora en el área de Laboratorio Clínico por sus conocimientos brindados y apoyo para la culminación de mi tesis.

De manera muy especial a mi directora de tesis Dra. Fabiola Barba Tapia, Mg. Sc. por su bondad, esfuerzo y dedicación, quien con sus instrucciones, experiencia, paciencia y su motivación ha logrado que pueda terminar mis estudios con éxito, para ella mi infinita gratitud.

1. TÍTULO

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

2. RESUMEN

El cáncer se constituye en un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento descontrolado de las células con invasión local de los tejidos y metástasis sistémica. El cáncer de colon es una enfermedad en la que las células malignas se localizan en la porción intermedia y más larga del intestino grueso. Se han realizado diversos estudios in vitro de los efectos de la Anona Cherimola mejor conocida como la chirimoya en donde se ha reportado que esta planta posee diversos compuestos naturales de interés biológico tales como alcaloides y acetogeninas. Compuestos aislados de la *Annona cherimola* los cuales han mostrado citotoxicidad frente a diversas líneas tumorales humanas. La ejecución de este proyecto investigativo se realizó con el objetivo de determinar el Efecto citotóxico del extracto etanólico de hojas de *Annona cherimola* en líneas celulares de cáncer de colon, siendo ésta una investigación de tipo experimental prospectiva realizada, en los laboratorios de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja en el periodo septiembre 2014 a julio 2015. Se llevó a cabo mediante el desarrollo de técnicas analíticas de viabilidad celular, procedimientos de proliferación celular, los cuales se desarrollaron con la ayuda del colorante azul de tripan; estos protocolos nos ayudaron a determinar una favorable disminución de células cancerígenas de un 87.3%, sin embargo, este ensayo deja puertas abiertas a investigaciones posteriores que ayudaran a aclarar mejor las dudas presentes en todos los procedimientos desarrollados en el mismo.

Palabras Claves: *Acetogeninas, Annona Cherimola, Cáncer de Colon.*

SUMMARY

Cancer is a group of diseases characterized by the uncontrolled growth of cells with local invasion of tissues and systemic metastasis. Colon cancer is a disease in which malignant cells are located in the intermediate and longer of the intestine portion. Several in vitro studies on the effects of the Annona Cherimola, better known as the custard apple where it has been reported that this plant has various natural compounds of biological interest such as alkaloids and acetogenins have been. Compounds isolated from the Annona cherimola which have shown cytotoxicity against various human tumor cell lines. The implementation of this research project will be held in order to determine the effect cytotoxic ethanolic extract from the leaves of Annona cherimola in cell lines of colon cancer, this being an investigation of prospective pilot type carried out in the laboratories of biotechnology at the National University of Loja in the period September 2014 to July 2015. It was conducted through the development of analytical techniques of cell viability, cell proliferation procedures, which were developed with the help of the dye trypan blue; These protocols helped us determine a favorable decrease of cancer cells in an 87.3%, However, this trial left open to further research what will help to better clarify the doubts present in all the procedures developed in the same.

Key Words: *Acetogenins, Annona Cherimola, Colon Cancer.*

3. INTRODUCCIÓN

El cuerpo está compuesto por millones de células vivas. Las células normales del cuerpo crecen, se dividen para crear nuevas células y mueren de manera ordenada. El cáncer se origina cuando las células en alguna parte del cuerpo comienzan a crecer de manera descontrolada (C, Society. 2014) (OMS. 2012).

El cáncer de colon, o colorrectal, es el que comienza en el intestino grueso (colon) o en el recto (parte final del colon), la mayoría de los cánceres de colon inician como pólipos no cancerosos (benignos), que lentamente se van convirtiendo en cáncer. Dentro de los principales factores de riesgo asociados a este problema de salud se encuentran: los antecedentes familiares de cáncer de colon, la presencia de pólipos en el colon, es más frecuente en las mujeres que en los hombres, afecta principalmente a las personas de edad avanzada. Al momento del diagnóstico, la edad promedio de las personas es de mayores de 50 años (David Z, David R, Stephanie S. 2014) (MSP, Chile. 2011).

El cáncer es una de las primeras causas de muerte a nivel mundial; en 2012 se le atribuyeron 8,2 millones de muertes. El 70% de todas las muertes por cáncer registradas en 2012 se produjeron en África, Asia, América Central y Sudamérica. Se prevé que los casos anuales de cáncer aumentarán de 14 millones en 2012 a 22 en las próximas dos décadas (C, Society. 2014) (OMS. 2012).

De acuerdo a los datos estadísticos obtenidos en la Sociedad de Lucha contra el Cáncer (SOLCA) de Loja en el periodo 2005 2009 el cáncer de colon femenino presenta un porcentaje de 1,3 % con un total de 48 casos, con una mínima disminución en el sexo masculino que es del 1,2% con un total de 39 casos; sin embargo las tasas de mortalidad del sexo femenino en el mismo periodo de tiempo es de 0,3% con un total de 15 casos mientras que en el sexo masculino se presentó el 0,1 % con un total de 9 casos (SOLCA. 2014).

Se han realizado estudios comparativos en cuanto a la *Annona cherimola* tanto in vitro como en vivo comparando el efecto con la adriamicina fármaco utilizado en tratamientos de quimioterapia, además se comprobó que es 10.000 veces más potente, y que mata las células cancerígenas sin dañar las células sanas como ocurre con la quimioterapia, que además ocasiona muchos efectos adversos (Salud, M.2014).

La investigación de la *Annona cherimola* es de gran importancia debido a que esta planta posee fuertes efectos anticancerígenos, y aunque se le atribuyen muchas más propiedades, lo más interesante de ella es el efecto que produce sobre los tumores. Contiene poderosos principios activos anticancerígenos como son las Acetogeninas que contiene la hoja de Chirimoya (Salud, M. 2014).

La ejecución de este proyecto investigativo se realizó con el objetivo de determinar el efecto citotóxico del extracto etanólico de hojas de *Annona Cherimola* en líneas celulares de cáncer de colon humano en medio de cultivo con pH ácido, siendo esta una investigación de tipo experimental prospectiva realizada en los laboratorios de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.

Se llevó a cabo mediante el desarrollo de técnicas analíticas de viabilidad celular, procedimientos de proliferación celular, los cuales se desarrollaron con la ayuda del colorante azul de tripano, estos protocolos nos ayudaron a determinar una favorable disminución de células cancerígenas de un 87.3% a las 72 horas, sin embargo podemos concluir que el extracto etanólico concentrado nos brinda resultados alentadores presentando una alta capacidad citotóxica, en cuanto a la proliferación celular se puede observar que a las 72 horas la acción del extracto es más potente debido a que hay una proliferación del 14.2% concluyéndose así que el extracto a mayor concentración no da lugar a la multiplicación de células tumorales.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 CÁNCER DE COLON

El cáncer de colon es una enfermedad en la que las células malignas se localizan en la porción intermedia y más larga del intestino grueso. Es un tipo de cáncer bastante común en muchos países, pero también resulta fácil de detectar, tiene un alto grado de curación y tarda mucho en desarrollarse. El colon, junto con el recto (porción final del intestino grueso), es el lugar donde se almacenan las heces antes de ser expulsadas al exterior a través del ano. Al encargarse de esta labor, acumula sustancias de desecho, por lo que es un lugar propicio para la aparición de un cáncer. Por eso es importante reducir el tiempo de acumulación al mínimo, adoptando una dieta equilibrada que facilite el tránsito intestinal al máximo (Macarulla, T. 2011).

4.1.1 TIPOS DE CÁNCER DE COLON

Varios tipos de cáncer pueden comenzar en el colon o el recto:

4.1.1.1 Adenocarcinomas: Estos cánceres comienzan en las células que forman glándulas que producen mucosidad para lubricar el interior del colon y del recto. Casi siempre que los médicos hablan de cáncer colorrectal se refieren a este tipo de cáncer (American, C. 2014).

Otros tipos de tumores menos comunes también pueden comenzar en el colon y en el recto, entre éstos se incluye:

4.1.1.2 Tumores del estroma gastrointestinal: Estos tumores se originan de células especializadas en la pared del colon llamadas células intersticiales de Cajal. Algunos son benignos (no cancerosos), mientras que otros son malignos (cancerosos). Estos tumores pueden ser encontrados en cualquier parte del tracto digestivo, aunque éstos son poco comunes en el colon (American, C. 2014).

4.1.1.3 Linfomas: Estos son cánceres de las células del sistema inmunológico que típicamente se forman en los ganglios linfáticos, pero que también pueden comenzar en el colon y el recto o en otros órganos (American, C. 2014).

4.1.1.4 Sarcomas: Estos tumores pueden comenzar en los vasos sanguíneos, así como en el tejido muscular y conectivo de la pared del colon y recto. Los sarcomas del colon o del recto son poco frecuentes (American, C. 2014).

4.1.2 ETIOLOGÍA

El cáncer colorrectal es el tercer cáncer que se diagnostica con más frecuencia tanto en los hombres como en las mujeres en Estados Unidos. El cáncer colorrectal es la tercera causa principal de fallecimientos asociados al cáncer cuando se consideran a los hombres y a las mujeres por separado, y la segunda causa principal cuando se combinan ambos sexos (American, C. 2014).

4.1.3 EPIDEMIOLOGIA

Los países que presentan las mayores tasas de mortalidad estandarizadas por edad de cáncer de colon son Uruguay y Argentina, con cifras de 7,2 por 100.000 y 6,9 por 100.000 habitantes

respectivamente. Por otro lado, la mayor pérdida de años potenciales de vida perdidos (APVP) por este cáncer la presenta Uruguay (103 por 100.000 habitantes), casi duplicando a Brasil y Chile, y triplicando a Paraguay (MSP-Chile. 2011)

4.1.4 FACTORES DE RIESGO

Un factor de riesgo para un cáncer es cualquier agente que incrementa el riesgo de padecer dicho tumor, es decir, la persona que está expuesta a este factor posee más probabilidades de desarrollar la lesión maligna (Española, A.2014).

Entre los factores que incrementan el riesgo de padecer este tumor son:

4.1.4.1 Alimentación: Las dietas ricas en grasas animales (carnes rojas) y pobres en fibra, pueden aumentar el riesgo de cáncer colorrectal, cocinar las carnes a temperaturas muy altas (freír, asar o cocinar a la parrilla) crea químicos que pudieran aumentar el riesgo de cáncer, aunque no está claro cuánto de esto pudiera contribuir a un aumento en el riesgo de cáncer colorrectal. Una alimentación con un alto consumo de vegetales, verduras, frutas y granos integrales ha sido asociada con un menor riesgo de cáncer colorrectal (Acosta, L. 2009).

4.1.4.2 Inactividad física: Una vida sedentaria favorece el riesgo de aparición de esta enfermedad (Acosta, L. 2009).

4.1.4.3 Obesidad: la obesidad aumenta el riesgo de cáncer de colon tanto en los hombres como en las mujeres, aunque esta asociación parece ser mayor entre los hombres (Acosta, L. 2009).

4.1.4.4 Consumo de tabaco: Aumenta el riesgo de padecer pólipos, las personas que fuman desde hace mucho tiempo tienen una probabilidad mayor de padecer y morir de cáncer colorrectal que las personas que no fuman. Se sabe que fumar causa cáncer de pulmón, pero también está asociado con otros cánceres, como el cáncer colorrectal (American,C. 2014).

4.1.4.5 Consumo de alcohol: Parece que el alcohol actúa favoreciendo el crecimiento de las células de la mucosa del colon, dando lugar a la aparición de pólipos (Acosta, L. 2009).

4.1.4.6 Edad: El riesgo de padecer la enfermedad aumenta con los años, ya que aumenta la aparición de pólipos en el colon y recto. Es raro que el cáncer colorrectal aparezca en personas de menos de 40 años (Acosta, L. 2009).

4.1.4.7 Historia personal de pólipos: La aparición de pólipos adenomatosos aumenta el riesgo de padecer la enfermedad (Española, A.2014).

4.1.4.8 Historia personal de cáncer colorrectal: Las personas diagnosticadas de un cáncer a este nivel poseen un riesgo incrementado para padecer un segundo tumor en el colon o recto (Acosta, L. 2009).

4.1.4.9 Enfermedades inflamatorias intestinales: Suponen menos del 1% de todos los cánceres colorrectales. Los dos tipos principales de enfermedades inflamatorias a este nivel son la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn. La colitis ulcerosa es una enfermedad que se caracteriza por la inflamación prolongada de las paredes del colon, mientras que la enfermedad

de Crohn afecta, típicamente, al intestino delgado, aunque en ocasiones el colon también se encuentra inflamado (Española, A.2014).

4.1.4.10 Historia familiar: En un 5% de los cánceres de colon se han identificado una serie de genes, cuya alteración da lugar a unos síndromes que predisponen, en mayor o menor grado, a la aparición de cáncer colorrectal. Los dos más importantes son: Poliposis colónica familiar y Cáncer colorrectal hereditario no polipósico (Española, A.2014).

4.1.5 DIAGNÓSTICO

El cáncer de colon tiene unas expectativas muy positivas si se detecta precozmente. El médico informa a la persona afectada sobre el estado de la enfermedad, su tratamiento, los efectos secundarios del mismo. Para detectar un cáncer de colon se utilizan varias técnicas, como las que se describen a continuación:

4.1.5.1 Examen físico y antecedentes: Examen del cuerpo para revisar los signos generales de salud, incluso verificar si hay signos de enfermedad, como masas o cualquier otra cosa que parezca anormal. También se toman los antecedentes médicos de las enfermedades y los tratamientos anteriores del paciente (Nacional, I. 2015).

4.1.5.2 Examen digital del recto: El médico introduce un dedo cubierto por un guante lubricado en el recto para palpar masas o cualquier otra cosa que no parezcan habituales (Nacional, I. 2015).

4.1.5.3 Prueba de sangre oculta en la materia fecal: Prueba para verificar la presencia de sangre en las heces (residuos sólidos), que solo se puede ver al microscopio. Se colocan muestras pequeñas de heces sobre tarjetas especiales y se envían al médico o al laboratorio para evaluación (Nacional, I. 2015).

4.1.5.4 Enema de bario: Serie de radiografías del tubo gastrointestinal inferior. Se introduce en el recto un líquido que contiene bario (un compuesto metálico, de color plateado blancuzco). El bario recubre el tubo digestivo inferior y se toman radiografías (Nacional, I. 2015).

4.1.5.5 Sigmoidoscopia: Procedimiento para observar el interior del recto y el colon sigmoide (inferior) y verificar si hay pólipos (áreas pequeñas de tejido abultado), otras áreas anormales o cáncer. Se introduce un sigmoidoscopio a través del recto hacia el colon sigmoide. Un sigmoidoscopio es un instrumento delgado con forma de tubo con una luz y una lente para observar. También puede tener una herramienta para extraer pólipos o muestras de tejido, que se observan al microscopio para verificar si hay signos de cáncer (Nacional, I. 2015).

4.1.5.6 Colonoscopia: Procedimiento para observar el interior del recto y el colon para determinar si hay pólipos, áreas anormales o cáncer. Se introduce un colonoscopio a través del recto hacia el colon (Nacional, I. 2015).

4.1.5.7 Biopsia: Extracción de células o tejidos para que un patólogo las pueda observar al microscopio y verificar si hay signos de cáncer (Nacional, I. 2015).

4.1.6 TRATAMIENTO

El tratamiento depende de muchos factores, como el estadio o etapa en la que se encuentre el cáncer. Los tratamientos pueden abarcar:

4.1.6.1 Cirugía: Mediante una operación en quirófano, se extrae la parte afectada por el cáncer. Se practica en todas las etapas de extensión de la enfermedad, pero cuando se trata de tumores en fase inicial se puede extraer un pólipo mediante el colonoscopio para examinarlo. Según los resultados, se extirpará el cáncer y una parte circundante de tejido sano, y luego se limpian los ganglios de la zona (D, Medicina. 2009).

4.1.6.2 Radioterapia. Consiste en aplicar rayos de alta energía sobre la zona afectada, con el fin de destruir las células cancerosas. Sólo afecta a la zona en tratamiento, y puede aplicarse antes de la cirugía (para reducir el tumor y poder extraerlo más fácilmente), o después de la cirugía (para terminar de destruir las células cancerosas que pudieran haber quedado) (D, Medicina. 2009).

4.1.6.3 Quimioterapia. Es un tipo de tratamiento que consiste en la administración de fármacos que destruyen las células cancerosas. Se realiza insertando un tubo en una vena (catéter), e inyectando los fármacos a través de un sistema de bombeo, suele administrarse tras la operación quirúrgica; dicho tratamiento puede ocasionar efectos adversos como la destrucción de las células sanas así como también fatiga, náuseas vómitos, menor cantidad de células en la sangre, caída del pelo, lesiones en la boca entre otras, es por ello el gran interés de realizar el presente proyecto investigativo ya que utilizando el extracto de las hojas de *Annona cherimola* se

pretenderá presentar una mejor alternativa en beneficio de los pacientes con cáncer de colon (D, Medicina. 2009).

4.1.6.4 Inmunoterapia. Consiste en estimular o restaurar las propias defensas inmunitarias del organismo. Para ello se emplean productos naturales o fabricados en el laboratorio (D, Medicina. 2009).

4.2 TRATAMIENTOS ALTERNATIVOS

Existen diversos estudios al respecto que acreditan la fama que la chirimoya tiene al respecto. Estudios científicos realizados en la Universidad de Purdue en Indiana, USA y en Japón, han demostrado excepcionales beneficios para el tratamiento de ciertos tipos de tumores cancerosos.

Contiene poderosos principios activos anticancerígenos debido a las acetogeninas que contienen la hoja de Chirimoya; se realizaron estudios comparativos in vitro y en vivo comparando el efecto con la adriamicina conocido quimioterápico. Se comprobó que es 10.000 veces más potente, y que mata las células cancerígenas sin dañar las células sanas como ocurre con la quimioterapia, que además ocasiona náuseas, pérdida de peso y del cabello, protege y eleva el sistema inmunológico (Salud, M.2014).

Es la mejor alternativa cuando no se puede recurrir a la cirugía, a la radio terapia o cuando se tiene que suspender la quimioterapia por sus efectos secundarios sobre el hígado y los riñones, no hay incompatibilidad y al contrario se complementa muy bien, con cualquier tratamiento al que esté sometido el paciente mejorando la calidad del mismo. No tienen absolutamente ningún efecto secundario ni reacciones de intolerancia o alergia (Salud, M.2014).

4.3 FLUOROURACILO

El fluorouracilo es un fármaco citotóxico, antimetabolito análogo de bases pirimidínicas, el mismo que da lugar a la inhibición de la duplicación celular, este compuesto se utiliza terapéuticamente como anticanceroso, especialmente en el control de los cánceres de mama, colon y recto (Delgado, A., Minguillon, C. y Joglar, J. 2004).

4.4 pH

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

4.4.1 pH ÁCIDO

Aquellos que presentan un pH inferior a 7 se los considera ácidos. Un pH ácido puede ocurrir por el estrés emocional, sobrecarga de toxinas, las reacciones inmunes o cualquier proceso que prive a las células de oxígeno y otros nutrientes. Obviamente, una dieta que es muy ácida puede cambiar los niveles de pH hasta cierto punto. Si la dieta no contiene suficientes minerales para compensar, se producirá una acumulación de ácidos en las células, privándolas de oxígeno.

Esto puede disminuir la capacidad del organismo para absorber minerales adicionales y otros nutrientes, disminuye la producción de energía en las células, disminuye su capacidad para reparar las células dañadas, disminuye su capacidad de desintoxicar los metales pesados, y permite que las células tumorales crezcan y proliferen, y lo hacen más susceptibles a la fatiga y la enfermedad (Montagud, A. & Espadalé, R. 2009).

4.5 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* (Vega, M. 2013).

El árbol de la chirimoya es de crecimiento lento, puede adquirir en su madurez una altura de 7 a 8 m, presenta exuberante follaje, porte erguido y a veces ramificado. El tallo es cilíndrico, de corteza gruesa. Su sistema radicular es superficial y ramificado, originando dos o tres pisos a diferentes alturas, pero poco profundo. Las hojas son simples, enteras, de disposición alterna y de forma ovada u ovada-lanceolada. Las yemas son compuestas y pueden originar brotes mixtos (vegetativos y florales) (Vega, M. 2013).

Las flores, son muy aromáticas, hermafroditas, presentan seis pétalos amarillentos jaspeados de púrpura, son poco llamativas, solitarias o en ramilletes de dos o tres, sobre un corto e inclinado pedúnculo inserto en las axilas de las hojas. El cáliz consta de tres sépalos de color verde oscuro, pequeños y de forma triangular. La corola está formada por seis pétalos dispuestos en dos verticilos; los tres pétalos exteriores bien desarrollados son carnosos, miden de 2,5 a 4 cm de longitud y la parte superior tiene forma aquillada o triangular; los tres pétalos internos son rudimentarios, en forma de escama, ovalados o triangulares. La parte masculina de la flor consta de numerosos estambres (150-200), dispuestos helicoidalmente muy juntos sobre un receptáculo, formando una masa compacta y blanca oprimida por los pétalos (Vega, M. 2013).

4.5.1 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

La chirimoya es un frutal que a pesar de estar muy distribuido se puede decir que su cultivo está poco difundido, por ello se señala que es de escasa importancia a nivel mundial. Existe de forma comercial en Perú, España, Chile, Bolivia, Ecuador, Estados Unidos, Colombia, Sudáfrica, Israel, Argentina, Bolivia, Brasil y México. En diversos lugares la producción va destinada al mercado nacional debido a la escasa resistencia del fruto a la manipulación y transportación. Su expansión está muy limitada debido al número reducido de variedades comerciales disponibles, que además, concentran la producción en determinadas fechas y saturan el mercado. Otra razón de su reducida difusión se debe a sus exigencias edafoclimáticas (Vega, M. 2013).

4.5.2 VALOR NUTRICIONAL

La chirimoya es una fruta muy digestiva y nutritiva, se caracteriza por su alto contenido de agua; posee características muy particulares, dada la combinación armónica en su composición de ácidos y azúcares. Estos últimos son el producto de la reducción del almidón, predominando la glucosa (11.75 %) y sacarosa (9.4 %). Los principales ácidos orgánicos en su composición son el ácido cítrico y el ácido málico (Vega, M. 2013).

Es un frutal pobre en grasas y proteínas, pero dado su alto contenido de azúcares, su valor calórico se clasifica entre moderado y alto, ya que la mayoría de los frutos tienen un Brix superior a 20 grados (Vega, M. 2013).

Relacionado con otros nutrientes, se destaca su contenido de potasio y vitamina C. El potasio, es un mineral necesario para la transmisión y generación del impulso nervioso y para la actividad muscular normal, interviene en el equilibrio de agua dentro y fuera de la célula (Vega, M. 2013).

La vitamina C interviene en la formación de colágeno, huesos y dientes, glóbulos rojos y favorece la absorción del hierro de los alimentos, así como la resistencia a las infecciones. Además, la vitamina C cumple función antioxidante. Su aporte de fibra mejora el tránsito intestinal y beneficia a múltiples alteraciones y enfermedades (Vega, M. 2013).

4.5.3 VALOR MEDICINAL

La Chirimoya, es una fruta que posee muchas y buenas propiedades, su consumo es muy bueno para la salud. A los estudiantes les refuerza la memoria, igual que a las personas mayores, a las personas de mediana edad tonifica, estimula y les ayuda en el estrés diario. Desde un punto de vista dietético y nutricional, se puede decir que se digiere sin ninguna dificultad debido a las poderosas enzimas que posee. Es muy aconsejable su consumo en personas mayores, niños, convalecientes y embarazadas. Los pediatras aconsejan hacer purés o zumos con su pulpa ya que posee mucho calcio, fósforo, hierro, potasio, magnesio, azúcares (entre un 5 y un 10% de su peso) y proteínas (16%). También tiene vitaminas Niacina, Riboflavina, Tiamina, Ácido fólico, Ácido ascórbico, antioxidantes (Nostra, T. 2011).

Gracias a su contenido en fibra, la chirimoya puede ayudar a tratar sobrepeso, estreñimiento, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia y diabetes (Blues, M. 2010).

Por su contenido en vitamina B, mejora la transmisión nerviosa y la actividad muscular. Los antioxidantes que contiene, actúan reduciendo los radicales libres, tratando dislipemias y enfermedades cardiovasculares (Blues, M. 2010).

Por su contenido en vitamina C, mejora la absorción del hierro no hemínico (hierro proveniente de los vegetales). El potasio que contiene, ayuda a tratar naturalmente la hipertensión arterial (Blues, M. 2010).

El interés de esta planta se debe a sus fuertes efectos anti cancerígenos. Y aunque se le atribuyen muchas más propiedades, lo más interesante de ella es el efecto que produce sobre los tumores. Esta planta es un remedio de cáncer probado para los cánceres de todos los tipos. Hay quienes afirman que es de gran utilidad en todas las variantes del cáncer (Blues, M. 2010).

Se la considera además como un agente de anti-microbial de ancho espectro contra las infecciones bacterianas y por hongos; es eficaz contra los parásitos internos (Blues, M. 2010).

4.6 EXTRACTO

Un extracto es un tipo de maceración, en la que el líquido solvente es una mezcla de alcohol etílico y agua, que disuelta las sustancias activas contenidas en una planta medicinal. En otras palabras, es "el poder de una Planta Medicinal" transformado en "Medicamento" (Takiwasi, L. 2011).

4.6.1 PROCESOS PARA LA OBTENCIÓN DE UN EXTRACTO

4.6.1.1. Recolección de las plantas: las plantas deben ser cultivadas en forma orgánica, sin agroquímicos ni fertilizantes (Takiwasi, L. 2011).

4.6.1.2. Control de Calidad de la Materia Prima. Una vez en el laboratorio, las plantas pasan por la primera etapa de control de calidad que consiste en evaluar sus características organolépticas (color, textura, olor), y de pureza (contaminación con otras plantas o con partes de la planta que no son empleadas en la preparación de los extractos). Luego de esta etapa de control de calidad, las plantas son lavadas y secadas durante 24 horas a 50 °C y almacenadas. Las plantas tratadas de esta forma, y estivadas en condiciones adecuadas de humedad, temperatura y limpieza, son estables hasta un año (Takiwasi, L. 2011).

4.6.1.3. Maceración. Es el proceso mediante el cual se consigue extraer y disolver en un líquido las sustancias activas de una planta. Estas sustancias se encuentran contenidas y bien protegidas dentro de las células de los tejidos vegetales, ya sea la raíz, las hojas, las cortezas, las flores o los frutos. Para liberar estas sustancias activas, que queden disponibles y puedan ser absorbidas por nuestro organismo, es necesario procesar el material vegetal de alguna forma. En el caso de la maceración, la parte de la planta que contiene las sustancias activas es trozada hasta un determinado grado de finura, embebida en un líquido solvente y dejada así en contacto en condiciones y tiempos estandarizados con agitación periódica. Durante el proceso, el solvente entrará dentro de las células vegetales y arrastrará consigo las sustancias activas disolviéndolas.

4.6.1.4. Filtración. Luego de un periodo prefijado, el macerado se filtra para separar el líquido del material vegetal sólido (Takiwasi, L. 2011).

4.6.1.5. Control de Calidad. Este líquido filtrado se somete a ciertas pruebas de laboratorio para comprobar que el proceso de maceración transcurrió adecuadamente y que el producto cumple con los estándares de calidad: un análisis organoléptico: características principales como

sabor, olor, color y aspecto del macerado. Un Análisis fisicoquímico: se realizó la medición del pH (rango de 5 - 6) utilizando un potenciómetro y la medición del grado alcohólico (75° - 80°) utilizando el alcoholímetro (Takiwasi, L. 2011).

4.7 CULTIVO CELULAR

Los científicos han desarrollado metodologías para aislar células y obtener poblaciones celulares homogéneas, que luego pueden ser incluso mantenidas y multiplicadas *in vitro* (“en vidrio” = en recipientes especiales, en el laboratorio). Los cultivos celulares son esenciales en la investigación científica, ya que permiten estudiar los procesos que ocurren en las células, y en diversas aplicaciones de la biotecnología, como la producción de moléculas de interés industrial, ingeniería de tejidos, etc (Segretin, M. 2010).

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

Los cultivos de células *in vitro* consisten en un sistema formado por células provenientes de un órgano o un tejido, normal o tumoral, mantenidas en medios de cultivo de composición química definida y en condiciones de temperatura, pH, aireación y humedad controladas. De esta forma se aseguran su supervivencia y multiplicación, manteniendo todas sus funciones metabólicas de una manera semejante a las que tenían en el huésped (Cárdenas, R. 2011).

4.7.1 TIPOS DE CULTIVOS CELULARES

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

4.7.1.2 Cultivos secundarios: Las células suelen multiplicarse hasta cubrir la superficie del recipiente de cultivo, formando una monocapa (capa de una célula de espesor). Como consecuencia del contacto entre las células se detiene temporalmente su proliferación, hasta que se las subcultiva a un recipiente con medio fresco. Así, podrán subcultivarse durante semanas o meses. En este estadio, las células frecuentemente mostrarán distintas propiedades según su origen (Segretín, M. 2015).

4.7.1.3 Cultivos en Monocapa: Las células exhiben una variedad de "comportamientos sociales", permitiendo la formación de una monocapa que cubrirá la correspondiente superficie de crecimiento (confluencia), lo que hace que su multiplicación sea inhibida cuando establecen contacto entre sí (quiescencia). Las células provenientes de cultivos primarios son las que mejor crecen en ésta condición, dada su estabilidad genética y su naturaleza diploide normal. Los recipientes para el cultivo de células estacionarias son cajas de Petri, frascos para el cultivo de tejido, entre otros, que pueden ser de material de plástico o de vidrio previamente tratado y su desprendimiento para transferirlas a superficies mayores se realizan con agentes proteolíticos como la tripsina (Segretín, M. 2010).

4.7.1.4 Cultivos en suspensión: Las líneas celulares que provienen de cultivos primarios con requerimiento de anclaje a superficies, tienen la propiedad de crecer de manera estacionaria o en suspensión después de un período de adaptación. Existe evidencia experimental que los sistemas en suspensión también requieren de matrices que son macromoléculas, que sirven de protectores a la superficie celular; estas macromoléculas se encuentran en el suero, el cual contribuye igualmente con el medio de cultivo, proporcionando un sistema balanceado de nutrientes (Segretín, M. 2010).

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

- a) Diploides: se originan de un tejido normal y continúan normales a medida que se cultivan.
- b) Heteroplides o continuas: se originan de un tejido normal o anormal, pero se considera que estas células han sufrido una transformación que le confiere características de crecimiento diferentes (Castaño, E., Zapata, J. 2012).

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

4.7.2 TIPOS DE CRECIMIENTO CELULAR

Durante el establecimiento de un cultivo, dependiendo del tipo de células, se pueden obtener dos tipos de crecimiento:

- **Células adherentes o cultivos fijos:** Requieren unirse a una superficie para su multiplicación donde se formará una monocapa.
- **Células no adherentes o cultivos en suspensión:** Se multiplican suspendidas en medio líquido, donde se sedimentan pero no se adhieren a la superficie del recipiente (Castaño, E., Zapata, J. 2012).

4.7.3 FACTORES BÁSICOS PARA LA SUPERVIVENCIA CELULAR

4.7.3.1 Presion osmótica: En los medios de cultivos celulares, al igual que en los sistemas in vivo, el NaCl es la sustancia mas importante en el mantenimiento de la presion osmótica pero los iones inorganicos y la glucosa también tienen un papel significativo por lo tanto su concentracion en el medio debe ser cuidadosamente controlada (Castaño, E., 2012).

4.7.3.2 Concentracion de hidrogenesis (pH): El pH óptimo para el crecimiento celular esta entre 7.2 – 7.4, aunque algunas celulas pueden tolerar un rango de 6.6 - 7.8 (Castaño, E.2012).

4.7.3.3 Gases: Dentro de los gases necesarios para la supervivencia celular se encuentra el oxigeno: aunque los requerimientos de oxigeno varian de acuerdo con el tipo de células, la mayoría requieren bajas concentraciones, por lo que generalmente es suficiente la concentración del oxigeno disuelta en el medio (Castaño, E.2012).

4.7.3.4 Dioxido de carbono: El CO₂ esta involucrado en múltiples reacciones bioquímicas, lo que hace difícil determinar su efecto directo en el cultivo. Asi, la concentracion de CO₂ disuelto

en el medio va a depender del pH, la concentración de CO₂ libre, la temperatura y la concentración de HCO₃ y otros iones (Castaño, E.2012).

4.7.3.5 Iones orgánicos: Son necesarios para la regulación de la presión osmótica, para la actividad metabólica y enzimática y para la adhesión y extensión celular. Los iones esenciales en un medio de cultivo son: sodio, que proporciona la osmolaridad requerida; potasio participa en el mantenimiento de la tonicidad celular y además actúa como factor enzimático; calcio y magnesio, están íntimamente ligados a los mecanismos de adhesión celular; cloro, carbonato y fosfato, son parte del sistema amortiguador del medio y los dos últimos sirven para el almacenamiento de energía (Castaño, E.2012).

4.7.3.6 Agua: Su naturaleza polar y su propiedad de formar puentes de hidrógeno la hacen un componente fundamental en los sistemas vivos. En los sistemas de cultivos celulares se recomienda utilizar agua desionizada (Castaño, E.2012).

4.7.3.7 Carbohidratos: Sirven como fuente de energía para las células. El más utilizado es la glucosa, la cual es metabolizada principalmente por la glicólisis para formar piruvato, que a su vez puede ser convertido a lactato o acetoacetato para entrar en el ciclo del ácido cítrico y formar CO₂ (Castaño, E.2012).

4.7.3.8 Aminoácidos: Necesarios para la formación de proteínas, síntesis de ácidos nucleicos, transporte de iones: además pueden actuar como buffer (Castaño, E.2012).

4.7.3.9 L-Glutamina: Es la principal fuente de carbono para la mayoría de las células en cultivo, genera precursores involucrados en algunas reacciones celulares y en la producción de proteínas. También actúa junto a la glucosa como fuente de energía (Castaño, E.2012).

4.7.3.10 Vitaminas: Forman parte integral de las coenzimas involucradas en el metabolismo celular las más utilizadas son: ácido fólico, ácido pantoténico, inositol, ácido nicotínico, riboflavina, piridoxal, tiamina y ácido ascórbico (Castaño, E.2012).

4.7.3.11 Antibióticos y antimicóticos: Usados con discreción y combinados con técnicas de esterilidad, ayudan a prevenir la contaminación microbiana del cultivo celular, aunque no son necesarios para el metabolismo (Castaño, E.2012).

4.8 MEDICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

La estimación de la capacidad proliferativa de los tumores y de la expresión del fenómeno apoptótico. Existe una correlación entre apoptosis y proliferación en tejidos sanos, pero también en tumores. Una mayor tasa de proliferación se ha asociado con peor pronóstico en la mayoría de los tumores, y una peor respuesta a los tratamientos oncológicos con quimioterapia y radioterapia. Así mismo, el porcentaje basal de células apoptóticas o la capacidad de inducir la muerte celular por diversos tratamientos, han demostrado un relevante papel pronóstico y predictivo de respuesta a tratamientos oncológicos (Jorunal, R. 2010).

La vida de una célula se inicia con su formación a través de la división de una célula madre y termina con la formación de sus células hijas o con su muerte. Las etapas a través de las cuales pasa la célula desde una división celular a la siguiente constituyen el ciclo de la célula. Sin embargo, este ciclo no lo realizan todas las células:

- ❖ **Células lábiles:** Son células que se dividen y mueren continuamente. Ej. epidermis, epitelios de mucosa, tracto gastrointestinal.
- ❖ **Células estables:** Suelen estar en reposo G₀, teniendo una escasa capacidad de división. Sin embargo, pueden entrar en el ciclo celular tras una agresión. Ej. hepatocitos, epitelio tubular renal.
- ❖ **Células permanentes:** Son aquellas que pierden su capacidad de división al nacer el individuo, presentando una diferenciación terminal. Ej. neuronas, cardiomiocitos, músculo esquelético (Muñoz, Z. (2007)).

La función básica del ciclo celular es la de duplicar en forma exacta la gran cantidad de DNA cromosómico y luego distribuir las copias en células hijas genéticamente iguales. La duración del ciclo celular varía de manera significativa en los distintos tipos celulares. Ej. Células epiteliales del intestino (12h), células hepáticas humanas (Muñoz, Z. 2007).

El crecimiento celular es el proceso mediante el cual las células se reproducen y, de esa manera, pueden cumplir con su ciclo y funciones específicas en el organismo de los seres vivos. Pero un crecimiento celular descontrolado y fuera de las condiciones normales, puede devenir en enfermedades degenerativas y otras como el cáncer. La última afección mencionada es, muchas veces, la consecuencia de una serie de disfunciones en torno al crecimiento celular, ya que el cáncer puede darse cuando las células desarrollan un crecimiento incontrolado, se subdividen y liberan fuera de los parámetros normales o efectúan algún tipo de invasión celular que pueda causar la destrucción de tejidos cercanos. La metástasis es otra consecuencia de un mal funcionamiento del crecimiento celular, ya que las células se esparcen por otros lugares del organismo, a través de la sangre. Durante el desarrollo de la etapa del crecimiento celular,

también aumenta, en forma directa, el funcionamiento del metabolismo. Estas actividades pueden estar relacionadas entre sí, según el crecimiento celular correspondiente (Guerrero, L. 2011).

4.9 VIABILIDAD CELULAR

La viabilidad celular se define como la identificación de células vivas o muertas en una muestra total. La viabilidad celular se puede identificar cualitativa o cuantitativamente por: 1. Cambios morfológicos. 2. Cambios en la permeabilidad de la membrana. 3. Cambios en la actividad enzimática. 4. Métodos colorimétricos e inmunoensayos (Campos, I. 2007).

Es una determinación de las células vivas o muertas, en base a una muestra total de células. Mediciones de la viabilidad celular se puede utilizar para evaluar la muerte o la vida de las células cancerosas (Rober. 2012).

Puesto que todo lo vivo está compuesto de células, el recuento de células viabilidad tienen un enorme número de aplicaciones. Las pruebas de la viabilidad celular por lo general involucra una población de células de la muestra y tinción de las células o la aplicación de productos químicos para mostrar lo que están viviendo y que están muertos. Hay numerosas pruebas y métodos para medir la viabilidad celular (Rober. 2012).

Para determinar la viabilidad celular se emplean diferentes métodos. El más común es el de tinción con azul tripán. El azul tripán es un coloide que se introduce en el interior de las células que presentan roturas en la membrana. Así pues, las células que aparecen en la imagen, claramente de color azul, son consideradas no viables. Asimilar células blancas, por exclusión, a células viables es un error pues por este método se sobrevalora la viabilidad de las células en la

suspensión, determinando como inviables sólo aquellas con la membrana rota. En la imagen se han representado células vivas como puntos blancos y células muertas (teñidas con azul tripán) como puntos azules. Corresponde a una de las áreas de contaje de la cámara de Neubauer. (Campos, I. 2007).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

TIPO DE ESTUDIO:

La presente investigación es de diseño Experimental – Prospectiva.

ÁREA DE ESTUDIO:

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

TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS:

FASE PRE ANALÍTICA

- Oficio dirigido al Dr. Miguel Marín, para permitir la participación del macroproyecto “Efecto citotóxico del extracto de las hojas de Annona Cherimola” (Anexo 1).

- Ensayos realizados para el mantenimiento de las células tumorales de cáncer de colon (RKO) mediante los siguientes protocolos:
 1. Preparación de medio de cultivo RPMI 1640 completo (mezcla de sales enriquecida con aminoácidos y otros componentes esenciales para el crecimiento celular) y medio de cultivo de congelación (Anexo 2).
 2. Subcultivos para mantenimiento y multiplicación de células RKO (tripsinización) (Anexo 3).
 3. Congelación celular (crio congelación) (Anexo 4).

4. Descongelación celular (Anexo 5).

FASE ANALÍTICA

- Se realizó el siguiente protocolo estandarizado con los procedimientos que se detallan a continuación:
 1. Preparación de medio de cultivo RPMI completo para pH ácido (Anexo 6).
 2. Tripsinización de células RKO (línea celular de carcinoma de colon) (Anexo 7).
 3. Técnica de Ficoll Hypaque (obtención de linfocitos). (Anexo 8).
 4. Para colocar las células en cada pocillo (cálculos) - líneas celulares (en el caso de los extracto etanólico) (Anexo 9).
 5. Preparación de extractos en diferentes concentraciones - extracto etanólico (Anexo 10).
 6. Preparación de controles positivos – fluorouracilo (Anexo 11).
 7. Contaje de células con azul de tripano (Viabilidad celular) (Anexo 12).
 8. Protocolo de proliferación celular (Anexo 13).

FASE POSTANÁLITICA

- Se realizaron los cálculos correspondientes a la viabilidad celular por medio de porcentaje (Anexo 14).
- Se realizaron los cálculos correspondientes a la proliferación celular mediante el contaje de células confluentes (Anexo 15).
- Para el desarrollo de esta investigación se utilizó el programa estadístico SAS Statistical Analysis System (Sistema de Análisis Estadístico) (Anexo Nro. 16).

6. RESULTADOS

PROLIFERACIÓN CELULAR

TABLA # 1

Línea celular de cáncer de colon (RKO) con extracto etanólico concentrado, diluido 1:10 y diluido 1:50

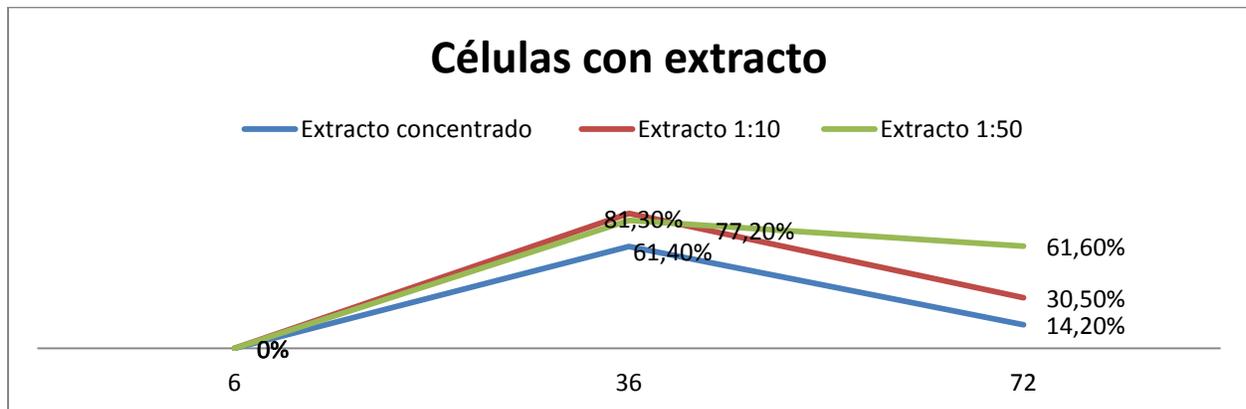
Proliferación Tiempo (horas)	Extracto concentrado	Extracto 1:10	Extracto 1:50
6 HORAS	0%	0%	0%
36 HORAS	61.4%	81.3%	77.2%
72 HORAS	14.2%	30.5%	61.6%

Fuente: Datos del laboratorio de cultivo de células del Centro de Biotecnología de la UNL.

Elaborado por: Gianella Liseth Valarezo Blacio.

GRÁFICA #1

Línea celular de cáncer de colon (RKO) con extracto etanólico concentrado, diluido 1:10 y diluido 1:50



Fuente: Datos del laboratorio de cultivo de células del Centro de Biotecnología de la UNL.

Elaborado por: Gianella Liseth Valarezo Blacio.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

De la siguiente gráfica del extracto en diferentes diluciones con células RKO en todos los casos a las 6 horas se observa que no existe proliferación debido a que las células se encuentran recién cultivadas con el extracto a distintas concentraciones, ya que estas se multiplican cada 24 horas, observándose a las 36 horas un aumento significativo de células en multiplicación y crecimiento; con extracto concentrado del 61.4%, con extracto diluido 1:10 el 81.3% y con extracto diluido 1:50 el 77.2%; en el caso de las 72 horas las células ya no proliferan debido al transcurso de las horas y acción del extracto, observando que en el extracto concentrado existe un 14.2%, en extracto 1:10 el 30.5% y extracto 1:50 el 61.6%.

TABLA # 2

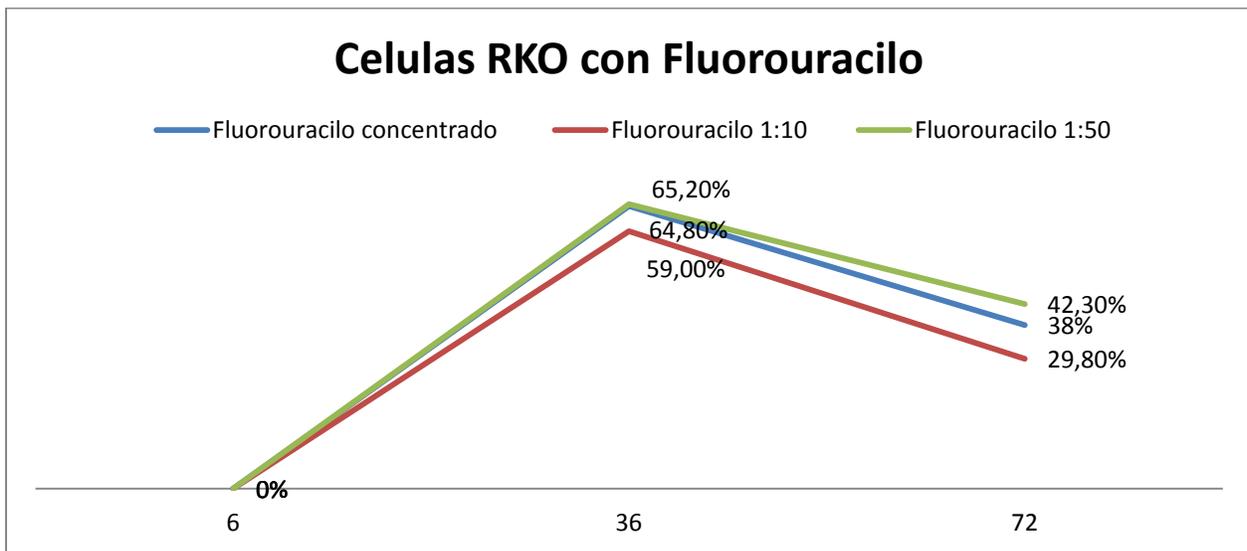
Células RKO con medicamento Fluorouracilo concentrado, diluido 1:10, diluido 1:50

Proliferación Tiempo (horas)	FLUOROURACILO concentrado	FLUOROURACILO 1:10	FLUOROURACILO 1:50
6 HORAS	0%	0%	0%
36 HORAS	64.8%	59.0%	65.2%
72 HORAS	38%	29.8%	42.3%

Fuente: Datos del laboratorio de cultivo de células del Centro de Biotecnología de la UNL.
Elaborado por: Gianella Liseth Valarezo Blacio.

GRÁFICA # 2

Células RKO con medicamento Fluorouracilo concentrado, diluido 1:10, diluido 1:50



Fuente: Datos del laboratorio de cultivo de células del Centro de Biotecnología de la UNL.
Elaborado por: Gianella Liseth Valarezo Blacio.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

De la siguiente gráfica del medicamento en diferentes diluciones con células RKO se observa que en todos los casos a las 6 horas no existe proliferación debido a que las células se encuentran recién cultivadas, observándose a las 36 horas un aumento significativo de células en multiplicación y crecimiento; con medicamento concentrado el 64.8%, con medicamento diluido 1:10 el 59.0% y con medicamento diluido 1:50 del 65.2%; en el caso de las 72 horas se observa que las células ya no proliferan debido al transcurso de las horas y acción del medicamento, en donde el medicamento concentrado presenta un 38%, en medicamento 1:10 el 29.8% y medicamento 1:50 el 42.3%.

VIABILIDAD CELULAR

TABLA # 3

Línea celular de cáncer de colon (RKO) con extracto etanólico de hojas de Annona Cherimola

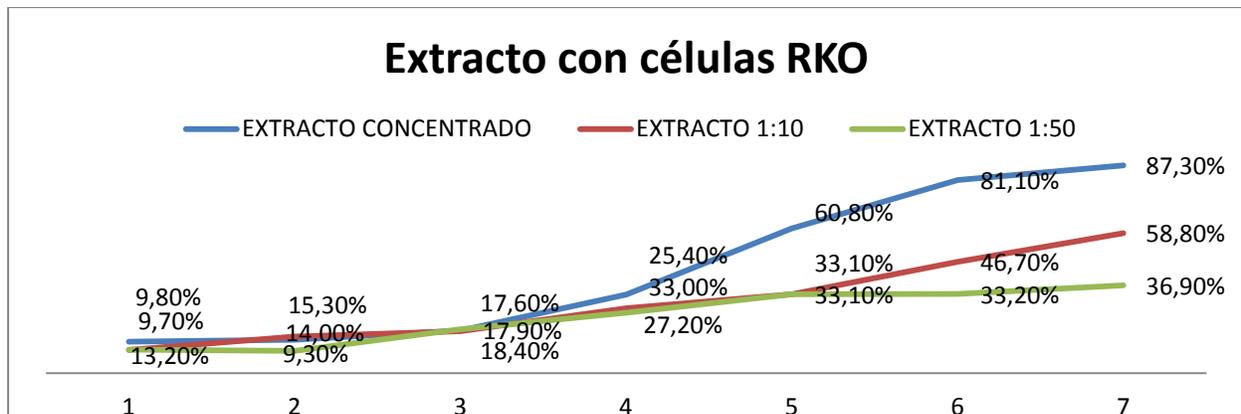
HORAS	EXTRACTO CONCENTRADO	EXTRACTO 1:10	EXTRACTO 1:50
6	13.2%	9.7%	9.8%
12	14.0%	15.3%	9.3%
24	17.9%	17.6%	18.4%
36	33.0%	27.2%	25.4%
48	60.8%	33.1%	33.1%
60	81.1%	46.7%	33.2%
72	87.3%	58.8%	36.9%

Fuente: Datos del laboratorio de cultivo de células del Centro de Biotecnología de la UNL.

Elaborado por: Gianella Liseth Valarezo Blacio.

GRÁFICA # 3

Línea celular de cáncer de colon (RKO) con Extracto etanólico de hojas de Annona Cherimola



Fuente: Datos del laboratorio de cultivo de células del Centro de Biotecnología de la UNL.

Elaborado por: Gianella Liseth Valarezo Blacio.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

En la siguiente grafica se puede observar que el comportamiento es diferente de acuerdo a la concentración del extracto observándose que existe una citotoxicidad del 87.3% con el extracto concentrado, con extracto 1:10 el 58.8% y con el extracto 1:50 el 36.9% a las 72 horas. Al analizar los resultados a las 6 horas se observa que en el extracto concentrado es de 13.2%, con el extracto 1:10 es de 9.7% y en el extracto 1:50 es de 9.8% lo que indica que el efecto del extracto etanólico a mayor concentración tiene más potencia de muerte celular que en relación a las demás concentraciones, mostrando que existe mayor citotoxicidad conforme pasan las horas.

TABLA # 4

Línea celular de cáncer de colon humano (RKO) con medicamento Fluorouracilo (control positivo)

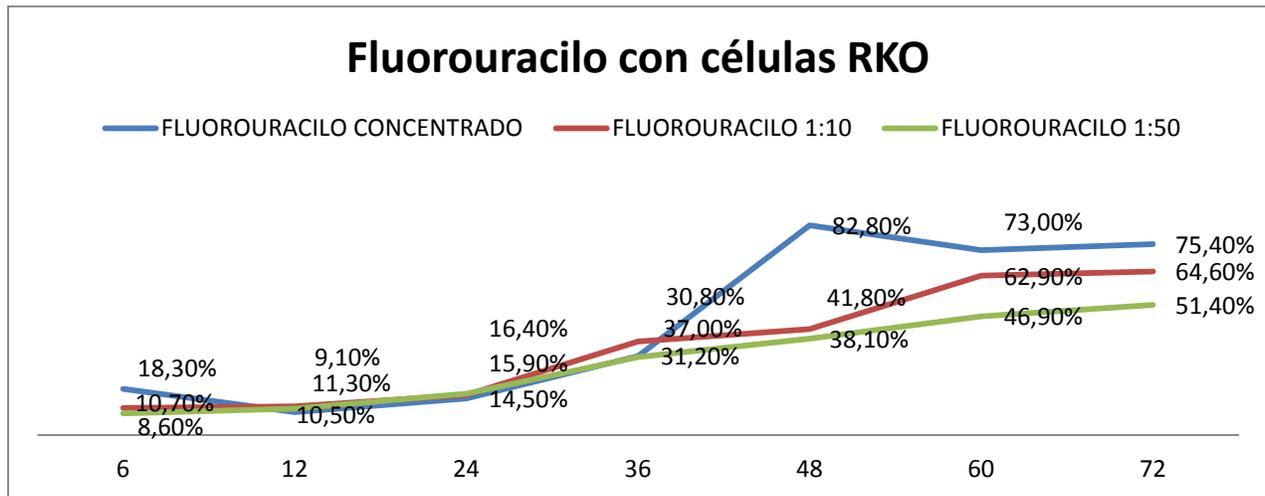
HORAS	FLUOROURACILO CONCENTRADO	FLUOROURACILO 1:10	FLUOROURACILO 1:50
6	18.3%	10.7%	8.6%
12	9.1%	11.3%	10.5%
24	14.5%	15.9%	16.4%
36	31.2%	37.0%	30.8%
48	82.8%	41.8%	38.1%
60	73.0%	62.9%	46.9%
72	75.4%	64.6%	51.4%

Fuente: Datos del laboratorio de cultivo de células del Centro de Biotecnología de la UNL.

Elaborado por: Gianella Liseth Valarezo Blacio.

GRÁFICA # 4

Línea celular de cáncer de colon humano (RKO) con medicamento Fluorouracilo (control positivo)



Fuente: Datos del laboratorio de cultivo de células del Centro de Biotecnología de la UNL.

Elaborado por: Gianella Liseth Valarezo Blacio.

Interpretación de resultados:

En la siguiente grafica se observa que existe mayor citotoxicidad de células tumorales RKO dando un porcentaje del 75,4% con el medicamento concentrado, con el medicamento diluido 1:10 el 64,6% y con el medicamento diluido 1:50 el 51,4% a las 72 horas. Al analizar los resultados a las 6 horas se observa que en el medicamento concentrado es de 18,3%, con el medicamento 1:10 de 10,7% y en el medicamento 1:50 es de 8,6% lo que indica que el efecto del fluorouracilo a mayor concentración tiene más potencia de muerte celular que en relación a las demás concentraciones, mostrando que existe una mayor citotoxicidad conforme pasan las horas.

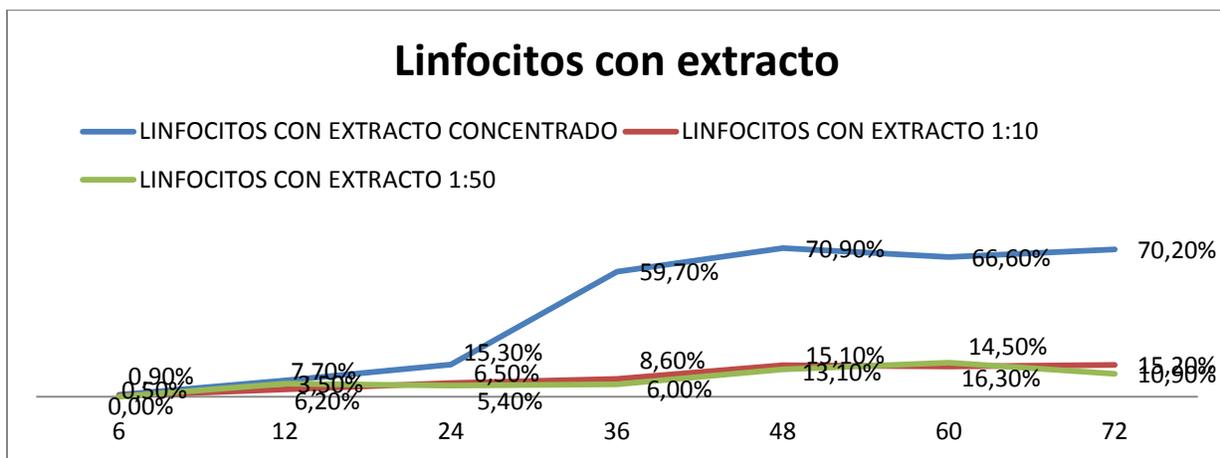
TABLA # 5
Linfocitos humanos con extracto etanólico concentrado, 1:10 y 1:50

HORAS	LINFOCITOS CON EXTRACTO CONCENTRADO	LINFOCITOS CON EXTRACTO 1:10	LINFOCITOS CON EXTRACTO 1:50
6	0.9%	0.5%	0.0%
12	7.7%	3.5%	6.2%
24	15.3%	6.5%	5.4%
36	59.7%	8.6%	6.0%
48	70.9%	15.1%	13.1%
60	66.6%	14.5%	16.3%
72	70.2%	15.2%	10.9%

Fuente: Datos del laboratorio de cultivo de células del Centro de Biotecnología de la UNL.

Elaborado por: Gianella Liseth Valarezo Blacio.

GRÁFICA # 5
Linfocitos humanos con extracto etanólico concentrado, 1:10 y 1:50



Fuente: Datos del laboratorio de cultivo de células del Centro de Biotecnología de la UNL.

Elaborado por: Gianella Liseth Valarezo Blacio.

Interpretación: De los ensayos realizados se observa que existe una mayor citotoxicidad del 70.2% en linfocitos con extracto concentrado, con una significativa diferencia con los linfocitos con extracto diluido 1:10 que presenta el 15.2% y linfocitos con extracto diluido 1:50 el 10.9% a las 72 horas. Al analizar los resultados a las 6 horas se observa que en los linfocitos concentrado es de 0.9%, con linfocitos 1:10 es de 0.50% y linfocitos 1:50 es de 0.00% lo que indica que el efecto del extracto etanólico con linfocitos a mayor concentración tiene más potencia de muerte celular que en relación a las demás concentraciones, mostrando que existe una mayor citotoxicidad conforme pasan las horas.

7. DISCUSIÓN

El presente estudio se llevó a cabo mediante el desarrollo de técnicas analíticas de viabilidad celular, procedimientos de proliferación celular, siendo esta una investigación de tipo experimental prospectiva realizada en los laboratorios de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja, dónde se avaluó el efecto citotóxico de las hojas de *Annona cherimola* frente a células de cáncer de colon (RKO) en medio de cultivo con pH ácido, los cuales se desarrollaron con la ayuda del colorante azul de tripano, estos protocolos nos ayudaron a determinar una favorable disminución de células cancerígenas de un 87.3% a las 72 horas, en el caso del medicamento fluorouracilo a las 72 horas se observó el 75,4% de muerte celular pero también observamos que produce muerte de células normales linfocitos en un 70.2 %, en cuanto a la proliferación celular se puede observar que a las 72 horas la acción del extracto es más potente debido a que hay una proliferación del 14.2%, demostrando así que el extracto al transcurso de las horas y a mayor concentración no da lugar a la multiplicación de células tumorales

Mediante un estudio realizado en Perú en el año 2009 en donde se evaluó el efecto citotóxico del extracto etanólico de las semillas de *Annona cherimola* en cultivos de cáncer de cérvix, mama, leucemia mieloide crónica y fibroblastos de ratón 3T3, se mostraron los siguientes resultados: cáncer de cérvix (ME-180) en un 9,4, para adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) un 6,6, para leucemia mieloide crónica K562 un 2,2y 29,5 para los fibroblastos de ratón, brindando así alentadores resultados para las células tumorales debido a su alta citotoxicidad considerándose >1 citotóxico según el método de concentración inhibitoria mediante el análisis de regresión lineal por medio de ecuación de la recta ($y=mx+b$) no

observándose de la misma manera en el caso de las células normales como es el 3T3 con alto porcentaje de citotoxicidad. En el caso del medicamento ensayado en este estudio fluorouracilo se encontró para adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) un 3,4, para leucemia mieloide crónica K562 un 3,8 y 0,2 para los fibroblastos de ratón mostrándose así que el medicamento no es citotóxico para las células normales 3T3.

Cabe mencionar que los métodos utilizados en ambos estudios son diferentes debido que en nuestro estudio se obtuvo la viabilidad celular mediante el conteo de células vivas y muertas obtenido en porcentajes; brindándonos resultados alentadores al igual que el estudio antes mencionado con una alta capacidad citotóxica de las células tumorales.

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

acción citotóxica selectiva invitro del Muricin H ya que este tuvo mayor efecto citotóxico para la línea H460y menor para la línea 3T3 en relación con el fluorouracilo.

A pesar de que esta investigación se realizó con la *annona muricata* (guanábana) y nuestro estudio es sobre *anona cherimola* estas investigaciones se asemejan ya que estas plantas pertenecen a la misma familia anonácea. Los datos antes mencionados se relacionan con el presente estudio ya que en el caso del extracto etanólico de hojas de *Annona cherimola* frente a células tumorales de colon (RKO) en medio de cultivo con pH ácido a mayor concentración 1 mg/ml a las 72 horas se observó una muerte celular del 87.3%, en el caso del medicamento fluorouracilo a las 72 horas se observó el 75.4% de muerte celular y en cuanto a la proliferación celular se puede observar que a las 72 horas la acción del extracto es más potente debido a que hay una proliferación del 14,2%; los métodos utilizados en ambos estudios son diferentes debido a que en nuestro estudio se obtuvo la viabilidad celular mediante el conteo de células vivas y muertas obtenido en porcentajes; brindándonos resultados alentadores al igual que el estudio antes mencionado con una alta capacidad citotóxica de las células tumorales.

Mediante un tercer estudio realizado, donde se avaluó el efecto citotóxico de *Annona Muricata* (guanábana) en cultivo de líneas celulares de adenocarcinoma gástrico y pulmonar en el cual se demostró que el extracto etanólico de las hojas de *Annona Muricata* presentan mayor efecto citotóxico sobre las líneas tumorales C678 (adenocarcinoma gástrico de ratón) y H460 (cáncer de pulmón) en comparación con las concentraciones homólogas de 5 fluorouracilo; el presente estudio se relaciona a los datos antes mencionados ya que en el caso del extracto etanólico de hojas de *Annona cherimola* frente a células tumorales de colon (RKO) en medio de cultivo con pH ácido a las 72 horas se observó una muerte celular del 87.3% y en el caso del medicamento

fluorouracilo a las 72 horas se observó el 75.4% de muerte celular, cabe mencionar que los métodos utilizados en ambos estudios son diferentes debido a que en nuestro estudio se obtuvo la viabilidad celular mediante el conteo de células vivas y muertas obtenido en porcentajes; brindándonos resultados alentadores al igual que el estudio antes mencionado con una alta capacidad citotóxica de las células tumorales.

8. CONCLUSIONES

Después de finalizado el trabajo investigativo y teniendo en cuenta el cumplimiento de los objetivos de la misma y los resultados obtenidos, se concluye lo siguiente:

- Ⓢ En cuanto a la proliferación celular se concluye que la acción del extracto y el fluorouracilo se asemejan ya que a las 36 horas existe una proliferación del 61.4% para extracto concentrado y 64,8% para el anti tumoral en cambio a las 72 horas la acción del extracto es más potente debido que hay una proliferación del 14,2% en relación con el fluorouracilo con el 37,5% concluyéndose así que el extracto a mayor concentración no da lugar a la multiplicación de células tumorales.

- Ⓢ En lo que respecta a viabilidad celular de los ensayos efectuados con el extracto etanólico en medio de cultivo con pH ácido en las diferentes concentraciones se concluye que el extracto que más potencia citotóxica posee es el extracto concentrado que se encuentra en una proporción de un 1 mg/ ml observándose que existe un 87,3% de muerte de células cancerígenas a las 72 horas en relación a los otros extractos 58,8% con extracto diluido 1:10 y el 36,9% con el extracto diluido 1:50.

9. RECOMENDACIONES

Así mismo y en base a las conclusiones antes propuestas se generan las siguientes recomendaciones:

- ④ Se recomienda que se continúe realizando investigaciones posteriores donde se pueda tomar en cuenta otras partes de la planta como son el tallo, las semillas, raíz etc. para de esta manera conocer qué acción citotóxica presentan dichas partes.

- ④ Es importante recalcar que el presente estudio se realizó con extracto etanólico, sin embargo se recomienda para futuras investigaciones obtener el principio activo de la hoja de *Annona cherimola* para sí obtener las acetogeninas que en si son el compuesto que provoca la muerte de células tumorales.

- ④ Existen otros métodos para realizar viabilidad celular y proliferación tales como las prueba del MTT (ensayos colorimétricos de cuantificación espectrofotométrica), ensayos de inmunocitoquímica, etc. los cuales son más sensibles; por lo tanto se recomienda en futuras investigaciones poder aplicarlos.

10. BIBLIOGRAFÍA

Angel Q, David C, Jose R, David Z, Margarita C y Abraham J. (2009). Efecto citotóxico de las semillas de *Annona cherimola* en cultivos de cáncer de cérvix, mama y leucemia mieloide crónica. *scielo*, 26, 14.

Acosta, L. (2009). El Cáncer Colorrectal. 11/01/2015, de Instituto Catalá de Oncología Sitio web: <http://www.europacolonespana.org/multimedia/Folleto%20Cancer%20colorrectal%20%28Español%29.pdf>

Alejandro P, Fabián G, Daniela G. (2011). Gastroenterología. 29/10/2014, de Universidad de la frontera. Recuperado de http://www.med.ufro.cl/clases_apuntes/medicinainterna/gastroenterologia/docs/12-cancer-colon.pdf

Asociación Española Contra el Cáncer. (2014). Anatomía del colon. 02/02/2015, de aecc. Recuperado de <https://www.aecc.es/SOBREELCANCER/CANCERPORLOCALIZACION/CANCERDECOLON/Paginas/anatomia.aspx>

Bioversity International y CHERLA. (2008). Descriptores para chirimoyo (*Annona cherimola* Mill.). Bioversity International, Roma, Italia; Proyecto CHERLA, Málaga, España.

Blues, M. (2010). Milagrosa Cirimoya. 05/02/2015, de Buzón Azul. Recuperado de <http://buzonazul.blogspot.com/2010/08/milagrosa-chirimoya-cura-el-cancer.html>

Copyright American Cancer Society. (2014). Cáncer de estómago. 24/09/2014, de American Cancer Society. Recuperado de <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002322-pdf>.

Caserras B. y Martinez J. Cáncer Colorrectal. Recuperado de <http://www.elsevierinstituciones.com/ficheros/booktemplate/9788475927220/files/Capitulo31.pdf>

Copyright American Cancer Society. (2014). Cáncer Colorrectal. 18/09/2014, de American Cancer Society. Recuperado de <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002290-pdf.pdf>

Campos, I. (2007). Cultivos celulares. 25/01/2015, de Cultek. Recuperado de <http://es.scribd.com/doc/194423259/Aplica-Cultivos-Celulares-2007#scribd>

Castañó, E., Zapata, J. (2012). principios de virología. 22/01/2015, de Biogénesis. Recuperado de <http://editorialbiogenesis.udea.edu.co/index.php/biogenesis/article/viewFile/252/252>

David Z, David R, Stephanie S. (2014). Cáncer de colon. 26/09/2014, de University of Maryland medical center Sitio web: <http://umm.edu/health/medical/spanishency/articles/cancer-de-colon>

Departamento de Epidemiología del Ministerio de Salud de Chile. (2011). Reporte de Vigilancia de Enfermedades No Transmisibles. 27/09/2014, de Unidad de Estudios y Vigilancia de Enfermedades no Transmisibles del Departamento de Epidemiología del Ministerio de Salud de Chile. Recuperado de http://epi.minsal.cl/epi/0notransmisibles/vent/VENT_Mercosur_FINAL_17092011.pdf

Dmedicina. (2009). Cáncer de Colon. 02/02/2015, de El Mundo.es. Recuperado de <http://www.dmedicina.com/enfermedades/cancer/cancer-de-colon-1>

Edgar Serraga E. (2006). Fisiología de los Aparatos y Sistemas. Cuenca: Facultad de Ciencias Médicas.

González Vega, María Esther. (2013). Chirimoya (*Annona cherimola miller*), frutal tropical y sub-tropical de valores promisorios. *Reaalyc.org*, 34, 52-63.

Instituto Nacional del Cáncer. (2015). Cáncer de colon tratamiento. 21/05/2015, de Instituto Nacional del Cáncer. Recuperado de <http://www.cancer.gov/espanol/tipos/colorrectal/paciente/tratamiento-colorrectal-pdq>

James Cabrera Hernández. (2013). La Chirimoya. 04/09/2014. Recuperado de http://lachimoyafrutracurativa.blogspot.com/2013_12_01_archive.html

Jaime Szereszwski. (2009). Anatomía del Colon. 15/01/2015, de Facultad de medicina Buenos Aires. Recuperado de <http://www.sacd.org.ar/tcero.pdf>

Jorunal, R. (2010). Cuantificación de la proliferación y de la apoptosis. 17/01/2015, de BioCancer. Recuperado de <http://www.biocancer.com/journal/761/13-cuantificacion-de-la-proliferacion-y-de-la-apoptosis>

Kelley, W. (1992). Medicina interna. Argentina: Panamericana.

Laboratorio Takiwasi. (2011). Extractos de Plantas Medicinales. 08/05/2015, de Laboratorio Takiwasi. Recuperado de <http://www.laboratorio.takiwasi.org/esp/extract.php>

Ministerio de Salud Pública del Ecuador. (2011). Cáncer colorrectal. 24/09/2014, de periódico del Ministerio de Salud Pública del Ecuador. Recuperado de http://instituciones.msp.gob.ec/misalud/index.php?option=com_content&view=article&id=482:cancer-colorrectal-podra-diagnosticarsetempranamente&catid=51:mi-salud-al-dia&Itemid=242

Marcia M, Luisa M, Génesis R, Jeniffer C, Joselyn M, Sonia M, Keyla C, Ruddy A, Dennesis F, Fátima R. (2011). La guanábana usos y beneficios en la cura contra el cáncer. 05/10/2014, de Monografias.com. Recuperado de <http://www.monografias.com/trabajos91/guanabana-usos-beneficios-cura-cancer/guanabana-usos-beneficios-cura-cancer2.shtml>

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

María E. C. (2012). Cultivo celular. En principios de Virología Médica (50-64). Biogénesis.

María E. S. Cultivos celulares y sus aplicaciones. 18/09/2014, de ArgenBio. Recuperado de <http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/Cultivos%20celulares%20I%20Euge.pdf>

M. Hernández Rodríguez A. Sastre Gallego. (1999). Tratado de Nutrición. Madrid: Díaz de Santos.

Organización Mundial de la Salud. (2012). datos y cifras sobre el cáncer. 24/092014, de OMS. Recuperado de <http://www.who.int/cancer/about/facts/es/>

Ordoñez., J, Feli., P, Zamora., E, Espinosa. (2007). Tratado de medicina paliativa y tratamiento de soporte del paciente con cáncer. Madrid: Panamericana.

Oscar T, Juan R, Carlos M y Enrique B. (2010). Cáncer de Colon y Recto. Scielo, 28, 1-12.

Robbins M. (2010). Patología Humana Madrid - España: Elsevier

Rober. (2012). viabilidad celular. 18/04/2015, de buenas tareas. Recuperado de <http://www.buenastareas.com/ensayos/Viabilidad-Celular/3750112.html>

Sociedad de Lucha contra el Cáncer, Registro Hospitalario 2014, *SOLCA* Loja.

Sociedad de Lucha contra el Cáncer, Registro de Tumores Loja.

Salud Milenio. La chirimoya pelea contra el cáncer. Recuperado de <http://saludmilenio.blogspot.com/p/la-chirimoya-pelea-contra-el-cancer.html>

Segretin, M. (2010). Los cultivos celulares y sus aplicaciones. 28/01/2015, de ArgenBio. Recuperado de <http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/Cultivos%20celulares%20I%20Euge.pdf>

The patient education institute. (2011). Cáncer de colon. 19/12/2014, de X-Plain. Recuperado de <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/tutorials/coloncancerspanish/oc0691s5.pdf>

Terra Nostra. (2011). CHIRIMOYA- Annona Cherimola. 28/01/2015, de Terra Nostra. Recuperado de <http://terranostra-terranostra.blogspot.com/search/label/Annona%20cherimola>

Vida ok. (2011). La Chirimoya, Propiedades, Beneficios, Cáncer. 05/10/2014. Recuperado de <http://vidaok.com/la-chirimoya-propiedades-beneficios-cancer/>

Vega, M. (2013). Chirimoya (*Annona cherimola* Miller), frutal tropical y sub-tropical de valores promisorios. Scielo, 34, 1-15.

Wouter Vanhove. (2008). chirimoyo. 18/10/2014, de Bioersity International. Recuperado de http://www.bioersityinternational.org/uploads/tx_news/Chirimoyo_1295.pdf

11. ANEXOS

Anexo Nro. 1



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

Loja, 28 de mayo de 2015

Doctor.
Miguel Marín Gómez, Mg. Sc,
DIRECTOR DEL LABORATORIO DE CULTIVO CELULAR

A petición verbal de la interesada:

CERTIFICO:

Que la Srta. **Gianella Liseth Valarezo Blacio**, estudiante del **VIII MÓDULO** de la Carrera de **LABORATORIO CLÍNICO**, con cédula de identidad 0705745545 fue aceptada para ser parte del grupo de estudiantes para que participe en la realización del proyecto **“Evaluar el efecto citotóxico de las hojas de *Annona cherimola* en líneas celulares cancerígenas”**, el mismo que forma parte del trabajo final de investigación que debe realizar el estudiante previo a la obtención del título de Licenciada en Laboratorio Clínico.

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

Atentamente

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

Anexo Nro.2

PREPARACION DE MEDIO DE CULTIVO RPMI COMPLETO

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

MEDIO DE CONGELACIÓN

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

Fuente: Protocolos realizados en el Laboratorio de Cultivo Celular del Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.

Anexo Nro. 3

TRIPSINIZACIÓN DE CÉLULAS (PASES O SUBCULTIVOS)

- ❖ Eliminar todo el contenido de medio de la botella
- ❖ Agregar 5 ml de medio de cultivo incompleto, dejar unos minutos y sacar completamente
- ❖ Agregar 2 ml de tripsina al 0,25%, especial para el cultivo, con esto las células comienzan a desprenderse.
- ❖ Mantener moviendo dando golpes suaves a la botella, si no se sueltan las células se pueden incubar unos minutos a 37°C
- ❖ Seltas las células, agregar 10 ml de medio RPMI completo, sacar todo ese contenido a un tubo falcón y centrifugar 10 minutos a 1500 rpm.

Fuente: Protocolos realizados en el Laboratorio de Cultivo Celular del Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.

Anexo Nro. 4

CRIOCONGELACIÓN

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

Fuente: Protocolos realizados en el Laboratorio de Cultivo Celular del Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.

Anexo Nro. 5

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.
- ❖ Cambiar el medio de cultivo al día siguiente para eliminar posibles restos de DMSO y células muertas.

Fuente: Protocolos realizados en el Laboratorio de Cultivo Celular del Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.

Anexo Nro. 6

MEDIO DE CULTIVO CON pH ÁCIDO

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

Una solución 1N se prepara de la siguiente manera:

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

$$\frac{50 * 1}{5} = 10 \text{ ml}$$

V1: quiero preparar

N1: concentración que quiero preparar

V2: lo que quiero calcular

N2: La mayor concentración del HCL que es 5N

- En un matraz se colocan 10 ml de HCL concentrado y se afora a 50 ml de H2O destilada y queda la solución de HCL al 1N.
- En el medio de cultivo incompleto se coloca esta solución gota a gota hasta que el Peachímetro marque el valor necesario hasta que se haga ácido.

Fuente: Protocolos realizados en el Laboratorio de Cultivo Celular del Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.

Anexo Nro. 7

TRIPSINIZACIÓN DE CÉLULAS (PASES O SUBCULTIVOS)

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

Fuente: Protocolos realizados en el Laboratorio de Cultivo Celular del Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.

Anexo Nro. 8

TÉCNICA DE FICOLL HYPaque

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

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

FUENTE: Protocolo tomado de la técnica Ficoll Hypaque de la casa comercial SIGMA.

Anexo Nro. 9

PARA COLOCAR LAS CÉLULAS EN CADA POCILLO (CÁLCULOS)

LÍNEAS CELULARES (en el caso de extracto etanólico)

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

Fuente: Protocolos realizados en el Laboratorio de Cultivo Celular del Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.

Anexo Nro. 10

PREPARACIÓN DE EXTRACTO EN DIFERENTES CONCENTRACIONES

EXTRACTO ETANÓLICO:

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

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

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

Fuente: Protocolos realizados en el Laboratorio de Cultivo Celular del Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.

PREPARACIÓN DE CONTROLES POSITIVOS

FLUOROURACILO

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

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

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

Fuente: Protocolos realizados en el Laboratorio de Cultivo Celular del Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.

Anexo Nro.12

CONTAJE DE CÉLULAS CON AZUL DE TRIPANO (VIABILIDAD CELULAR)

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

Fuente: Protocolos realizados en el Laboratorio de Cultivo Celular del Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.

Anexo Nro. 13

PROLIFERACIÓN CELULAR

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

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

Fuente: Protocolos realizados en el Laboratorio de Cultivo Celular del Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.

Anexo Nro. 14

PROTOCOLO DE VIABILIDAD CELULAR

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

Ensayo del Azul Tripan

Realización del ensayo:

- Mezclar 20 ul de suspensión celular con 20ul ml de azul tripán.
- Mezcle la suspensión celular con azul tripán por pipeteo de 5 a 8 veces.
- Coloque 20 μ L de la mezcla en cada cámara del hemocitómetro.
- Coloque el hemocitómetro en el microscopio y localice las cuadrículas.
- Deje que las células se asienten durante 1-2 minutos y proceda al conteo.
- Cuente por separado a las células azules (muertas) y a las células refringentes o blancas (vivas) que sean observadas en cada uno de los cuadros por considerar.
- Calcular el porcentaje de viabilidad.

$$\text{Viabilidad celular} = (\%) (\text{Número de células vivas totales}) \div (\text{Número de células Totales [vivas+muertas]}) \times 100$$

Fuente: Protocolos realizados en el Laboratorio de Cultivo Celular del Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.

Anexo Nro. 15

Proliferación celular

Se realizaron los cálculos correspondientes a la proliferación celular mediante el contaje de células confluentes

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

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

Fuente: Protocolos realizados en el Laboratorio de Cultivo Celular del Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.

Anexo Nro. 16

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

EXTRACTO ETANÓLICO + RKO

PRUEBA DE ADEVA

Fuente	GL	F Valor	F. tab
Trat.	27	82.72	<.0001

R-cuadrado	Coefficiente de variación	Valor media
0.976462	14.33316	28.15917

DUNCAN

Prueba de Rango Múltiple de Duncan por su valor.

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

T. STUDENTS.

Análisis Variable

Valor medio	T. calculado	F. tabular
14.1285714	2.44	0.0508

FLUOROURACILO + RKO

PRUEBA DE ADEVA

Fuente	GL	F Valor	F. tab.
Trat.	27	101.64	<.0001

R-cuadrado	Coefficiente de variación	Valor media
0.980715	12.38031	29.69357

DUNCAN

Prueba de Rango Múltiple de Duncan por su valor.

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

T. STUDENTS.

Análisis Variable

Valor medio	T. calculado	F. tabular
8.5857143	1.45	0.1985

FOTOGRAFÍAS DEL TRABAJO DE CAMPO

PREPARACIÓN DE LOS LINFOCITOS HUMANOS

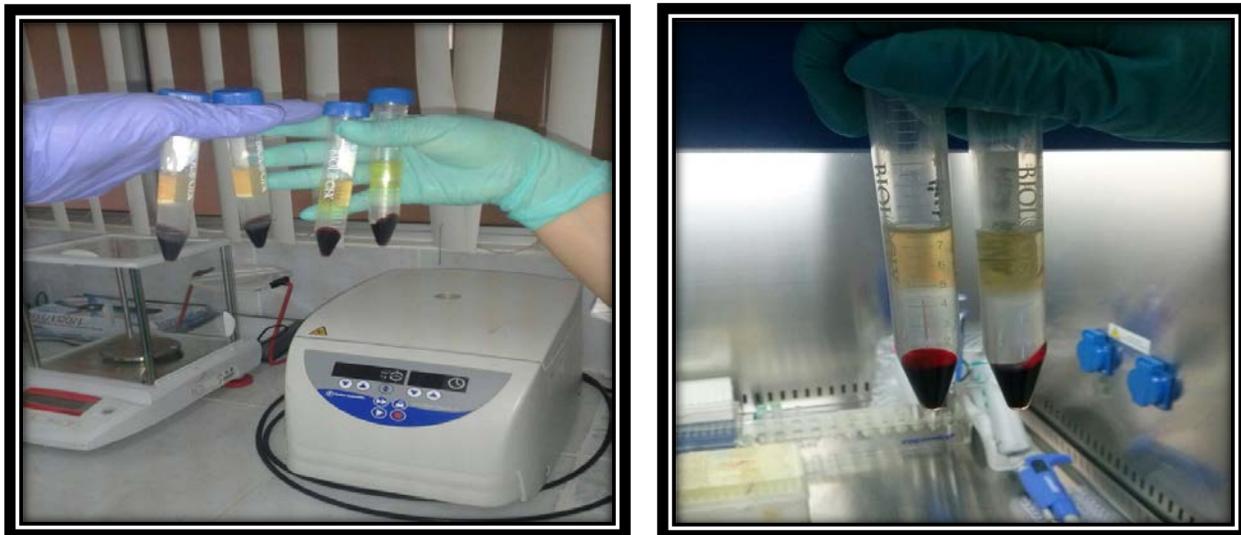


Fig. 1 centrifugación de sangre periférica para obtener linfocitos

PIPETEO DE LAS MUESTRAS EN LOS POCILLOS



Fig. 2 colocación del extracto etanólico a las líneas celulares RKO

INCUBACIÓN DE LAS CÉLULAS



Fig. 3 Mantenimiento de células en la incubadora con CO₂ al 5% y humedad del 98%

COLOCACIÓN CON AZUL DE TRIPANO EN LAS CÉLULAS PARA SU OBSERVACIÓN



Fig. 4 Técnica de tinción con azul de tripano para cuantificación de las células

CÉLULAS “RKO” VIVAS Y MUERTAS CON EXTRACTO ETANÓLICO

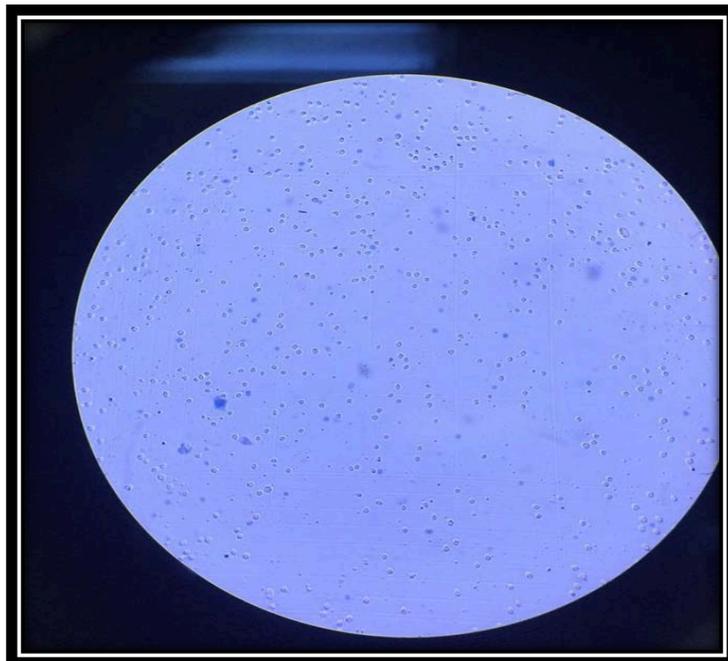


Fig. 5 Observación de células RKO vivas y muertas con extracto etanólico de hojas de Annona Cherimola

PROLIFERACIÓN CELULAR



Fig. 6 Observación de la proliferación de células RKO

INDICE DE CONTENIDOS

CONTENIDO	PÁGINA
Carátula.....	i
Certificación.....	ii
Autoría.....	iii
Carta de Autorización.....	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 COLON.....	7
4.1.1 TIPOS DE CÁNCER DE COLON.....	7
4.1.1.1 Adenocarcinomas.....	7

4.1.1.2 Tumores del estroma gastrointestinal.....	8
4.1.1.3 Linfomas.....	8
4.1.1.4 Sarcomas.....	8
4.1.2 ETIOLOGÍA.....	8
4.1.3 EPIDEMIOLOGIA.....	8
4.1.4 FACTORES DE RIESGO.....	9
4.1.4.1 Alimentación.....	9
4.1.4.2 Inactividad física.....	9
4.1.4.3 Obesidad.....	9
4.1.4.4 Consumo de tabaco.....	10
4.1.4.5 Consumo de alcohol.....	10
4.1.4.6 Edad.....	10
4.1.4.7 Historia personal de pólipos.....	10
4.1.4.8 Historia personal de cáncer colorrectal.....	10
4.1.4.9 Enfermedades inflamatorias intestinales.....	10
4.1.4.10 Historia familiar.....	11
4.1.5 DIAGNOSTICO.....	11

4.1.5.1 Examen físico y antecedentes.....	11
4.1.5.2 Examen digital del recto.....	11
4.1.5.3 Prueba de sangre oculta en materia fecal.....	12
4.1.5.4 Enema de bario.....	12
4.1.5.5 Sigmoidoscopia.....	12
4.1.5.6 Colonoscopia.....	12
4.1.5.7 Biopsia.....	12
4.1.6 TRATAMIENTO.....	13
4.1.6.1 Cirugía.....	13
4.1.6.2 Radioterapia.....	13
4.1.6.3 Quimioterapia.....	13
4.1.6.4 Inmunoterapia.....	14
4.2 TRATAMIENTOS ALTERNATIVOS.....	14
4.3 FLUOROURACILO.....	15
4.4 pH.....	15
4.4.1 pH ácido.....	15
4.5 ANNONA CHERIMOLA.....	16

4.5.1 Distribución geográfica.....	17
4.5.2 Valor nutricional.....	17
4.5.3 Valor medicinal.....	18
4.6 EXTRACTO.....	19
4.6.1 PROCESOS PARA LA OBTENCIÓN DE UN EXTRACTO.....	19
4.6.1.1. Recolección de las plantas.....	19
4.6.1.2. Control de Calidad de la Materia Prima.....	20
4.6.1.3. Maceración.....	20
4.6.1.4. Filtración.....	20
4.6.1.5. Control de Calidad.....	20
4.7 CULTIVO CELULAR.....	21
4.7.1 TIPOS DE CULTIVOS CELULARES.....	22
4.7.1.1. Cultivo Primario.....	22
4.7.1.2 Cultivos secundarios.....	22
4.7.1.3 Cultivos en Monocapa.....	22
4.7.1.4 Cultivos en suspensión.....	23
4.7.1.5 Líneas celulares.....	23
4.7.1.6 Cepas celulares.....	23

4.7.2 TIPOS DE CRECIMIENTO CELULAR.....	23
4.7.3 FACTORES BÁSICOS PARA LA SUPERVIVENCIA CELULAR.....	24
4.7.3.1 Presion osmotica.....	24
4.7.3.2 Concentracion de hidrogenesis (pH).....	24
4.7.3.3 Gases.....	24
4.7.3.4 Dioxido de carbono.....	24
4.7.3.5 Iones orgánicos.....	25
4.7.3.6 Agua.....	25
4.7.3.7 Carbohidratos.....	25
4.7.3.8 Aminoácidos.....	25
4.7.3.9 L-Glutamina.....	26
4.7.3.10 Vitaminas.....	26
4.7.3.11 Antibióticos y antimicóticos.....	26
4.8 MEDICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.....	26
4.9 VIABILIDAD CELULAR.....	28
5. Materiales y métodos.....	30
6. Resultados.....	32

7. Discusión.....	37
8. Conclusiones.....	41
9. Recomendaciones.....	42
10. Bibliografía.....	43
11. Anexos.....	49
Anexo # 1: Oficio dirigido al Dr. Miguel Marin para permitir ser parte del presente proyecto de Investigación	49
Anexo # 2: Preparación de medio de cultivo RPMI y medio de cultivo de congelación.....	50
Anexo # 3: Subcultivos para mantenimiento y multiplicación de células RKO.....	51
Anexo # 4: Congelación celular.....	52
Anexo # 5: Descongelación celular.....	53
Anexo # 6: Preparación de medio de cultivo RPMI con pH ácido.....	54
Anexo # 7: Tripsinización de células RKO.....	55
Anexo # 8: Técnica de Ficoll Hypaque.....	56
Anexo # 9: Técnica para colocar las células en cada pocillo.....	57
Anexo # 10: Preparación de extractos en diferentes concentraciones.....	58
Anexo # 11: Preparación de control positivo fluorouracilo.....	59

Anexo # 12: Contaje de células con azul de tripano (viabilidad celular).....	60
Anexo # 13: Protocolo de proliferación celular.....	61
Anexo # 14: Cálculos para viabilidad celular.....	62
Anexo # 15: Cálculos para proliferación celular.....	63
Anexo # 16: Datos del programa estadístico SAS.....	64
Anexo # 17: Fotografías de trabajo de campo.....	66
Índice.....	69