



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

ÁREA DE LA SALUD HUMANA

CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

EFFECTO CITOTÓXICO DEL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE  
*Annona cherimola* EN UNA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE COLON  
HUMANO EN MEDIO DE CULTIVO CON pH ÁCIDO

*Tesis previa a la obtención del Título  
de Licenciado en Laboratorio Clínico*

**AUTOR**

Cristian Xavier Luna Jiménez

**DIRECTORA**

Lic. María del Cisne Loján González, Mg. Sc.

LOJA – ECUADOR

2016

## CERTIFICACIÓN

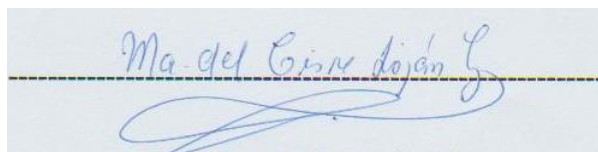
Loja, 21 de Enero de 2016

Lic. María del Cisne Loján González, Mg. Sc.

DIRECTORA DE TESIS

CERTIFICA:

Que el presente trabajo previo a la obtención del título de Licenciado/a en Laboratorio Clínico titulado: “EFECTO CITOTÓXICO DEL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE *Annona cherimola* EN UNA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE COLON HUMANO EN MEDIO DE CULTIVO CON pH ÁCIDO” de autoría del estudiante Cristian Xavier Luna Jiménez, ha sido realizado bajo mi dirección, por lo que se aprueba el mismo, pudiendo ser sometido a presentación pública y evaluación por parte del jurado calificador que se designe.

A rectangular box containing a handwritten signature in blue ink. The signature reads "Ma. del Cisne Loján G." and is written over a horizontal dashed line.

**Lic. María del Cisne Loján González, Mg. Sc.**

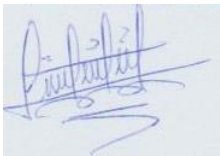
## AUTORÍA

Yo, Cristian Xavier Luna Jiménez declaro ser el autor 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.

**Autor:** Cristian Xavier Luna Jiménez.

**Firma:**



**Cédula:** 1104398563

**Fecha:** Loja, 21 de Enero de 2016


## CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS

Yo, Cristian Xavier Luna Jiménez, declaro ser autor de la tesis titulada EFECTO CITOTÓXICO DEL EXTRACTO ACUOSO 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 Licenciado/a 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 del Repositorio Digital Institucional (RDI).

Los usuarios pueden consultar su contenido de este trabajo en el RDI, en las redes de información del país y del exterior.

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

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, el 21 de Enero de 2016 firma:

- Firma: 
- Autor: Cristian Xavier Luna Jiménez
- Cédula: 1104398563
- Correo electrónico: cristian\_luna\_28@hotmail.com
- Dirección: Loja – Loja Ecuador
- Teléfono: 072571781 / 0985762518
- Directora: Lic. María del Cisne Loján González, Mg. Sc.
- Tribunal de Tesis:
  - Dra. Elsa Cumanda Ramírez Sanmartín.
  - Lcda. Glenda Alfarita Rodríguez León.
  - Dra. Diana Alexandra Montaña Peralta.

## **DEDICATORIA**

Esta tesis se la dedico a Dios quién supo guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

Para mi familia por su apoyo, consejos, comprensión, amor, ayuda en los momentos difíciles, y por ayudarme con los recursos necesarios para estudiar. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi empeño, mi perseverancia, mi coraje para conseguir mis objetivos.

Cristian Luna

## **AGRADECIMIENTO**

Le agradezco a Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.

Le doy gracias a mis padres por apoyarme en todo momento, por los valores que me han inculcado, y por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida. Sobre todo por un excelente ejemplo de vida a seguir.

A mis hermanos por ser parte de mi vida y representar la unidad familiar.

Dejo constancia de mi gratitud a la Universidad Nacional de Loja y de manera especial a la Lic. María del Cisne Loján, quien con su ética profesional dirigió la presente tesis haciendo posible su culminación. A los docentes de la carrera de Laboratorio Clínico, que han contribuido con sus valiosos conocimientos para concluir con éxitos mis estudios universitarios.

Cristian Luna

**1. TÍTULO:**

EFFECTO CITOTÓXICO DEL EXTRACTO ACUOSO 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 de colon es el crecimiento y proliferación anormal de células ubicadas en el colon; desde la transformación de una sola célula, hasta que se convierta en un cáncer detectable, debe transcurrir mucho tiempo debido a que conlleva a varias alteraciones en los genes de las células. A través de estudios realizados con la planta *Annona cherimola* se ha determinado que impide la proliferación y provoca la muerte de células tumorales, por lo que se planteó como objetivo verificar la actividad citotóxica del extracto acuoso de hojas de *Annona. Cherimola* en una línea celular de cáncer de colon humano en medio de cultivo con pH ácido. La presente investigación se basó en un estudio de diseño experimental – prospectivo, la cual se realizó en la ciudad de Loja, en los laboratorios de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja; para lo cual se realizó cultivos de células de cáncer de colon humano con el extracto acuoso de la hoja de *Annona cherimola* en un medio de cultivo con pH ácido, se procedió a utilizar técnicas colorimétricas para evaluar la proliferación y la viabilidad celular realizando los contajes respectivos de células vivas y células muertas en lapsos de tiempo determinados. Como resultados más relevantes se obtuvo una proliferación celular de 70.2% a las 36 horas y 63.3% a las 72 horas de incubación; con respecto a la viabilidad celular se obtuvo una muerte celular de 31.2% a las 48 horas y 37.6% a las 72 horas de incubación en el cultivo concentrado. Los resultados obtenidos en la presente investigación han demostrado que el extracto acuoso de la hoja de *Annona cherimola* tienen efecto citotóxico contra células tumorales pero no en gran proporción como lo hace el Fluorouracilo que es el medicamento específico para el cáncer de colon.

**Palabras clave:** cáncer, *Annona cherimola*, proliferación, viabilidad, Fluorouracilo.



## SUMMARY

Colon cancer is the abnormal growth and proliferation of cells located in the colon; from the transformation of a single cell until it becomes a detectable cancer elapses long as it carries several alterations in genes of the cells. Through studies of the plant *Annona cherimola* it is determined to prevent the proliferation and kills tumor cells, so it was proposed aimed at verifying the cytotoxic activity of aqueous leaf extract *Annona cherimola* in a cell line of human colon cancer in culture medium at acid pH. This research was based on a study of experimental design - prospective, which was held in the city of Loja, in the laboratories of Biotechnology of the National University of Loja; for which cell cultures of human colon cancer with the aqueous leaf extract of *Annona cherimola* in a culture medium at acid pH was carried out, we proceeded to use colorimetric techniques to assess proliferation and cell viability performing the respective counts of live cells and dead cells in certain time lapses. As most relevant results of cell proliferation by 70.2% at 36 hours and 63.3% after 72 hours incubation was obtained; regarding cell viability cell death of 31.2% at 48 hours and 37.6% after 72 hours incubation in the concentrated culture was obtained. The results of this research have shown that aqueous leaf extract of *Annona cherimola* have cytotoxic effect against tumor cells but not to a great extent as it does fluorouracil which is the specific drug for colon cancer.

**Keywords:** cancer, *Annona cherimola*, proliferation, viability, Fluorouracil.

### 3. INTRODUCCIÓN

El cáncer se origina cuando las células del organismo empiezan a crecer de forma descontrolada y no existe la apoptosis por lo que llegan a generar cáncer. El cáncer de colon es un problema de salud mundial con una frecuencia de 1 millón de casos y una mortalidad anual de más de 500.000 (Winawer S. 2010).

Es la segunda causa en frecuencia de mortalidad por cáncer entre hombre y mujeres; en el año 2012 fue la tercera causa de morbilidad a nivel mundial con 1,4 millones de casos; en América latina es el segundo cáncer más comúnmente diagnosticado tanto en hombres como en mujeres. Las tasas de incidencia entre mujeres y hombres hispanos son de 15 y 19 por ciento menores respectivamente que la de los blancos no hispanos (OMS. 2014).

A nivel de nuestro país las cifras van aumentando mostrando 1204 casos y 700 muertes en el 2012, en Loja entre el año 2005 y 2009 existe un promedio anual de 48 casos en mujeres y 39 en hombre con una mortalidad de 15 y 9 respectivamente. Entre el año 2013 – 2014 se han presentaron 49 casos de los cuales 40 fueron hombres y 39 mujeres (SOLCA. 2009).

Las plantas medicinales son importantes para la investigación farmacológica y el desarrollo de medicamentos para tratar distintos tipos de enfermedades razón por la cual se han realizado estudios en la planta *Annona cherimola* determinando que contiene compuestos de interés denominados acetogeninas y alcaloides los cuales describen una actividad citotóxica frente a células tumorales, con ello contribuir en el tratamiento a personas con cáncer de colon y evitar que padezcan efectos adversos (López M, 2012).

El objetivo planteado fue verificar la actividad citotóxica del extracto acuoso de hojas de *Annona Cherimola* en una línea celular de cáncer de colon humano en medio de cultivo con pH ácido.

Se realizó técnicas para determinar la proliferación y viabilidad celular mediante cultivos de células tumorales con el extracto acuoso de hojas de *Annona cherimola* y el Fluorouracilo. Luego se realizó el conteo de células vivas y muertas en la cámara de Neubauer utilizando azul de tripano para diferenciarlas.

Se obtuvo un 32.9 % de muerte celular frente al extracto y un 73.6 % frente al Fluorouracilo luego de 72 horas de incubación.

Podemos concluir que el extracto acuoso de las hojas de *Annona cherimola* en un medio con pH ácido no tiene una citotoxicidad significativa en comparación con el medicamento específico que se aplica para el tratamiento del cáncer de colon.

## **4. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **4.1 Medicina tradicional**

La medicina tradicional abarca una amplia variedad de terapias y prácticas que varían entre países y entre regiones. En algunos países se denomina medicina alternativa o complementaria (OMS. 2015).

La medicina tradicional es todo el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales (OMS. 2015).

### **4.2 Plantas medicinales**

#### **4.2.1 Importancia de las plantas medicinales**

Si bien la medicina moderna está bien desarrollada en la mayor parte del mundo, grandes sectores de la población de los países en desarrollo todavía dependen de los profesionales tradicionales, las plantas medicinales y los medicamentos herbarios para su atención primaria. Es más, durante los últimos decenios, el interés del público en las terapias naturales ha aumentado enormemente en los países industrializados, y se halla en expansión el uso de plantas medicinales y medicamentos herbarios (López M. 2012).

Las muchas y diversas formas de los productos medicinales tradicionales han evolucionado frente a entornos ampliamente diferentes en lo etnológico, cultural, climático, geográfico y aun filosófico (López M. 2012).

Evaluar estos productos y asegurar su inocuidad y eficacia mediante el registro y la reglamentación plantean importantes desafíos (López M. 2012).

Los medicamentos herbarios, que formaron la base de la atención de salud en todo el mundo desde los primeros días de la humanidad, siguen utilizándose ampliamente y tienen una considerable importancia en el comercio internacional. Sigue en aumento el reconocimiento de su valor clínico, farmacéutico y económico, si bien esto varía ampliamente entre un país y otro (López M. 2012).

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

#### **4.2.2 Fitoquímicos**

El término Fitoquímico significa sustancias químicas de las plantas que aunque no se consideran esenciales para nuestro metabolismo, son beneficiosas a largo plazo para nuestra salud (Aponte M, Calderon M, Delgado A. 2010).

Existen más de 2.000 fitoquímicos en las plantas, que se agrupan en clases de acuerdo a su función y sus características estructurales, de los cuales se considera que los TERPENOS, los FENOLES y los TIOLES, son los más estudiados (Aponte M, Calderon M, Delgado A. 2010).

#### **4.2.3 Principio activo**

Los principios activos son los ingredientes de los medicamentos herbarios que tienen actividad terapéutica. En el caso de los medicamentos herbarios cuyos principios activos hayan sido identificados, se debe normalizar su preparación, si se dispone de métodos analíticos adecuados, para que contengan una cantidad determinada de ellos. Si no se logra identificar los principios

activos, se puede considerar que todo el medicamento herbario es un solo principio activo (OMS. 2015).

### **4.3 Conceptualización de la *Annona cherimola***

#### **4.3.1 Taxonomía y morfología**

La chirimoya perteneciente a la familia *Annonaceae*, es una planta nativa de la región altoandina de Ecuador y Perú con gran diversidad en la provincia de Loja, en la que podemos encontrar un gran número de poblaciones o ecotipos, con una amplia diversidad genética, se encuentra formando densos bosques silvestres y en algunos huertos agrícolas. La chirimoya es la única especie del género *Annona* que se desarrolla en zonas subtropicales (Morales A, 2010).

#### **4.3.2 Origen**

El origen de esta especie está en la vertiente interandina cuyos ríos desembocan en el Marañón a una altura comprendida entre los 2200 y los 1500 m. Debajo de los 1500 m., las condiciones climáticas se hacen sumamente precarias para mantener la vida de las plantas que no tienen adaptaciones xerofíticas, desaparece prácticamente todo vestigio de chirimoya. Se pueden encontrar chirimoyos en estado silvestre y cultivado hacia el norte de su zona de origen, en algunas partes del sur de México, Centroamérica y parte norte de Sudamérica. Hacia el sur alcanza Bolivia y Argentina (Morales A, 2010).

A lo largo y ancho de la provincia de Loja, se encuentran verdaderos bosques en estado silvestre, en donde se puede observar a simple vista una impresionante variabilidad genética que han hecho subsistir a dichas poblaciones pese a las inclemencias ecológicas y malos tratos del hombre. A medida que nos alejamos de la provincia de Loja, ya sea hacia el norte como hacia el sur, la presencia de este frutal va desapareciendo tanto en diversidad

genética como en intensidad, lo cual nos indica que la provincia de Loja, especialmente las zonas subtropicales, pueden ser el centro genético y de origen de la chirimoya (Morales A, 2010).

#### **4.3.3 Usos y beneficios**

La familia *Annonaceae* y dentro de esta la especie *Annona cherimola*, se caracteriza por la presencia de numerosas sustancias bioactivas de diversa naturaleza química, en hojas, raíz, frutas y semillas. Esta especie es también conocida como planta medicinal, se plantea que el té elaborado a partir de sus hojas es relajante, así como que sus frutos poseen efecto laxante y garantizan beneficios a la digestión (Florez Y. Martinez E, 2010).

En especies foráneas de *A. cherimola* se han identificado compuestos incluyendo alcaloides y esteroides y se ha descrito el potencial citotóxico de extractos así como actividad anti-helicobacter pylori. Se ha reportado el contenido fenólico total y poder antioxidante de la fracción polifenólica del fruto, para mejorar su comercialización hacia Europa y USA (Florez Y, 2010).

Los frutos de chirimoya han sido caracterizados, encontrándose que producen una amplia gama de compuestos volátiles. Se han reportado alcaloides, terpenoides, flavonoides, acetogeninas y aceites saponificables. La bioactividad de este tipo de metabolitos de plantas pertenecientes a las *Anonáceas* está asociada a su efecto como insecticidas, actividad citotóxica, antitumoral, antibacterial, pesticida, antimalarial, antileishmaniasis y propiedades antihelmínticas (Florez Y. Martinez E, 2010).

Estas plantas de la familia *Annonaceae*, contienen en la semilla triglicéridos basados en ácidos grasos saturados e insaturados. Los más característicos son: ácido linoleico, ácido oleico, ácido esteárico, entre otros. Los aceites y otros

extractos de la planta contienen trazas de acetogeninas de reconocida citotoxicidad, que le confieren importantes propiedades e interés a esta familia botánica (Florez Y. Martinez E, 2010).

#### **4.3.4 Composición química de las hojas de *Annona cherimola***

Los compuestos de interés, por su comprobada actividad biológica presentes en las *Annonaceae*, son un grupo de metabolitos secundarios bioactivos conocidos como acetogeninas. Estas acetogeninas poseen un grupo  $\gamma$ -lactónico  $\alpha,\beta$ -insaturado o saturado y uno, dos, o tres anillos tetrahidrofuránicos sobre una larga cadena alquílica; las cuales presentan diferentes bioactividades como antitumoral inmunosupresiva, pesticida, antiprotozoal y antimicrobiana, Usualmente las posiciones  $\alpha$  a los anillos son hidroxiladas. Son compuestos de 35 o 37 carbonos de origen policétido, con una cadena alifática que se presenta, según el caso, hidroxilada, cetonzada y/o acetoxilada (Florez Y. Martinez E, 2010).

De las *Annonaceae*, se han reportado numerosas acetogeninas aisladas e identificadas tales como la Uvaracina, la primera que fue aislada de la planta de *Uvaria accuminata* en 1982, las acetogeninas de *Annonaceae* pueden inhibir selectivamente el crecimiento de las células cancerígenas y también inhibir el crecimiento de células resistentes. Las acetogeninas son potentes inhibidores de la NADH ubiquinona oxidoreductasa, que es una enzima esencial en el Complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (Florez Y. Martinez E, 2010).

Un estudio realizado en la Universidad de Purdue en Indiana USA, demostró que las acetogeninas pueden inhibir selectivamente el crecimiento de células cancerígenas y también inhibir el crecimiento de las células de tumores, resistentes a la adriamicina (fármaco quimioterapéutico), respetando la



integridad de las células de los tejidos sanos. En otro estudio realizado por científicos de la misma Universidad, se demostró que las acetogeninas de la guanábana son extremadamente potentes teniendo una dosis letal 50 (ED50) de hasta 10 microgramos por mililitro, con 10,000 veces la potencia de la adriamicina (Florez Y. Martinez E, 2010).

#### **4.3.4.1 Metabolitos**

El conjunto de reacciones químicas que tienen lugar en un organismo constituye el metabolismo. La mayor parte del carbono, del nitrógeno y de la energía termina en moléculas comunes a todas las células, necesarias para su funcionamiento y el de los organismos. Se trata de aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos, presentes en todas las plantas y desempeñando las mismas funciones que se denominan metabolitos primarios. Pero a diferencia de otros organismos, las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, y que se denominan metabolitos secundarios (también denominados productos secundarios, productos naturales) (Soto M. 2013).

##### **4.3.4.1.1 Metabolitos secundarios**

El metabolismo secundario compromete aquellos procesos químicos que son únicos para una planta dada, y no son universales. Dicho metabolismo es la química que conduce a la formación de un producto natural. Algunas porciones de esta química son comunes para un número de plantas diferentes o familias de plantas, pero actualmente la química de productos

naturales es usualmente diferente de una planta a otra. Precursores químicos comunes que pueden conducir a resultados diferentes (Soto M. 2013).

Se agrupan en cuatro clases principales.

- **Terpenos.** Entre los que se encuentran hormonas, pigmentos o aceites esenciales (Ávalos A, Pérez-Urria E. 2010).
- **Compuestos fenólicos.** Cumarinas, flavonoides, lignina y taninos. Glicósidos. Saponinas, glicósidos cardiacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos (Ávalos A, Pérez-Urria E. 2010).
- **Alcaloides.** Los alcaloides son moléculas de origen vegetal, aunque existen proto-alcaloide de origen animal. Se caracterizan por su estructura molecular compleja a base de átomos de carbón, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno. Hay aproximadamente 5000 alcaloides diferentes, y todos son de naturaleza alcalina (tienen un sabor amargo), de ahí su nombre (Ávalos A, Pérez-Urria E. 2010).

#### 4.3.4.1.1.1 Terpenos

Los terpenos, o terpenoides, constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios (más de 40.000 moléculas diferentes). La ruta biosintética de estos compuestos da lugar tanto a metabolitos primarios como secundarios de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas. Entre los metabolitos primarios se encuentran hormonas (giberelinas, ácido abscísico y citoquininas), carotenoides, clorofilas y plastoquinonas (fotosíntesis), ubiquinonas (respiración) y esteroides (de gran

importancia en las estructura de membranas) (Ávalos A, Pérez-Urria E. 2010).

Muchos terpenoides son comercialmente interesantes por su uso como aromas y fragancias en alimentación y cosmética, o por su importancia en la calidad de productos agrícolas. Otros compuestos terpenoides tienen importancia medicinal por sus propiedades anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimalariales, antimicrobianas, etc. (Ávalos A, Pérez-Urria E. 2010).

#### **4.3.4.1.1.1.1 Acetogeninas**

Los compuestos de interés, por su comprobada actividad biológica presentes en las *Annonaceae*, son un grupo de metabolitos secundarios bioactivos conocidos como acetogeninas. Estas acetogeninas poseen un grupo  $\gamma$ -lactónico  $\alpha,\beta$ -insaturado o saturado y uno, dos, o tres anillos tetrahidrofuránicos sobre una larga cadena alifática; las cuales presentan diferentes bioactividades como antitumoral inmunosupresiva, pesticida, antiprotozoal y antimicrobiana, usualmente las posiciones  $\alpha$  a los anillos son hidroxiladas. Son compuestos de 35 o 37 carbonos de origen policétido, con una cadena alifática que se presenta, según el caso, hidroxilada, cetonzada y/o acetoxilada (Ruiz, J. 2010).

Las acetogeninas de *Annonaceae* pueden inhibir selectivamente el crecimiento de las células cancerígenas y también inhibir el crecimiento de células resistentes. Las acetogeninas son potentes inhibidores de la NADH ubiquinona oxidoreductasa, que es una enzima esencial en el Complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (Flores Y, 2010).

Las acetogeninas derivados de la larga cadena de ácidos grasos tienen acción directa sobre las mitocondrias, el ATP, el Aparato Reticular de Golgi y las membranas y plasma celular de las células cancerosas destruyéndolas selectivamente sin dañar las células y tejidos sanos (Ruiz, J. 2010).

La modulación de la producción de ATP afecta la viabilidad de células específicas y el crecimiento de vasos sanguíneos que los nutren (Ruiz, J. 2010).

#### **4.4 Definición de extractos**

Mezcla compleja, con multitud de compuestos químicos, obtenible por procesos físicos, químicos, y microbiológicos a partir de una fuente natural y utilizable en cualquier campo de la tecnología. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) el 25% de los fármacos comercializados actualmente son de origen vegetal y un 25 % contiene principios vegetales modificados químicamente (Castaño M, Zapata J. 2012).

##### **4.4.1 Definición de extracto acuoso**

Preparación en agua de la sustancia de una determinada planta que contiene la fracción biológica sin el residuo celular (ONSALUS, 2015).

##### **4.4.2 Método de obtención del extracto acuoso**

Método de Infusión.- La droga se extrae con agua caliente, pero sin someterla a ebullición o con agua fría (Barahona V, 2013).

###### **4.4.2.1 Procedimiento**

- Pesar 10 gramos de hojas de guanábana.
- Hervir en 400 ml agua corriente o destilada por 15 minutos.
- Centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos.

- Dejar unos segundos tapar y apagar la llama.
- Enfriar, filtrar y envasar en un frasco ámbar (Barahona, V., 2013).

#### **4.5 Definición de cultivo celular**

La mayoría de las células animales y vegetales aisladas pueden vivir, multiplicarse, e incluso presentar ciertas propiedades diferenciales, si se las cultiva en placas de plástico y con medios de cultivo adecuados. Así, las células pueden ser observadas continuamente bajo el microscopio o analizadas bioquímicamente, para estudiar los efectos del agregado o remoción de moléculas específicas, como hormonas o factores de crecimiento (Pietrasanta L. 2011).

Además, se pueden estudiar las interacciones entre células, cultivando en la misma placa más de un tipo celular. Cuando los experimentos se realizan con cultivos celulares, se los denomina ensayos “in vitro” (“en vidrio”), para diferenciarlos de aquellos que se llevan a cabo en organismos completos, o experimentos “in vivo (“en organismo viviente”) (Pietrasanta L. 2011).

Los cultivos se establecen principalmente a partir de suspensiones celulares generadas por disgregación de tejidos. A diferencia de las bacterias, la mayoría de las células que forman parte de tejidos no pueden vivir en suspensión, y requieren una superficie sólida sobre la cual crecer y multiplicarse. Este soporte generalmente es la base de una placa o frasco de plástico, aunque a veces los requerimientos son más complejos y el plástico debe antes recubrirse con componentes de la matriz extracelular (sustancia que rodea y contiene a las células en los tejidos, y con la cual interactúan), como por ejemplo el colágeno y la fibronectina (Pietrasanta L. 2011).

## **4.5.1 Tipos de cultivo celular**

### **4.5.1.1 Cultivos primarios**

Se denominan así a aquellos cultivos preparados directamente a partir de un tejido u órgano. Pueden iniciarse con o sin fraccionamiento previo para separar los distintos tipos celulares. En estos cultivos las células están vivas, conservan sus características originales y su proliferación es limitada (Pietrasanta L. 2011).

### **4.5.1.2 Cultivos secundarios**

En estas condiciones las células suelen multiplicarse hasta cubrir la superficie del recipiente de cultivo, formando una monocapa (capa de una célula de espesor). Como consecuencia del contacto entre las células se detiene temporalmente su proliferación, hasta que se las subcultiva a un recipiente con medio fresco. Así, podrán subcultivarse durante semanas o meses. En este estadio, las células frecuentemente mostrarán distintas propiedades según su origen. Por ejemplo, los fibroblastos (células que sintetizan fibras y mantienen la matriz extracelular del tejido de muchos animales) secretarán colágeno, las células derivadas de tejido muscular esquelético se fusionarán para generar fibras musculares con capacidad contráctil espontánea, las células nerviosas extenderán prolongaciones (axones) eléctricamente excitables que podrán conectarse (establecer sinapsis) con otras células nerviosas, las células epiteliales formarán largas capas con varias propiedades de un epitelio intacto. Gracias a que estos fenómenos ocurren en cultivo, es posible estudiarlos con diferentes metodologías, a veces no aplicables a tejidos intactos (Segretin M. 2011).

### **4.5.1.3 Líneas celulares**

Cuando el cultivo proviene de células que han sido disgregadas de un tejido original recién extraído, recibe el nombre de Cultivo Primario. Cuando este cultivo primario es sometido a procesos de transformación que le confieren capacidad ilimitada de multiplicación, recibe el nombre de Línea Celular (Cárdenas C, Rodríguez A, 2011).

Las líneas celulares son muy útiles en la investigación celular, como fuente de un gran número de células uniformes, que pueden ser conservadas y almacenadas en nitrógeno líquido (a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) por un período muy largo de tiempo, reteniendo su viabilidad y siendo un buen modelo experimental para las primeras etapas de una investigación (Pietrasanta L, 2011).

### **4.5.2 Tipos de crecimiento celular**

Durante el establecimiento de un cultivo, dependiendo del tipo de células, se pueden obtener dos tipos de crecimiento: (Castaño M, Zapata J. 2012).

#### **4.5.2.1 Células adherentes o cultivos fijos**

Requieren unirse a una superficie para su multiplicación donde se formará una monocapa (Castaño M, Zapata J. 2012).

#### **4.5.2.2 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 M, Zapata J. 2012).

### **4.5.3 Factores básicos para la supervivencia celular**

- Presión osmótica
- Concentración de hidrogeniones
- Gases (oxígeno)
- Dióxido de carbono

- Iones orgánicos
- Agua
- Carbohidratos
- Aminoácidos
- L- Glutamina
- Vitaminas
- Suero
- Antibióticos y antimicóticos (Castaño M, Zapata J. 2012).

#### **4.6 Viabilidad celular**

Se basa en la evaluación del número de células vivas y muertas mediante la marcación con sustancias que evalúan dos parámetros: 1) la actividad de esterasa intracelular con el reactivo de calceína AM y 2) la integridad de la membrana celular con el reactivo de etidio H-1 (Eynard A. 2010).

La calceína AM, que no es fluorescente, penetra en células vivas y es convertida por la actividad de la esterasa mitocondrial, en el colorante polianiónico calceína, que es retenido por las células vivas y fluorescente intensamente en color verde. Por su parte el etidio H-1 no penetra la membrana plasmática de células vivas, pero penetra la membrana dañada de las células muertas y aumenta 40 veces su fluorescencia al unirse con los ácidos nucleicos, con una señal fluorescente de color rojo (Eynard A. 2010).

#### **4.7 Proliferación celular**

La proliferación celular es el incremento del número de células por división celular. La proliferación celular es más activa durante la embriogénesis y el desarrollo de un organismo y es fundamental para la regeneración de tejidos dañados o viejos. Es característica de cada tipo celular por lo que está controlada de



forma muy específica. El genoma codifica un conjunto complejo de proteínas que regulan la división celular y por tanto la proliferación de las células. Asimismo cada tipo celular presenta una serie de receptores de factores de crecimiento característicos que también regulan la proliferación celular al controlar la respuesta a tales factores (Proliferación celular. 2010).

El proceso de diferenciación hace que cada tipo celular exprese un perfil de genes característico. Este perfil de expresión marca la capacidad proliferativa de cada tipo celular y su forma de responder a cada tipo de estímulo. Hay células, como las epiteliales o las hematopoyéticas, con una alta capacidad proliferativa que están en constante renovación y otras, como las neuronas, que tienen una capacidad proliferativa muy baja (Proliferación celular. 2010).

El control de la proliferación celular es esencial para el correcto funcionamiento del organismo. La pérdida de esta regulación es la causa de enfermedades como el cáncer donde una célula forma una línea celular con capacidad de proliferación celular ilimitada e incontrolada debido a mutaciones genéticas. Por el contrario una pérdida de la capacidad de proliferación celular es uno de los factores que originan el envejecimiento (Proliferación celular. 2010).

El conteo de células a horas determinadas es importante ya que si existe una incubación prolongada las células no van a proliferarse por la ausencia de nutrientes en el medio de cultivo (Proliferación celular. 2010).

#### **4.8 ¿Qué es el pH y su importancia?**

Desde una aproximación simplificada, el pH puede definirse como una medida que expresa el grado de acidez o basicidad de una solución en una escala que varía entre 0 y 14. La acidez aumenta cuando el pH disminuye. Una solución con un pH

menor a 7 se dice que es ácida, mientras que si es mayor a 7 se clasifica como básica. Una solución con pH 7 será neutra (Goyenola G. 2010).

El valor de pH representa el menos logaritmo en base diez de la concentración (actividad) de iones hidrógeno  $[H^+]$ . Como la escala es logarítmica, la caída en una unidad de pH es equivalente a un aumento de 10 veces en la concentración de  $H^+$ . Entonces, una muestra de agua con un pH de 5 tiene 10 veces más  $H^+$  que una de pH 6 y 100 veces más que una de pH 7 (Goyenola G. 2010).

El pH afecta procesos químicos y biológicos en el agua. La mayor parte de los organismos acuáticos prefieren un rango entre 6,5 y 8,5. pHs por fuera de este rango suele determinar disminución en la diversidad, debido al estrés generado en los organismos no adaptados. Bajos pHs también pueden hacer que sustancias tóxicas se movilizan o hagan disponibles para los animales (Goyenola G. 2010).

#### **4.9 Terapia farmacológica para el cáncer**

El objetivo último de la terapéutica anticancerosa es la eliminación completa de toda célula cancerosa, mediante métodos quirúrgicos, radioterápicos y farmacológicos. Los distintos fármacos pueden clasificarse en función de su mecanismo de acción o del momento de actuación en el ciclo celular (Rodilla F. 2015).

##### **4.9.1 Fármacos antimetabolitos**

Actúan en la fase de síntesis del ciclo celular porque interfieren en la síntesis de ADN y ARN (Rodilla F. 2015).

###### **4.9.1.1 Análogos de las bases pirimidínicas**

Como análogo del uracilo destaca el 5-fluorouracilo (5-FU) que incorpora un átomo de fluor en posición 5 en lugar de hidrógeno. Lesiona las células por

dos mecanismos: inhibe la timidilato-sintetasa y se incorpora al ARN (Rodilla F. 2015).

Como análogo de la citosina destaca el arabinósido decitosina, citarabina o ara-C (arabinósido de citosina). Inhibe competitivamente la ADN-polimerasa; puede inhibir débilmente la actividad de la ADN-polimerasa, responsable de los procesos de reparación. (Rodilla F. 2015)

Otros análogo de la citosina de más reciente utilización es la gemcitabina (Gemzar), que inhibe la síntesis de ADN (Rodilla F. 2015).

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### **Tipo de estudio:**

La presente investigación fue de tipo Experimental – Prospectivo.

### **Área de Estudio:**

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

### **Técnicas y procedimientos**

#### **Fase pre-analítica**

- Oficio que permita ser parte del presente proyecto de Investigación. (Anexo 1)
- Adquisición de línea celular ATCC. (Anexo 2)
- Mantenimiento celular:
  - ✓ Medio de congelación.
  - ✓ Criocongelación.
  - ✓ Descongelación celular.

#### **Fase analítica**

Los protocolos y técnicas utilizados en la presente investigación fueron desarrollados a medida que fue avanzando la investigación realizando para ellos ensayos previos.

- Preparación de extracto acuoso de las hojas de *Annona cherimola* en diferentes concentraciones en el Laboratorio de cultivos celulares de la Universidad Nacional de Loja. (Anexo 3)
- Preparación de medios de cultivo RPMI. (Anexo 4)

- Preparación de controles positivos con el fármaco Fluorouracilo en diferentes concentraciones. (Anexo 5)
- Ensayos en el laboratorio de Cultivo de células de la Universidad Nacional de Loja.
- Tripsinización de células RKO. (Anexo 6)
- Colocación de células en los respectivos pocillos. (Anexo 7)
- Viabilidad celular: se utilizó el método de exclusión del colorante de azul de tripano, en donde primero se realizó una suspensión que permitió diferenciar las células vivas de las células muertas; primeramente se mezcló la suspensión de células y el colorante, posteriormente se colocó la mezcla en la cámara de Neubauer para observar en el microscopio. Se contó el número de células presentes en cada campo visual basado en la muerte celular. (Anexo 8)
- Determinación de la proliferación celular: se realizó mediante la visualización y el conteo de células confluentes en la cámara de Neubauer a las 6, 36 y 72 horas de incubación. (Anexo 9)

#### **CONTROL POSITIVO:**

- Cultivo de células RKO más fármaco utilizado en la actualidad (Fluorouracilo) en medio RPMI en pH ácido.

#### **CONTROL NEGATIVO:**

- Cultivo de células RKO sin extracto en medio RPMI en pH ácido.

#### **Fase post-analítica**

- Cálculos para la determinación de proliferación celular basado en la confluencia. (Anexo 10)
- Cálculos de muerte celular (Anexo 11)

- Para el análisis estadístico se utilizó el programa SAS con las siguientes pruebas (Anexo 12):
  - Adeva: Para evaluar la significancia entre las medias y se obtiene mediante la determinación del F calculado.
  - Duncan: Clasifica los tratamientos por grupo y de estos determina cuales tienen mayor significancia.
  - T-student: Utiliza los dos grupos más significativos determinando la media entre los dos.

## 6. RESULTADOS

TABLA 1

**PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS RKO\* CON EL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE *Annona cherimola* EN MEDIO DE CULTIVO\*\* CON PH ÁCIDO\*\*\***

HORAS	6	36	72
CONCENTRADO DEL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE <i>Annona cherimola</i>	0%	70.2%	63.3%
DILUCIÓN 1:10 DEL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE <i>Annona cherimola</i>	0%	73.8%	67.1%
DILUCIÓN 1:50 DEL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE <i>Annona cherimola</i>	0%	82.5%	68.7%

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

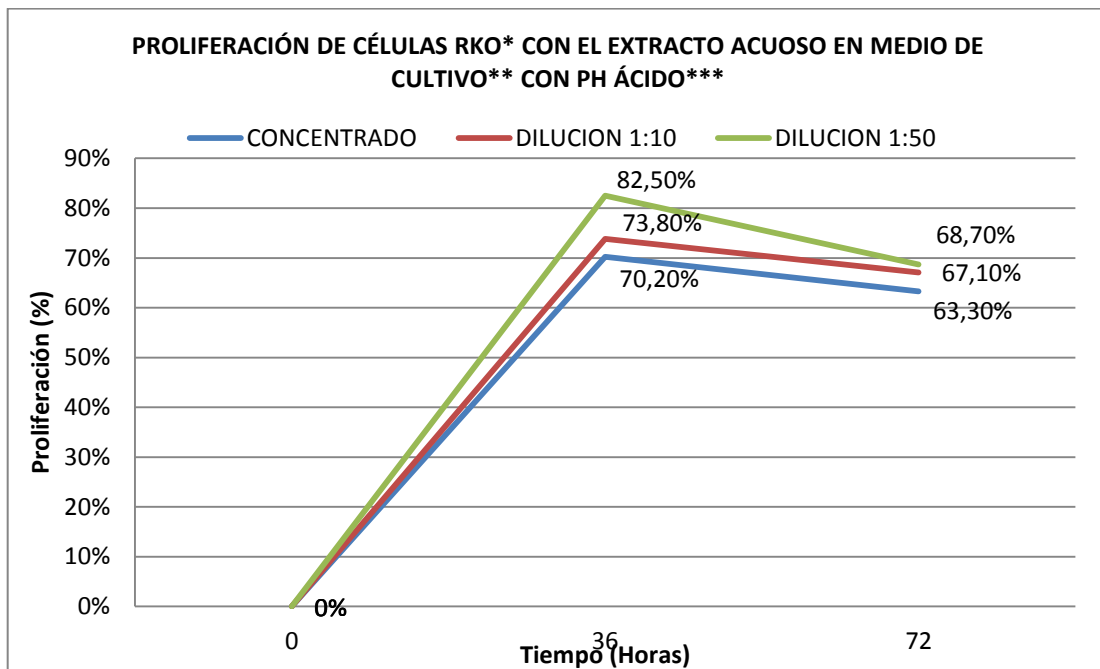
Autor: Cristian Xavier Luna Jiménez

\* Línea celular de cancer de colon humano

\* Medio RPMI 1640

\*\* pH: 6.5

GRÁFICO 1



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

Autor: Cristian Xavier Luna Jiménez

\* Línea celular de cancer de colon humano

\* Medio RPMI 1640

\*\* pH: 6.5

### INTERPRETACIÓN

En el gráfico 1, se determinó una confluencia de 0 % a las 6 horas, 70.2 % a las 36 horas y 63.3 % a las 72 horas en el cultivo del extracto concentrado; 0 % a las 6 horas, 73.8 % a las 36 horas y 67.1 % a las 72 horas de incubación en el cultivo diluido 1:10; 0 % a las 6 horas, 82.5 % a las 36 horas y 68.7 % a las 72 horas de incubación en el cultivo diluido 1:50. Demostrando que existe una proliferación mayor a las 36 horas y disminuyendo a las 72 horas.

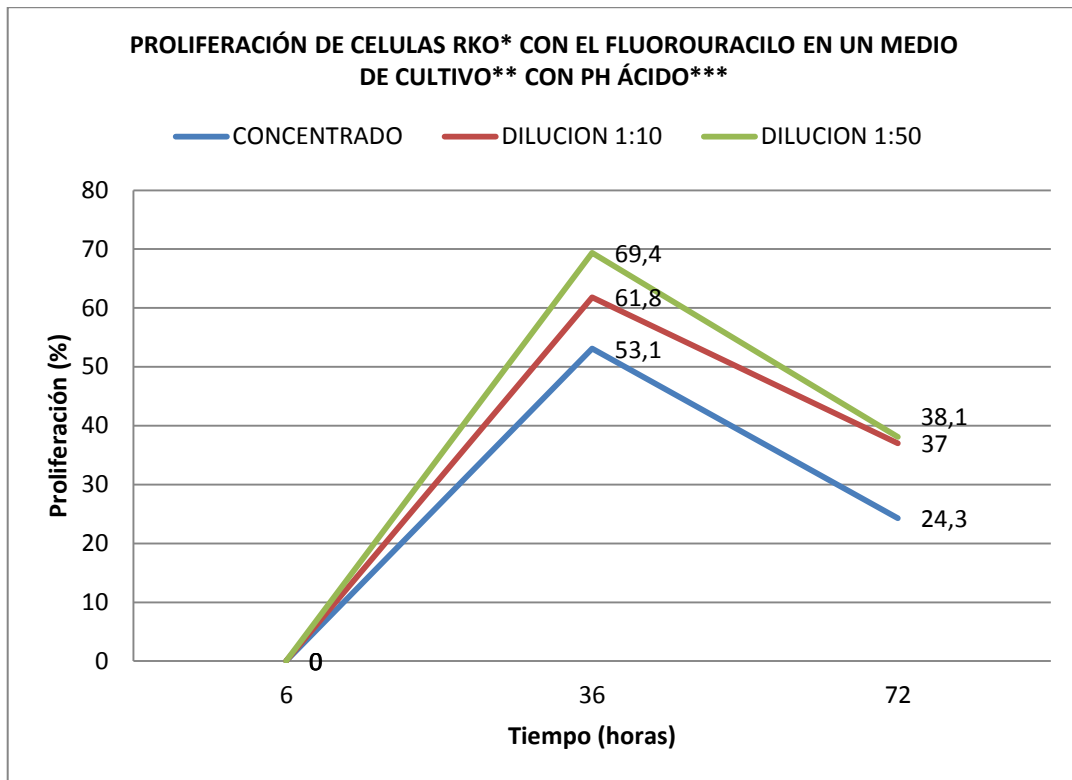
TABLA 2

**PROLIFERACIÓN DE CELULAS RKO\* CON EL FLUOROURACILO EN UN MEDIO DE CULTIVO\*\* CON PH ÁCIDO\*\*\***

HORAS	6	36	72
CONCENTRADO DEL FLUOROURACILO	0%	53.1%	24.3%
DILUCIÓN 1:10 DEL FLUOROURACILO	0%	61.8%	37%
DILUCIÓN 1:50 DEL FLUOROURACILO	0%	69.4%	38.1%

**Fuente:** Ensayo realizado en el Laboratorio de cultivo de células de la Universidad Nacional de Loja.  
**Autor:** Cristian Xavier Luna Jiménez  
 \* Línea celular de cancer de colon humano  
 \* Medio RPMI 1640  
 \*\* pH: 6.5

GRÁFICO 2



**Fuente:** Ensayo realizado en el Laboratorio de cultivo de células de la Universidad Nacional de Loja.  
**Autor:** Cristian Xavier Luna Jiménez  
 \* Línea celular de cancer de colon humano  
 \* Medio RPMI 1640  
 \*\* pH: 6.5

**INTERPRETACIÓN**

En el gráfico 2, se observa una proliferación de 0 % a las 6 horas de incubación, 53.1 % a las 36 horas y 24.3 % a las 72 horas de incubación en el cultivo con el Fluorouracilo concentrado; en el cultivo con la dilución 1:10 la proliferación fue de 0%, 61.8 % y de 37 % a las 6,36 y 72 horas de incubación; de la misma forma en el cultivo con la dilución 1:50 fue de 0 %, 69.4 % y 38.1 % de proliferación a 6, 36 y 72 horas de incubación.



TABLA 3

**CÉLULAS RKO\* CON EL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE *Annona cherimola* EN UN MEDIO DE CULTIVO\*\* CON PH ÁCIDO\*\*\***

HORAS	CONCENTRADO DEL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE <i>Annona cherimola</i>	DILUCIÓN 1:10 DEL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE <i>Annona cherimola</i>	DILUCIÓN 1:50 DEL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE <i>Annona cherimola</i>	CONTROL NEGATIVO
6	12.0%	12.0%	9.7%	16.4%
12	16.2%	14.8%	12.7%	17.1%
24	25.8%	23.6%	20.7%	16.8%
36	26.4%	23.8%	22.2%	25.1%
48	31.2%	33.8%	26.9%	25.7%
60	36.5%	33.8%	32.9%	31.2%
72	37.6%	34.7%	34.4%	32.9%

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

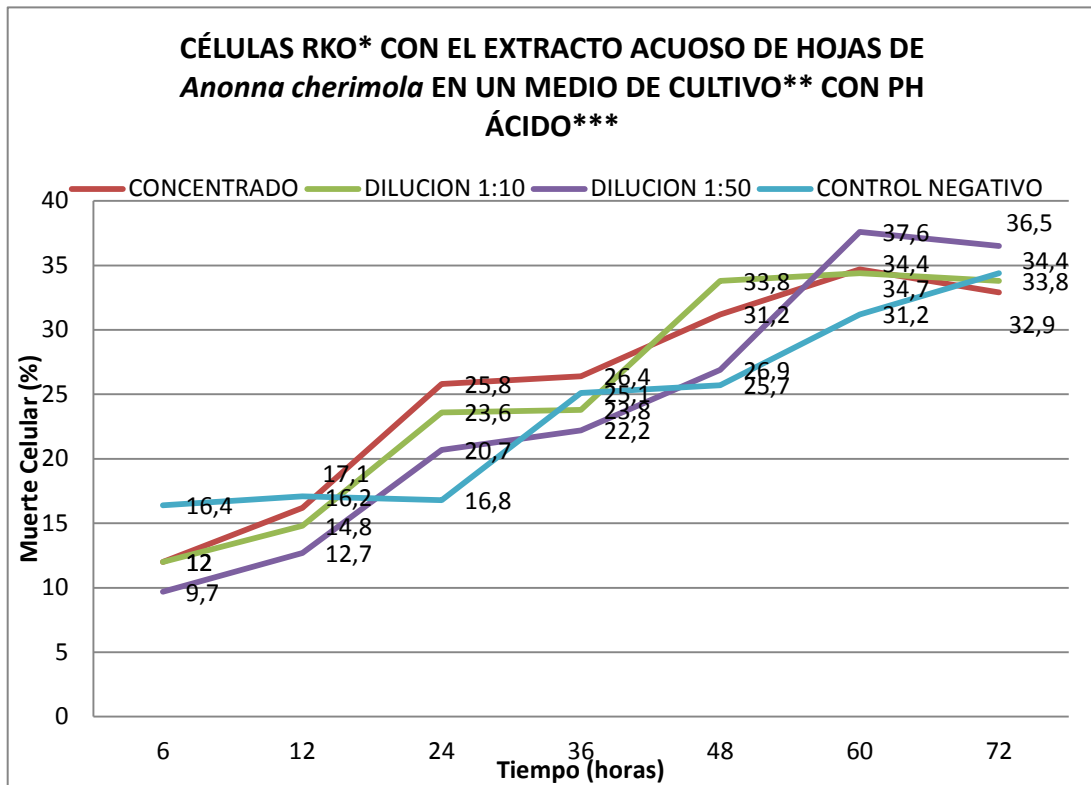
Autor: Cristian Xavier Luna Jiménez

\* Línea celular de cáncer de colon humano

\*\* Medio RPMI 1640

\*\*\* pH: 6.5

GRÁFICO 3



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

Autor: Cristian Xavier Luna Jiménez

\* Línea celular de cáncer de colon humano

\*\* Medio RPMI 1640

\*\*\* pH: 6.5

**INTERPRETACIÓN**

En el gráfico 3, podemos observar que el extracto concentrado produce una muerte celular de 32.9 %, en el extracto diluido 1:10 un 33.8 % y en la dilución 1:50 un 36.5 %, luego de 72 horas de incubación.

TABLA 4

CÉLULAS RKO\* CON EL FLUOROURACILO EN UN MEDIO DE CULTIVO\*\* CON PH ÁCIDO\*\*\*

HORAS	CONCENTRADO DEL FLUOROURACILO	DILUCIÓN 1:10 DEL FLUOROURACILO	DILUCIÓN 1:50 DEL FLUOROURACILO	CONTROL NEGATIVO
6	19.2%	20.6%	12.8%	16.4%
12	20.5%	23.4%	18.1%	17.1%
24	29.9%	30.4%	27.9%	16.8%
36	44.8%	37.9%	35.4%	25.1%
48	52.5%	46.6%	40.7%	25.7%
60	70.6%	59.9%	58.1%	31.2%
72	75.3%	62.5%	57.0%	34.4%

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

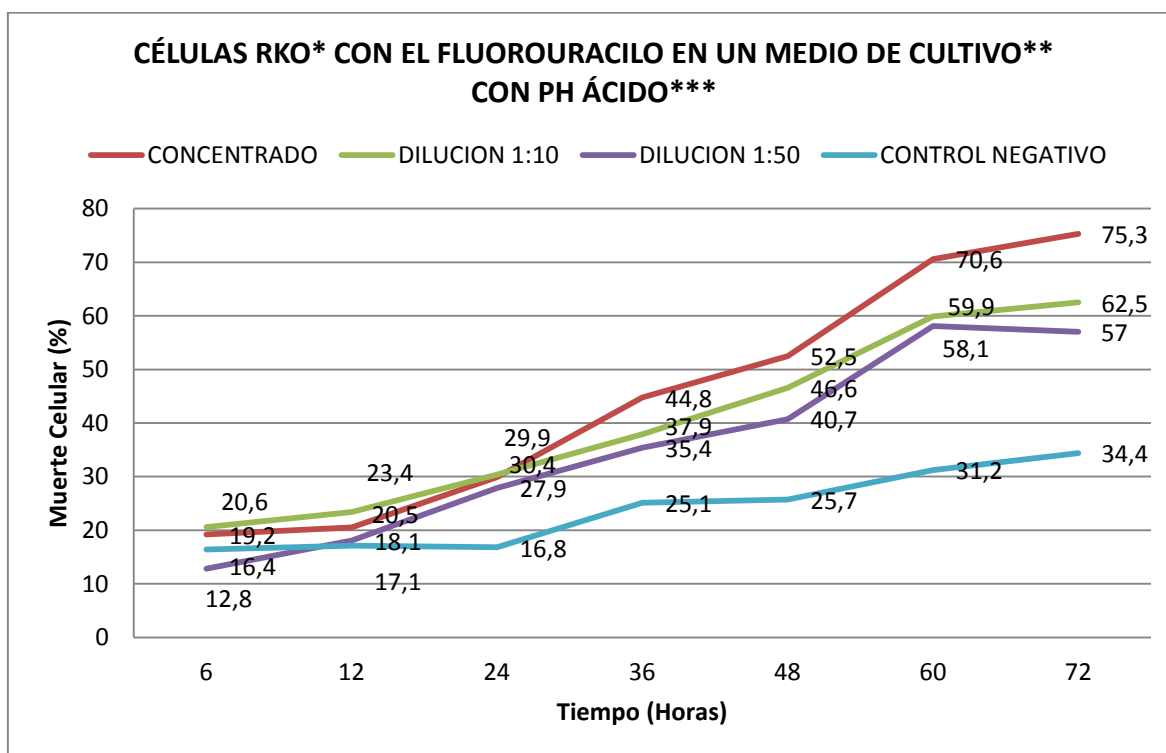
Autor: Cristian Xavier Luna Jiménez

\* Línea celular de cancer de colon humano

\* Medio RPMI 1640

\*\* pH: 6.5

GRÁFICO 4



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

Autor: Cristian Xavier Luna Jiménez

\* Línea celular de cancer de colon humano

\* Medio RPMI 1640

\*\* pH: 6.5

INTERPRETACIÓN

El gráfico 4, demuestra que el Fluorouracilo concentrado frente a células RKO produce una mortalidad de 75.3 %, seguido del cultivo diluido 1:10 con un 62.5 % después de 72 horas de incubación.

## 7. DISCUSIÓN

En el presente estudio se realizó la determinación del efecto citotóxico del extracto acuoso de las hojas de *Annona cherimola* frente a células de cáncer de colon humano, debido a que en la literatura se ha descrito que tiene propiedades antitumorales disminuyendo la proliferación de células cancerígenas y provocando la muerte de las mismas. Para lo cual mediante la aplicación de técnicas colorimétricas utilizando azul de tripano y realizando el conteo de células vivas y muertas, se obtuvo como resultados con el extracto acuoso de hojas de *Annona cherimola* una proliferación celular de 70.2% a las 36 horas y de 63.3% a las 72 horas de incubación en el cultivo concentrado, en la dilución 1:10 se obtuvo un 73.8% y 67.1% de proliferación celular a las 36 y 72 horas de incubación respectivamente. En cuanto a la viabilidad celular se obtuvo un 31.2% de muerte celular con el extracto acuoso de hojas de *Annona cherimola* a las 48 horas y a las 72 horas fue de 37.6%, en la dilución 1:10 se obtuvo una muerte celular de 33.8% y 34.7% a las 48 y 72 horas de incubación respectivamente.

De acuerdo a un estudio realizado en Lima – Perú en el año 2009 acerca del “Efecto citotóxico de las semillas de *Annona cherimola* en cultivos de cáncer de cérvix, mama y leucemia mieloide crónica” el cual se llevó a cabo mediante bioensayos de citotoxicidad con sulforodamina B (SRB) que es una técnica colorimétrica con la misma actividad que el azul de tripano, en la línea celular de Carcinoma epidermoide de cervix (ME-180); el porcentaje de crecimiento obtenido fue de – 13.0% hasta 60.1% en el lapso de 48 horas en donde el porcentaje negativo representa la citotoxicidad y el valor positivo el crecimiento o proliferación celular, lo cual se relaciona con nuestro estudio en donde se evidenció el mismo comportamiento, a mayor concentración menor fue la proliferación celular y mayor la muerte celular con la línea celular de cáncer de colon humano (RKO), con un valor de

31.2% en lo referente a muerte celular a las 48 horas y 70.2% respecto a proliferación celular en 36 horas de incubación (Quispe A. 2009).

En un estudio realizado en Lima – Perú en el año 2006 en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM) sobre el “Efecto citotóxico selectivo in vitro de muricin H (acetogenina de *Annona muricata*) en cultivos celulares de cáncer de pulmón” utilizando bioensayo de citotoxicidad con sulforodamina B (SRB), donde se realizó el conteo de células; a las 48 horas se obtuvo que el porcentaje de crecimiento de las células tumorales de cáncer de pulmón (H460) fue de 45% aproximadamente en la concentración más baja utilizando muricin H, por otro lado en la concentración más alta no existe crecimiento celular utilizando muricin H; frente a nuestro estudio, el cual se llevó a cabo mediante la observación y conteo de las células confluentes en el hemocitómetro a las 36 horas, dando como resultado una proliferación del 73.8% con el extracto acuoso de hojas de *Annona cherimola* en la dosis más baja; en cambio en la dosis alta se obtuvo un 70.2% con el extracto acuoso de hojas de *Annona cherimola*; en lo que se diferencia con el presente estudio al mostrar una menor proliferación celular utilizando un principio activo específico (Muricin H) de la *Annona muricata* mientras que en nuestro estudio existió una mayor proliferación celular utilizando el extracto acuoso de la *Annona cherimola* (Quispe A. 2006).

Según un estudio realizado en Lima – Perú en el año 2007 en la Universidad Mayor de San Marcos acerca del “Efecto citotóxico de *Annona muricata* (guanabana) en cultivo de líneas celulares de adenocarcinoma gástrico (C - 678) y pulmonar humano (H 460)”, el cual se llevó a cabo mediante el uso de líneas celulares tumorales, extracto etanólico de las hojas de *Annona muricata* y el fármaco Fluorouracilo; empleando el método de bioensayo de citotoxicidad con sulforodamina B y mediante la lectura de absorbancia la cual fue leída sobre un lector de placa automatizada en una longitud de onda de 550nm en el lapso de 48

horas con la mayor concentración, consiguiendo los siguientes resultados: un crecimiento celular de – 6.7% con extracto en la línea celular H 460 y – 19.8% en la línea celular C - 678 lo que difiere con el presente estudio en el cual se realizó el contaje de células confluentes en un hemocitómetro con la ayuda de un microscopio óptico a las 36 horas dando como resultados una proliferación de 70.2% con el extracto acuoso de las hojas de *Annona cherimola* (Quispe A. 2007).

Se han tomado estos tres estudios realizados en años anteriores debido a que no existe una gran cantidad de investigaciones actuales realizadas con la misma especie de planta.

## 8. CONCLUSIONES

- El extracto acuoso de la hoja de *Annona cherimola* no tiene un efecto significativo en la proliferación obteniendo un 70.2% a las 36 horas y un 63.3% a las 72 horas de incubación, el extracto concentrado tiene un mayor efecto en comparación con las concentraciones menores; mientras que el medicamento Fluorouracilo da como resultado un 53.1% a las 36 horas y un 24.3% de proliferación a las 72 horas. Se evidencia que el extracto no tiene un efecto importante en la proliferación debido a la naturaleza del mismo, ya que es acuoso, mientras que en la literatura se menciona que el extracto más efectivo frente a células tumorales es el etanólico.
- Se demostró que el extracto acuoso de la hoja de *Annona cherimola* tiene un efecto citotóxico frente a células tumorales de cáncer de colon humano llegando a un 37.6% de muerte celular luego de 72 horas, la muerte celular fue mayor en el concentrado y menor en las diluciones, sin embargo el medicamento Fluorouracilo también tuvo un efecto frente a células tumorales provocando una muerte celular de 75.3% a las 72 horas, esto evidencia que el extracto acuoso de las hojas de *Annona cherimola*, no tiene un efecto citotóxico significativo frente a las células de cáncer de colon humano, debido también a que la muerte celular producida por el extracto es similar o cercana a la muerte celular producida en el medio de cultivo con células tumorales (control negativo); de la misma forma la muerte celular puede estar siendo afectada por la disminución de los nutrientes a las 72 horas.

## 9. RECOMENDACIONES

- Se recomienda seguir con estudios de la *Annona cherimola* ya que podría significar el descubrimiento de un tratamiento alternativo contra el cáncer.
- Utilizar técnicas más sensibles y específicas como la citometría de flujo para determinar el efecto o la actividad citotóxica del principio activo de las hojas de *Annona cherimola*.
- Determinar las diferentes tipos de acetogeninas presentes en la *Annona cherimola* y utilizarlas por separado para determinar el elemento específico que cumple con la actividad antitumoral.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- American Cancer Society. (2014). *Cancer Colorrectal*. Enero 10, 2015, de American Cancer Society Sitio web: <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002290-pdf.pdf>
- Aponte M, Calderon M, Delgado A. (2010). Fitoquímicos. *Ministerio del poder popular para la salud*, Vol. 1, pp. 1-3.
- Ávalos A, Pérez-Urria E. (2010). Metabolismo secundario. *Reduca*, Vol. 1, pp. 119-122.
- Bandi P. (2011). *Datos y Estadísticas sobre el Cáncer entre los Hispanos/Latinos 2009-2011*. Enero 13, 2015, de Sociedad Americana del Cancer Sitio web: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-027826.pdf>
- Barahona V, (2013). *Evaluación de la Actividad Antioxidante y valor Nutracéutico de las Hojas y frutos de la Guanábana*. Febrero 9, 2015, de Escuela Superior Politécnica de Chimborazo Sitio web: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/2453/1/56T00321.pdf>
- Cárdenas C, Rodríguez A. (2011). *Unidad de Cultivos Celulares*. Enero 13, 2015, de Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación Sitio web: [http://www.scai.uma.es/servicios/ciencias\\_vida/cce/cce.html](http://www.scai.uma.es/servicios/ciencias_vida/cce/cce.html)
- Caserras B. (2010). *Cáncer colorrectal*. Enero 10, 2015, de Instituciones Elsevier Sitio web: <http://www.elsevierinstituciones.com/ficheros/booktemplate/9788475927220/files/Capitulo31.pdf>
- Castaño M, Zapata J. (2012). *Principios de virología*. Febrero 9, 2015, de Biogénesis Sitio web:



<http://editorialbiogenesis.udea.edu.co/index.php/biogenesis/article/viewFile/252/25>

2

- Diario Centinela. (2013). *Incidencia del cáncer de colon*. Enero 13, 2015, de Diario Centinela Sitio web: <http://diariocentinela.com.ec/incidencia-del-cancer-de-colon/>
- Eynard A. (2010). *Histología y embriología del ser humano. Bases celulares y moleculares*. Febrero 9, 2015: Editorial Médica Panamericana.
- Florez Y, Martinez E. (2010). *Obtención y evaluación de extractos bioactivos presentes en semillas de Annona muricata de la región cafetera*. Enero 13, 2015, de Universidad Tecnológica de Pereira Sitio web: <http://recursosbiblioteca.utp.edu.co/dspace/bitstream/11059/1828/1/63441F634.pdf>
- Goyenola G. (2010). Determinacion del pH. *Guia para la esterilizacion de las Valijas Viajeras*, Vol. 1, pp. 1-2.
- Institut Català d'Oncologia. (2010). *El cáncer colorrectal*. Enero 10,2015, de Institut Català d'Oncologia Sitio web: [http://www.europacolonespana.org/multimedia/Folleto%20Cancer%20colorrectal%20\(esp\).pdf](http://www.europacolonespana.org/multimedia/Folleto%20Cancer%20colorrectal%20(esp).pdf)
- Leon J. (2010). *Botánica de los cultivos tropicales*. Costa Rica: Editorial Agroamerica.
- Lodish, Berk. (2010). *Biología celular y molecular*. EE.UU: Editorial Medica Panamericana.
- López M. (2012). *Manual de plantas medicinales para guinea ecuatorial. Fundación de religiosos para la salud*, Vol. 1, pp. 7-8.
- Morales A. (2010). *Genetic diversity and geographic distribution of Annona cherimola in Southern Ecuador*. Febrero 8, 2015, de LYONIA Sitio web: [http://www.lyonia.org/articles/rbusmann/article\\_356/pdf/article.pdf](http://www.lyonia.org/articles/rbusmann/article_356/pdf/article.pdf)

- OMS. (2015). Medicina Tradicional. *Definiciones*. Julio 28, 2015, de OMS Sitio web: [http://www.who.int/topics/traditional\\_medicine/definitions/es/](http://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/)
- OMS. (2014). *La batalla mundial contra el cáncer no se ganará únicamente con tratamiento*. Enero 13, 2015, de OMS Sitio web: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/cancer-report-20140203/es/>
- Onsalus. (2015). *Extracto acuoso*. Febrero 9, 2015, de Onsalus Sitio web: <http://www.onsalus.com/diccionario/extracto-acuoso/11204>
- Pietrasanta L. (2011). *Práctica de laboratorio n° 4: Cultivo Celular*. Febrero 8, 2015, de Tópicos en Biofísica Molecular Sitio web: [http://users.df.uba.ar/catalina/TBM/TBM\\_lab04.pdf](http://users.df.uba.ar/catalina/TBM/TBM_lab04.pdf)
- Proliferación celular. (2010). *Proliferación celular*. Febrero 9, 2015, de Medicina molecular. Sitio web: <http://medmol.es/glosario/104/>
- Quispe, A. (2009). Efecto citotóxico de las semillas de *Annona cherimola* en cultivos de cáncer de cérvix, mama y leucemia mieloide crónica. *Acta méd. peruana [online]*, Vol. 26, pp. 156-161.
- Quispe, A. (2007). Efecto citotóxico de *Annona muricata* (guanabana) en cultivo de líneas celulares de adenocarcinoma gástrico y pulmonar. *CIMEL*, Vol. 12, pp. 19-22.
- Quispe, A. (2006). Efecto citotóxico selectivo in vitro de Muricin H (acetogenina de *Annona muricata*) en cultivos celulares de cáncer de pulmón. *Rev. Perú Med*, Vol. 23, pp. 265-269.
- Ruiz J. (2010). *Acetogeninas Annonaceas de Annona Squamosa procedente de Brasil*. Febrero 8, 2015, de Universidad Nacional de Tucumán Sitio web: <http://aqa.org.ar/pdf101/cd/Qca.Organica/3-086.pdf>

- Rodilla F. (2015). *Mecanismos de acción antitumoral*. Julio 29, 2015, de Servicio de Farmacia. Hospital General "Obispo Polanco" de Teruel Sitio web: [http://www.boloncol.com/index2.php?option=com\\_content&do\\_pdf=1&id=26.html](http://www.boloncol.com/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=26.html)
- Soto M. (2013). *Metabolitos secundarios y ruta de ácido shikímico*. Febrero 8, 2015, de Universidad Nacional de Trujillo Sitio web: <http://es.slideshare.net/maryluz/clase-de-metabolitos-secundarios-y-ruta-de-acido-shikimico-por-qf-maril-roxana-soto-vsquez>
- Segretin M. (2011). *Los cultivos celulares y sus aplicaciones I (cultivos de células animales)*. Enero 10, 2015, de ArgenBio Sitio web: <http://www.argenbio.org/ad/uploads/pdf/Cultivos%20celulares%20I%20Euge.pdf>
- Sociedad de Lucha contra el Cáncer, *Registro Hospitalaria 2014*, Solca Loja.
- Sociedad de Lucha contra el Cáncer, *Registro de Tumores Loja*. 2009, Solca Loja.
- Vanhove W. (2010). *Descriptores para Chirimoyo*. Malaga, España: Bioersivity International.
- Winawer S. (2010). *Tamizaje del cáncer colorrectal*. Enero 10, 2015, de International Digestive Cancer Alliance Sitio web: [http://www.worldgastroenterology.org/assets/downloads/es/pdf/guidelines/cancer\\_colorrectal\\_tamizaje\\_screening\\_y\\_vigilancia.pdf](http://www.worldgastroenterology.org/assets/downloads/es/pdf/guidelines/cancer_colorrectal_tamizaje_screening_y_vigilancia.pdf)

## 11. ANEXOS

**ANEXO 1.-** Oficio que permita ser parte del presente proyecto de Investigación.



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

Loja, 28 de mayo de 2015

Doctor.

Miguel Marín Gómez, Mg. Sc,

**DIRECTOR DEL LABORATORIO DE CULTIVO CELULAR**

A petición verbal de la interesada:

CERTIFICO:

Que el Sr. **Cristian Xavier Luna Jiménez**, estudiante del **VIII MÓDULO** de la Carrera de **LABORATORIO CLÍNICO**, con cédula de identidad 1104398563 fue aceptado como parte del grupo de estudiantes para que participe en la realización del proyecto "**Evaluar el efecto citotóxico de las hojas de *Annona cherimola* en líneas celulares cancerígenas**", el mismo que forma parte del trabajo final de investigación que debe realizar el estudiante previo a la obtención del título de Licenciado en Laboratorio Clínico.

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


Atentamente.

Dr. Miguel Marín Gómez Mg, Sc.

**DIRECTOR DEL PROYECTO**


## ANEXO 2.- Adquisición de la línea celular ATCC.

Multilizer PDF Translator Free version - translation is limited to ~ 3 pages per translation.



**ATCC**  
Hoja de producto  
**RKO (ATCC®CRL2577)™**

**Por favor lea esto primero**



Nivel de bioseguridad  
**1**

**Uso previsto**

Este producto está diseñado únicamente con fines de investigación, destinados a cualquier animal o humano terapéutico o uso diagnóstico.

**Medio de cultivo completo**

El medio de base de esta línea celular es ATCC formulated Medio esencial mínimo de Eagle, catálogo N° 30 2003, para preparar el medio de crecimiento completo, añadiendo las siguientes componentes al medio base: bovino fetal suero hasta una concentración final de 10%.

**Citación de cepa**

Si el uso de esta cultura los resultados en una publicación científica deben ser citados en ese manuscrito en el siguiente manera: RKO (ATCC®CRL2577)™

<http://www.ATCC.org>

<mailto:Tech@ATCC.org>

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

800-638-6597 o al 703-365-2700  
Fax: 703-365-2750  
Correo electrónico: [Tech@atcc.org](mailto:Tech@atcc.org)

**Descripción**

Organismo: Homo sapiens, humano  
Tejido: Colón  
Enfermedad: Cáncer  
Morfología: epiteliales  
Propiedades de crecimiento:  
Perfil de ADN:  
Amelogenina: X  
CSF1PO: 8, 10  
D13S317: 8, 11  
D16S539: 12, 13  
D5S818: 11, 13  
D7S820: 8, 10  
THO1: 6, 10  
TPOX: 11  
SVA: 15, 16, 17

**Batch Specific información**

Consulte el certificado de análisis de resultados de la prueba de batch specific.

**PRECAUCIÓN DE SEGURIDAD**

**Desembalaje y almacenamiento**

1. Revise todos los contenedores para la fuga o rotura.  
2. Retirar las células congeladas del hielo seco embalaje y coloque inmediatamente las células a una temperatura inferior a 130° C, preferiblemente en vapores de nitrógeno líquido, hasta que esté listo para su uso.

**Procedimiento de manipulación de las células**

Para asegurar el más alto nivel de viabilidad, descongelar el vial e iniciar la cultura tan pronto como sea posible tras la recepción. Si a la llegada, almacenamiento de la cultura congelada es necesario, deben guardarse en la fase de vapor de nitrógeno líquido y no a 70° C. Almacenamiento a 70° C dará lugar a la pérdida de viabilidad.

1. descongelar el frasco por agitación suave en un baño de agua de 37° C. Para reducir la posibilidad de contaminación la junta tórica y la tapa fuera del agua. Descongelación debe ser rápida (aproximadamente 2 minutos)
2. Refiere el frasco del baño tan pronto como el contenido es descongelado y descontaminación por sumergir o rociar con etanol al 70%. Todas las operaciones desde este punto deberán realizarse bajo condiciones asépticas estrictas.
3. transferir el contenido del vial a un tubo de centrifuga que contenía 9,0 mL medio de cultivo completo y vuelta a aproximadamente 125 x g durante 5 a 7 minutos.
4. Resuspender el sedimento celulares con medio completo recomendado (vea la información de lote específico para la cultura recomienda la relación de dilución) y dispensar en un 25 cm o un frasco de cultivo de 75 cm. Es importante evitar la excesiva alcalinidad del medio durante la recuperación de las células. Se sugiere antes de la incorporación de los contenidos del frasco, la nave de cultura que contiene el medio de cult colocado en la incubadora durante al menos 15 minutos para permitir que el medio llegar a su pH nominal.
5. Incubar el cultivo a 37° C en una incubadora adecuada. Un 5% de que co en atmósfera de aire se recomienda si usando el medio descrito en esta hoja de producto.

**Procedimiento manejo de frasco culturas**

El frasco fue sembrado con las células (ver información del lote específico), crecido y completamente lleno de ATCC para evitar la pérdida de las células durante el transporte.

1. una vez recibida, examine visualmente la cultura evidencia macroscópica de cualquier contaminación microbiana.



Hoja de producto

## RKO (ATCC®CRL2577)™

Por favor lea esto primero



### Uso previsto

Este producto está diseñado únicamente con fines de investigación, destinados a cualquier animal o humano terapéutico o uso diagnóstico.

### Medio de cultivo completo

El medio de base de esta línea celular es ATCC formulated Medio esencial mínimo de Eagle, catálogo N° 30 2003, para preparar el medio de crecimiento completo, añada las siguientes componentes al medio base: bovino fetal suero hasta una concentración final de 10%.

### Citación de cepa

Si el uso de esta cultura los resultados en una publicación científica deben ser citados en ese manuscrito en el siguiente manera: RKO (ATCC®CRL2577)™

<http://www.ATCC.org>

<mailto:Tech@ATCC.org>

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

800-438-6087 o al 703-365-2700  
Fax: 703-365-2750  
Correo electrónico: [Tech@atcc.org](mailto:Tech@atcc.org)

O póngase en contacto con su distribuidor local

RK01na\_2 de 3

- en la parte inferior del matraz: durante el envío de las culturas a veces se manejan aproximadamente y muchas de las células a menudo separan y ser suspendidos en el medio de cultivo (pero son todavía v
- Si todavía se unen las células, extraiga de forma aseptica todo pero 5 a 10 mL del medio de transporte medio de envío se puede guardar para su reutilización. Incube las células a 37°C en un 5% CO<sub>2</sub> en atmósfera de hasta que estén listos para ser subcultivado.
  - Si no se unen las células, asepticamente remueva todo el contenido del matraz y centrifugar a 125 x g durante 5 a 10 minutos. Refiére el medio de envío y guardar. Resuspender las células sediment mL de este medio y añadir al matraz de 25 cm. Incubar a 37°C un 5% de CO<sub>2</sub> en atmósfera de aire hasta las células están listos para ser subcultivado.



### Procedimiento de subcultivo

Volumenes utilizados en el presente Protocolo están para frasco de 75 cm; proporcionalmente reducir o aumentar la cantidad de medio para recipientes de cultivo de otros tamaños.

- Refiere y deseche el medio de cultivo.
- Enjuague la capa de células con 0,25% (w/v) Trypsin0.53% (w/v) EDTA solución para eliminar los restos del suero que contiene el inhibidor de la tripsina.
- Agregue 2.0 a 3.0 mL de solución de TrypsinEDTA al frasco y observar las células bajo un microscopio invertido hasta que capa de la célula se dispersa (generalmente dentro de 5 a 15 minutos).  
Nota: Para evitar la aglutinación no agitar las células golpeando o sacudiendo el frasco mientras se es células para separar. Las células que son difíciles de separar pueden colocarse a 37° C para facilitar la
- Añadir 6.0 a 8.0 mL de medio de cultivo completo y aspirar las células mediante pipeteo suave.
- Añadir alcuotas apropiadas de la suspensión de células a los buques nuevos de cultura.
- Incubar los cultivos a 37° C

### Cociente de la subcultura

Renovación media Cada 2 a 3 días.

Nota: Para obtener más información sobre disociación enzimática y subcultivos de líneas celulares consultar el Cultivo de células animales, un manual de técnica básica R. Ian Freshney, tercera edición, publicado por R. Liss, Nueva York, 1994



### Comentarios

RKO células contienen p53 de tipo salvaje pero carecen del receptor tiroideo humano endógeno del receptor r El nivel de proteína p53 es mayor en las células RKO (ATCC CRL2577) que en RKOEB las células (ATCC CRL2 La línea celular RKO es la línea celular parental (isogénicas) de RKOEB (ATCC CRL2578) y RKOAS451 (ATCC CRL2579).



### Referencias

Referencias y otra información relacionada con este producto están disponibles online en [www.atcc.org](http://www.atcc.org).



### Bioseguridad nivel: 1

Procedimientos de seguridad adecuados deben utilizarse siempre con este material. Seguridad en el laboral la publicación actual de la Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos los Estados Unidos Departamento de salud y servicios humanos centros para el Control de enfermedades y prevención y los institut para la salud.

### ATCC garantía

La viabilidad de los productos de la ATCC es una garantía de 30 días desde la fecha de envío y es válida sólo si el producto es almacenado y cultivada según la información contenida en esta hoja de información del producto. listas de la formulación de los medios de comunicación que se ha encontrado para ser eficaz para esta cepa. l también puede producir resultados satisfactorios, un cambio en los medios de comunicación o la ausencia de medios recomendados pueden afectar la recuperación, crecimiento y función de esta cepa. Si un medio altera se usa, ya no es válida la garantía de la ATCC para viabilidad.

### Descargos de responsabilidad

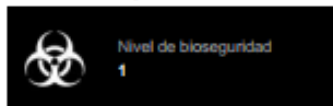
Este producto está diseñado para propósitos de investigación de laboratorio solamente. No está diseñado para Mientras que ATCC utiliza esfuerzos razonables para incluir precisa y actualizada información en esta hoja de ATCC no hace ninguna garantía o representación en cuanto a su exactitud. Citas de literatura científica y



Hoja de producto

**RKO (ATCC®CRL2577)™**

Por favor lea esto primero



Uso previsto

Este producto está diseñado únicamente con fines de investigación, <sup>1</sup> destinados a cualquier animal o humano terapéutico o uso diagnóstico.

Medio de cultivo completo

El medio de base de esta línea celular es ATCC formulated Medio esencial mínimo de Eagle, catálogo Nº 30 2003, para preparar el medio de crecimiento completo, añadir el siguientes componentes al medio base: bovino fetal suero hasta una concentración final de 10%.

Citación de cepa

Si el uso de esta cultura los resultados en una publicación científica, <sup>1</sup> deben ser citados en ese manuscrito en el siguiente manera: RKO (ATCC®CRL2577)™

<http://www.ATCC.org>

<mailto:Tech@ATCC.org>

American Type Culture Collection  
PO Box 1549  
Lee E.A.U.A. Manassas, VA 20158  
[www.ATCC.org](http://www.ATCC.org)

800-438-6597 o al 703-365-2700  
Fax: 703-365-2750  
Correo electrónico: [Tech@atcc.org](mailto:Tech@atcc.org)

O póngase en contacto con su distribuidor local

las patentes se proporcionan para propósitos informativos solamente. ATCC no garantiza que dicha información confirmada para ser exactos.

Este producto se envía con la condición de que usted es responsable de su almacenamiento seguro, manipular no es responsable por daños o lesiones derivados de recibo y/o uso de este producto. Mientras que el esfuerzo es hecho para asegurar la autenticidad y fiabilidad de las cepas en depósito, ATCC no es responsable por falta la identificación errónea o la tergiversación de las culturas.

Consulte el adjunto Material Transferido Acuerdo (MTA) para más detalles sobre el uso de este producto. El MTA también está disponible en nuestro sitio Web en [www.atcc.org](http://www.atcc.org)

Información adicional sobre esta cultura está disponible en el sitio web ATCC [www.atcc.org](http://www.atcc.org).

© 2013 ATCC. Todos los derechos reservados. ATCC es una marca registrada de la American Type Culture Collection. [06/06]

**ANEXO 3.-** Preparación de extracto acuoso de las hojas de *Annona cherimola* en diferentes concentraciones.

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

#### **EXTRACTO ACUOSO**

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

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

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



## ANEXO 4.- Preparación de medios de cultivo RPMI.

### MEDIO DE CULTIVO pH ÁCIDO

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

Una solución 1N se prepara de la siguiente manera:

- $V1 * N1 = V2 * N2$
- $V2 = (V1 * N1) / N2$   
$$\frac{50 * 1}{5} = 10 \text{ ml}$$

V1: Volumen inicial

N1: Concentración inicial

V2: Volumen final

N2: Concentración final

2. En un matraz se colocan 10 ml de HCL concentrado y se afora a 50 ml de H<sub>2</sub>O destilada y queda la solución de HCL al 1N.
3. En el medio de cultivo incompleto se coloca esta solución gota a gota hasta que el Peachímetro marque el valor necesario hasta que se haga ácido.

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

**ANEXO 5.-** Preparación de controles positivos con el fármaco Fluorouracilo.

**FLUOROURACILO**

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

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

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

## ANEXO 6.- Tripsinización de células RKO.

### **TRIPSINIZACION DE CÉLULAS A549 Y RKO**

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

## **ANEXO 7.- Colocación de células en los respectivos pocillos.**

### **LINEAS CELULARES (en el caso del extracto acuoso)**

- Una vez realizados los contajes de las líneas celulares en el caso del extracto acuoso no existe solvente para la disolución del extracto por lo tanto se necesitaron 10 500000 cel/pocillo resuspendidas en 500 ul de medio de cultivo
- Se coloca los 500 ul del medio con 500.000 células en cada uno y luego se añaden los extractos y medicamentos como controles positivos en diferentes concentraciones

Se procede a incubar las placas de cultivo en la incubadora de CO<sub>2</sub> al 5% y con humedad del 98%.

**ANEXO 8.- Viabilidad celular con la técnica de coloración de azul de tripano.**

**CONTAJE DE CÉLULAS CON AZUL DE TRIPANO (VIABILIDAD CELULAR)**

1. Se realiza el conteo de las células tanto muertas como vivas para evaluar así de esta manera la viabilidad y citotoxicidad celular.
2. En placas de cultivo de 96 pocillos se colocan 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.
3. Se deben extraer dichas células de manera mecánica frotando los pocillos donde se encuentran incubadas ya que estas células son adherentes y tienden a pegarse al fondo
4. A cada pocillo cargado con células colocar 20 ul de azul de tripano y cargar en la cámara de Neubauer para su conteo.
5. Se deben contar los cuatro cuadrantes externos de las esquinas y el valor final se lo multiplica por 10, por 1000 y por 2.

Se realiza el mismo procedimiento a las seis horas de su incubación, 12, 24, 48, 60 y 72 horas.

## **ANEXO 9.- Proliferación celular basándose en la confluencia de las células.**

### **PROLIFERACIÓN CELULAR**

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

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

**ANEXO 10.-** Cálculos para la determinación de proliferación celular basado en la confluencia.

6 HORAS

RKO + EXTRACTO 1	RKO + EXTRACTO 2	RKO + EXTRACTO 3	RKO + FLUOROURACILO 1	RKO + FLUOROURACILO 2	RKO + FLUOROURACILO 3
V 66 = 100 % C 0 = 0 %	V 90 = 100 % C 0 = 0 %	V 71 = 100 % C 0 = 0 %	V 66 = 100 % C 0 = 0 %	V 72 = 100 % C 0 = 0 %	V 88 = 100 % C 0 = 0 %
LH + EXTRACTO 1	LH + EXTRACTO 2	LH + EXTRACTO 3	RKO + MC		
<hr/>			V 81 = 100 % C 0 = 0 %		

36 HORAS

RKO + EXTRACTO 1	RKO + EXTRACTO 2	RKO + EXTRACTO 3	RKO + FLUOROURACILO 1	RKO + FLUOROURACILO 2	RKO + FLUOROURACILO 3
V 84 = 100% C 70 = 83,3%	V = 60 = 100% C = 50 = 83,4%	V 52 = 100% C 38 = 74,3%	V 52 = 100% C 33 = 63,5%	V 44 = 100% C 27 = 61,2%	V 45 = 100% C 28 = 62,5%
LH + EXTRACTO 1	LH + EXTRACTO 2	LH + EXTRACTO 3	RKO + MC		
—————			V 59 = 100% C 45 = 76,7%		



72 HORAS

RKO + EXTRACTO 1	RKO + EXTRACTO 2	RKO + EXTRACTO 3	RKO + FLUOROURACILO 1	RKO + FLUOROURACILO 2	RKO + FLUOROURACILO 3
V 22 = 100% C 8. = 36,7%	V 28 = 100% C 13 = 48,3%	V 32 = 100% C 18 = 56,2%	V 16 = 100% C 5 = 31,4%	V 25 = 100% C 9 = 36,3%	V 26 = 100% C 12 = 46,5%
LH + EXTRACTO 1	LH + EXTRACTO 2	LH + EXTRACTO 3	RKO + MC		
<hr/>			V 42 = 100%	C 28 = 66,7%	

### ANEXO 11.- Cálculos de muerte celular.

ENSAYO DE: EXTRACCIÓN ACUOSA DE ANDINA FRESCA A SOL RKO EN YACUO P. A. 1000

FECHA: 21-05-15 HORA: 17h00 RESPONSABLE: Carolina P. Díaz

6 HORAS  $\frac{0}{100}\%$   $\frac{0}{100}\%$   $\frac{0}{100}\%$   $\frac{0}{100}\%$   $\frac{0}{100}\%$   $\frac{0}{100}\%$  *Cañahua*

RKO+EXTRACTO 1	RKO+EXTRACTO 2	RKO+EXTRACTO 3	RKO+FLUORACILO 1	RKO+FLUORACILO 2	RKO+FLUORACILO 3
V 52 = 88,7% H 8 = 13,3%	V 54 = 87,1% H 8 = 12,9%	V 70 = 87,5% H 10 = 12,5%	V 60 = 75% H 20 = 25%	V 48 = 76,2% H 15 = 23,8%	V 58 = 85,3% H 10 = 14,7%
V 65 = 90,3% H 7 = 9,7%	V 67 = 89,8% H 7 = 10,2%	V 71 = 91,1% H 7 = 8,9%	V 72 = 88,9% H 15 = 16,1%	V 52 = 78,8% H 4 = 21,2%	V 57 = 86,4% H 2 = 13,6%
V 60 = 87% H 9 = 13%	V 68 = 87,2% H 10 = 12,8%	V 60 = 82,4% H 5 = 7,6%	V 70 = 83,4% H 14 = 16,6%	V 67 = 83,2% H 13 = 16,8%	V 53 = 70% H 2 = 10%
$\frac{12}{100}\%$	$\frac{11,9}{100}\%$	$\frac{9,6}{100}\%$	$\frac{19,2}{100}\%$	$\frac{20,6}{100}\%$	$\frac{12,7}{100}\%$
LH+EXTRACTO 1	LH+EXTRACTO 2	LH+EXTRACTO 3	RKO+25 ul SOLVENTE	RKO CON MC	
V 65 = 98,5% H 1 = 1,5%	V 63 = 98,6% H 1 = 1,4%	V 73 = 98,8% H 1 = 1,2%	~	V 44 = 78,6% H 12 = 21,4%	
V 67 = 98,6% H 1 = 1,4%	V 71 = 100% H 0 = 0%	V 82 = 100% H 0 = 0%		V 52 = 83,9% H 10 = 16,1%	
V 70 = 100% H 0 = 0%	V 72 = 100% H 0 = 0%	V 80 = 98,8% H 1 = 1,2%		V 60 = 88,3% H 2 = 11,7%	
$\frac{0,9}{100}\%$	$\frac{0,4}{100}\%$	$\frac{0,8}{100}\%$		$\frac{16,4}{100}\%$	

cel / 14' 100'000 cel / 11' 100'000 Línea = 4' 520'000 0- Azul Conf

12 HORAS

RKO+EXTRACTO 1	RKO+EXTRACTO 2	RKO+EXTRACTO 3	RKO+FLUORACILO 1	RKO+FLUORACILO 2	RKO+FLUORACILO 3
V 50 = 83,4% H 10 = 16,6%	V 58 = 87,9% H 8 = 12,1%	V 72 = 86,7% H 12 = 13,3%	V 85 = 81% H 20 = 19%	V 50 = 80,7% H 12 = 19,3%	V 54 = 80,6% H 13 = 19,4%
V 65 = 83,4% H 13 = 16,6%	V 52 = 83,9% H 10 = 16,1%	V 50 = 86,3% H 2 = 13,7%	V 55 = 76,4% H 13 = 24,6%	V 50 = 73,6% H 18 = 26,4%	V 54 = 84,3% H 12 = 15,7%
V 66 = 84,7% H 12 = 15,3%	V 62 = 83,8% H 12 = 16,2%	V 56 = 88,9% H 7 = 11,1%	V 68 = 82% H 15 = 18%	V 61 = 75,4% H 20 = 24,6%	V 52 = 80,9% H 13 = 19,1%
$\frac{16,1}{100}\%$	$\frac{14,8}{100}\%$	$\frac{12,7}{100}\%$	$\frac{20,5}{100}\%$	$\frac{23,4}{100}\%$	$\frac{18}{100}\%$
LH+EXTRACTO 1	LH+EXTRACTO 2	LH+EXTRACTO 3	RKO+25 ul SOLVENTE	RKO CON MC	
V 61 = 96,9% H 2 = 3,1%	V 76 = 98,8% H 1 = 1,2%	V 65 = 95,6% H 3 = 4,4%	~	V 45 = 81,9% H 10 = 18,1%	
V 68 = 97,2% H 2 = 2,8%	V 78 = 97,5% H 2 = 2,5%	V 72 = 100% H 0 = 0%		V 54 = 81,9% H 12 = 18,1%	
V 71 = 98,7% H 1 = 1,3%	V 78 = 100% H 0 = 0%	V 80 = 100% H 0 = 0%		V 61 = 84,8% H 11 = 15,2%	
$\frac{2,4}{100}\%$	$\frac{1,2}{100}\%$	$\frac{1,4}{100}\%$		$\frac{17,7}{100}\%$	

24 HORAS

RKO + EXTRACTO 1	RKO + EXTRACTO 2	RKO + EXTRACTO 3	RKO + FLUORACILO 1	RKO + FLUORACILO 2	RKO + FLUORACILO 3
✓ 41 = 73,3% M 15 = 26,7%	✓ 63 = 79,8% M 16 = 20,2%	✓ 55 = 82,1% M 12 = 17,9%	✓ 65 = 72,3% M 25 = 27,7%	✓ 52 = 75,4% M 17 = 24,6%	✓ 45 = 73,8% M 16 = 26,2%
✓ 53 = 76,9% M 16 = 23,1%	✓ 53 = 74,7% M 18 = 25,3%	✓ 52 = 80% M 13 = 20%	✓ 58 = 67,5% M 28 = 32,5%	✓ 42 = 73,7% M 15 = 26,3%	✓ 50 = 71,5% M 20 = 28,5%
✓ 33 = 72,3% M 15 = 27,7% <u>25,8%</u>	✓ 47 = 74,7% M 16 = 25,3% <u>23,6%</u>	✓ 50 = 75,8% M 16 = 24,2% <u>20,7%</u>	✓ 55 = 70,6% M 23 = 29,4% <u>29,8%</u>	✓ 40 = 59,8% M 27 = 40,2% <u>30,3%</u>	✓ 45 = 71,1% M 20 = 28,9% <u>27,8%</u>
LH + EXTRACTO 1	LH + EXTRACTO 2	LH + EXTRACTO 3	RKO + 25 ul SOLVENTE	RKO CON MC	
✓ 48 = 96% M 2 = 4%	✓ 62 = 95,4% M 3 = 4,6%	✓ 63 = 95,9% M 3 = 4,1%	~	✓ 46 = 85,2% M 8 = 14,8%	
✓ 52 = 94,6% M 3 = 5,4%	✓ 74 = 97,4% M 2 = 2,6%	✓ 64 = 97% M 2 = 3%		✓ 43 = 77,7% M 11 = 20,3%	
✓ 49 = 92,5% M 4 = 7,5% <u>5,6%</u>	✓ 68 = 95,8% M 3 = 4,2% <u>3,8%</u>	✓ 59 = 96,8% M 2 = 3,2% <u>3,4%</u>		✓ 55 = 84,7% M 10 = 15,3% <u>16,8%</u>	

36 HORAS

RKO + EXTRACTO 1	RKO + EXTRACTO 2	RKO + EXTRACTO 3	RKO + FLUORACILO 1	RKO + FLUORACILO 2	RKO + FLUORACILO 3
✓ 40 = 70,2% M 17 = 29,8%	✓ 47 = 82,5% M 10 = 17,5%	✓ 45 = 73,8% M 16 = 26,2%	✓ 35 = 53,1% M 31 = 46,9%	✓ 42 = 69,8% M 26 = 30,2%	✓ 43 = 69,4% M 19 = 30,6%
✓ 42 = 73,7% M 15 = 26,3%	✓ 48 = 80% M 12 = 20%	✓ 47 = 82,5% M 10 = 17,5%	✓ 32 = 53,4% M 28 = 46,6%	✓ 41 = 64,1% M 23 = 35,9%	✓ 37 = 62,8% M 22 = 37,2%
✓ 50 = 77% M 15 = 23% <u>26,3%</u>	✓ 50 = 80,7% M 12 = 19,3% <u>18,9%</u>	✓ 40 = 77% M 12 = 23% <u>22,2%</u>	✓ 27 = 51% M 26 = 49% <u>47,5%</u>	✓ 35 = 60,4% M 23 = 39,6% <u>37,9%</u>	✓ 37 = 61,7% M 23 = 38,3% <u>35,3%</u>
LH + EXTRACTO 1	LH + EXTRACTO 2	LH + EXTRACTO 3	RKO + 25 ul SOLVENTE	RKO CON MC	
✓ 53 = 96,8% M 2 = 3,2%	✓ 76 = 96,6% M 3 = 3,4%	✓ 70 = 95,9% M 3 = 4,1%	~	✓ 43 = 72,9% M 16 = 27,1%	
✓ 65 = 95,6% M 3 = 4,4%	✓ 53 = 92,2% M 5 = 7,8%	✓ 72 = 98,7% M 1 = 1,3%		✓ 40 = 72,8% M 15 = 27,2%	
✓ 58 = 96,7% M 2 = 3,3% <u>13,6%</u>	✓ 81 = 95,3% M 4 = 4,7% <u>15,3%</u>	✓ 65 = 94,3% M 4 = 5,7% <u>8,7%</u>		✓ 45 = 79% M 19 = 21% <u>15,1%</u>	

110 kcal

48 HORAS

RKO+EXTRACTO 1	RKO+EXTRACTO 2	RKO+EXTRACTO 3	RKO+FLUORACILO 1	RKO+FLUORACILO 2	RKO+FLUORACILO 3
V 41 = 69,4% M 18 = 31,6%	V 44 = 65,7% M 23 = 34,3%	V 40 = 69% M 18 = 31%	V 42 = 59,2% M 29 = 40,8%	V 26 = 45,7% M 31 = 54,3%	V 26 = 53,1% M 23 = 46,9%
V 40 = 69% M 18 = 31%	V 42 = 68,9% M 19 = 31,1%	V 64 = 75,3% M 21 = 24,7%	V 25 = 43,2% M 33 = 56,8%	V 30 = 57,7% M 22 = 42,3%	V 30 = 60% M 20 = 40%
V 40 = 69% M 18 = 31% <u>31,2%</u>	V 39 = 64% M 22 = 36% <u>33,8%</u>	V 54 = 75% M 18 = 25% <u>26,9%</u>	V 20 = 40% M 30 = 60% <u>52,5%</u>	V 33 = 56,9% M 25 = 43,1% <u>46,5%</u>	V 33 = 64,8% M 18 = 35,2% <u>40,7%</u>
LH+EXTRACTO 1	LH+EXTRACTO 2	LH+EXTRACTO 3	RKO+25 ul SOLVENTE	RKO CON MC	
V 50 = 91% M 5 = 9%	V 42 = 89,4% M 5 = 10,6%	V 71 = 92,3% M 6 = 7,7%	}	V 54 = 76,1% M 17 = 23,9%	
V 67 = 91,8% M 6 = 8,2%	V 76 = 93,9% M 5 = 6,1%	V 57 = 93,5% M 4 = 6,5%		V 45 = 73,8% M 16 = 26,2%	
V 49 = 86% M 8 = 14% <u>10,4%</u>	V 58 = 89,3% M 7 = 10,7% <u>9,1%</u>	V 56 = 93,4% M 4 = 6,6% <u>6,9%</u>		V 54 = 73% M 20 = 27% <u>25,7%</u>	

60 HORAS

RKO+EXTRACTO 1	RKO+EXTRACTO 2	RKO+EXTRACTO 3	RKO+FLUORACILO 1	RKO+FLUORACILO 2	RKO+FLUORACILO 3
V 62 = 71,3% M 25 = 28,7%	V 45 = 63,4% M 26 = 36,6%	V 40 = 61,6% M 25 = 38,4%	V 20 = 30,4% M 46 = 69,6%	V 20 = 33,4% M 40 = 66,6%	V 25 = 41% M 36 = 59%
V 53 = 63,9% M 30 = 36,1%	V 40 = 66,7% M 20 = 33,3%	V 32 = 65,6% M 20 = 34,4%	V 18 = 31,6% M 39 = 68,4%	V 23 = 41,9% M 32 = 58,1%	V 20 = 35,1% M 37 = 64,9%
V 40 = 60,7% M 26 = 39,3% <u>34,7%</u>	V 50 = 66,7% M 25 = 33,3% <u>34,4%</u>	V 25 = 45,5% M 30 = 54,5% <u>42,4%</u>	V 16 = 26,3% M 45 = 73,7% <u>70,5%</u>	V 27 = 45% M 33 = 55% <u>59,9%</u>	V 25 = 49,1% M 26 = 50,9% <u>58,2%</u>
LH+EXTRACTO 1	LH+EXTRACTO 2	LH+EXTRACTO 3	RKO+25 ul SOLVENTE	RKO CON MC	
V 50 = 84,8% M 9 = 15,2%	V 50 = 87,8% M 7 = 12,2%	V 54 = 91,6% M 5 = 8,4%	}	V 42 = 68,9% M 19 = 31,1%	
V 49 = 83,1% M 10 = 16,9% <u>15%</u>	V 56 = 75,7% M 8 = 24,3%	V 61 = 91,1% M 6 = 8,9%		V 40 = 66,7% M 20 = 33,3%	
V 53 = 86,9% M 8 = 13,1% <u>15%</u>	V 61 = 89,8% M 7 = 10,2% <u>15,5%</u>	V 70 = 93,4% M 5 = 6,6% <u>7,9%</u>		V 41 = 70,7% M 17 = 29,3% <u>31,2%</u>	

72 HORAS

RKO +EXTRACTO 1	RKO +EXTRACTO 2	RKO +EXTRACTO 3	RKO +FLUORACILO 1	RKO + FLUORACILO 2	RKO + FLUORACILO 3
$\checkmark$ 58 = 68,3% $\Pi$ 27 = 31,7% $\overline{132,9\%}$	$\checkmark$ 55 = 67,1% $\Pi$ 27 = 32,9%	$\checkmark$ 42 = 63,7% $\Pi$ 24 = 36,3% $\overline{135,4\%}$	$\checkmark$ 16 = 24,3% $\Pi$ 50 = 75,7% $\overline{145,39\%}$	$\checkmark$ 24 = 37% $\Pi$ 41 = 63%	$\checkmark$ 22 = 38,6% $\Pi$ 35 = 61,4% $\overline{157\%}$
$\checkmark$ 62 = 67,4% $\Pi$ 30 = 32,6%	$\checkmark$ 56 = 66,7% $\Pi$ 28 = 33,3%	$\checkmark$ 42 = 64,7% $\Pi$ 23 = 35,3%	$\checkmark$ 18 = 27,3% $\Pi$ 48 = 72,7%	$\checkmark$ 24 = 38,1% $\Pi$ 39 = 61,9%	$\checkmark$ 25 = 45,5% $\Pi$ 30 = 54,5%
$\checkmark$ 38 = 65,6% $\Pi$ 20 = 34,4% $\overline{132,9\%}$	$\checkmark$ 42 = 64,9% $\Pi$ 26 = 35,1% $\overline{133,7\%}$	$\checkmark$ 45 = 65,3% $\Pi$ 24 = 34,7% $\overline{135,4\%}$	$\checkmark$ 15 = 22,4% $\Pi$ 52 = 77,6% $\overline{145,39\%}$	$\checkmark$ 25 = 37,4% $\Pi$ 42 = 62,6% $\overline{162,5\%}$	$\checkmark$ 26 = 44,9% $\Pi$ 32 = 55,1% $\overline{157\%}$
LH + EXTRACTO 1	LH + EXTRACTO 2	LH + EXTRACTO 3	RKO+25 ul SOLVENTE	RKO CON MC	
$\checkmark$ 54 = 83,1% $\Pi$ 11 = 16,9%	$\checkmark$ 52 = 86,7% $\Pi$ 8 = 13,3%	$\checkmark$ 66 = 93% $\Pi$ 5 = 7%		$\checkmark$ 42 = 67,8% $\Pi$ 20 = 32,2%	
$\checkmark$ 52 = 81,3% $\Pi$ 12 = 18,7%	$\checkmark$ 54 = 85,8% $\Pi$ 9 = 14,2%	$\checkmark$ 71 = 91,1% $\Pi$ 7 = 8,9%		$\checkmark$ 32 = 64,5% $\Pi$ 21 = 35,5%	
$\checkmark$ 56 = 84,9% $\Pi$ 10 = 15,1% $\overline{116,9\%}$	$\checkmark$ 66 = 86,9% $\Pi$ 10 = 13,1% $\overline{113,5\%}$	$\checkmark$ 76 = 92,7% $\Pi$ 6 = 7,3% $\overline{117,7\%}$		$\checkmark$ 40 = 64,6% $\Pi$ 22 = 35,4% $\overline{134,3\%}$	

NO HAY

**ANEXO 12.- Análisis estadístico.**

**ACUOSO PH NEUTRO CELULAR RKO**

	RKO + EXTRACTO 1						
HORAS	6	12	24	36	48	60	72
REP 1	8.3	9	11.7	16.8	39.4	60.9	63.3
REP 2	12.3	6.7	18	15.5	40.6	61.6	61.5
REP 3	14.2	12.8	15.7	20	56.5	60.8	58
PROMEDIO	11.6	9.5	15.1	17.4	45.5	61.1	60.9
TOTAL	40.8	40.5	69.4	88.3	184.5	243.3	254.8

	RKO + EXTRACTO 2						
HORAS	6	12	24	36	48	60	72
REP 1	8.1	12.5	11.7	16.6	28.8	53.1	51.7
REP 2	7.2	14.6	13.8	17	47	51.8	60.3
REP 3	7.2	14.9	20.8	17.3	37	58.7	53
PROMEDIO	7.5	14.0	15.4	17.0	37.6	54.5	55.0
TOTAL	28.5	54	70.3	86.9	160.8	223.6	237

	RKO + EXTRACTO 3						
HORAS	6	12	24	36	48	60	72
REP 1	14.4	11.7	11.9	25.7	45.4	50.8	43.8
REP 2	11.6	10.7	20.5	22.7	44.4	45.7	47.6
REP 3	5.5	13.6	10	23.8	43.7	42.3	39.6
PROMEDIO	10.5	12.0	14.1	24.1	44.5	46.3	43.7

TOTAL	37.5	48	66.4	108.2	181.5	198.8	203
-------	------	----	------	-------	-------	-------	-----

	TESTIGO						
HORAS	6	12	24	36	48	60	72
REP 1	12.6	9.2	7.6	23.3	30.7	31.1	33.3
REP 2	7.9	9	25.7	21.3	34.6	28.2	32.1
REP 3	8.4	6.6	16.6	26.2	28	26.8	36.3
PROMEDIO	9.6	8.3	16.6	23.6	31.1	28.7	33.9
TOTAL	34.9	36.8	73.9	106.8	141.3	146.1	173.7

horas	extr1	extr2	extr3	Test
6	11.6	7.5	10.5	9.6
12	9.5	14.0	12.0	8.3
24	15.1	15.4	14.1	16.6
36	17.4	17.0	24.1	23.6
48	45.5	37.6	44.5	31.1
60	61.1	54.5	46.3	28.7
72	60.9	55.0	43.7	33.9

### ADEVA

VARIABLE DEPENDIENTE: valor

Factores de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F calculado	FT

Tratamiento	27	24989.16476	925.52462	53.83	1,72
Repetición	2	40.00500	20.00250	1.16	0.3201
Error experimental	54	928.46167	17.19373		
Error Total	83	25957.63143			
R cuadrado	Coeficiente de variación		Root MSE	Valor medio	
0.964232	15.09398		4.146533	27.47143	

De acuerdo al R- cuadrado se tiene un valor de 0.96, esto demuestra que la variabilidad de los datos con respecto a la media es muy cercana.

El coeficiente de variación en la presente investigación o estudio es de 15.09 nos permite determinar que su dispersión con respecto a la media es cercana.

#### DUNCAN

Alpha 0.05

Duncan	Media	N	tratamiento
A	61.100	3	rko_ext1_60
A	60.933	3	rko_ext1_72
A	55.000	3	rko_ext2_72
A	54.533	3	rko_ext2_60
B	46.267	3	rko_ext3_60
B	45.500	3	rko_ext1_48
C B	44.500	3	rko_ext3_48
C B	43.667	3	rko_ext3_72
C D	37.600	3	rko_ext2_48



E	D	33.900	3	test_72	
E	D	F	31.100	3	test_48
E	G	F	28.700	3	test_60
H	G	F	24.067	3	rko_ext3_36
H	G	23.600	3	test_36	
H	I	17.433	3	rko_ext1_36	
H	I	16.967	3	rko_ext2_36	
H	I	16.633	3	test_24	
J	I	15.433	3	rko_ext2_24	
J	I	15.133	3	rko_ext1_24	
J	I	14.133	3	rko_ext3_24	
J	I	14.000	3	rko_ext2_12	
J	I	12.000	3	rko_ext3_12	
J	I	11.600	3	rko_ext1_6	
J	I	10.500	3	rko_ext3_6	
J	I	9.633	3	test_6	
J	I	9.500	3	rko_ext1_12	
J	8.267	3	test_12		
J	7.500	3	rko_ext2_6		

Segun la prueba de Duncan tenemos que el tratamiento rko\_ext1\_60; rko\_ext1\_72; rko\_ext2\_72; rko\_ext2\_60 no tienen diferencias significativas entre ellos pero si existe diferencia significativa con el tratamiento rko\_ext3\_60; rko\_ext1\_48; rko\_ext3\_48; rko\_ext3\_72.

Nota: los tratamientos que tienen la misma letra no tienen diferencia significativa pero si existe diferencia significativa con los tratamientos que tienen otra letra.

## T STUDENT

VARIABLE ANALISIS: diferente

Valor medio	TC	Tf
2.8714286	1.70	2,16

Con el fin de realizar comparaciones entre grupos de tratamientos se utilizó la prueba de T-student, según la prueba se observa que el valor es de 1.70 lo que demuestra que hay una diferencia significativa entre grupos.

## ANEXO 13.- Fotografías

### FASE PREANALÍTICA

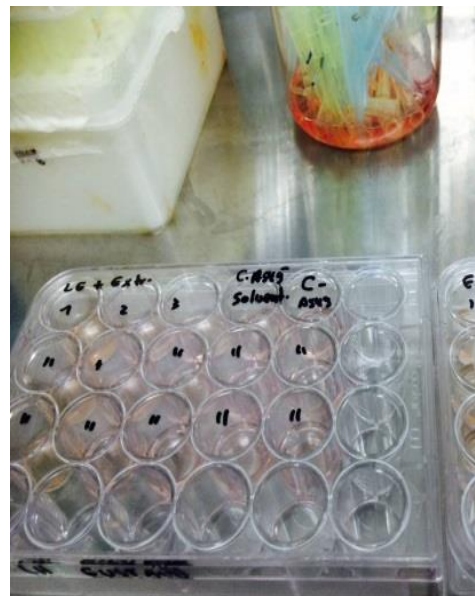


Cultivos y subcultivos para mantenimiento de la línea RKO

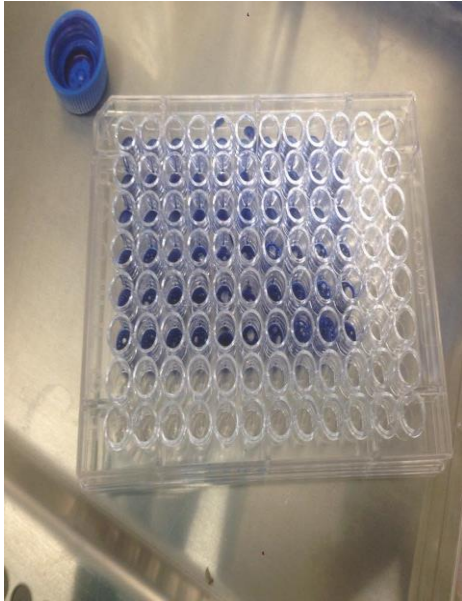
### FASE ANALÍTICA



Células confluentes RKO



Cultivo de células RKO con extracto y medicamento



Pocillos con azul de tripano



Preparación para contaje de células



Contaje de células

## 12. ÍNDICE GENERAL

PORTADA.....	i
CERTIFICACIÓN.....	ii
AUTORÍA.....	iii
CARTA DE CERTIFICACIÓN DE TESIS.....	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTO.....	vi
1. TÍTULO.....	1
2. RESUMEN.....	2
SUMMARY.....	3
3. INTRODUCCIÓN.....	4
4. REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
4.1. Medicina tradicional.....	6
4.2. Plantas medicinales.....	6
4.2.1. Importancia de las plantas medicinales.....	6
4.2.2. Fitoquímicos.....	7
4.2.3. Principio activo.....	7
4.3. Conceptualización de <i>Annona cherimola</i> .....	8
4.3.1. Taxonomía y morfología.....	8
4.3.2. Origen.....	8
4.3.3. Usos y beneficios.....	9
4.3.4. Composición química de las hojas de <i>Annona cherimola</i> .....	10
4.3.4.1. Metabolitos.....	11

4.3.4.1.1. Metabolitos secundarios.....	11
4.3.4.1.1.1. Terpenos.....	12
4.3.4.1.1.1.1. Acetogeninas.....	13
4.4. Definición de extractos.....	14
4.4.1. Definición de extracto Acuoso.....	14
4.4.2. Método de obtención de extracto Acuoso.....	14
4.4.2.1. Procedimiento.....	14
4.5. Definición de cultivo Celular .....	15
4.5.1. Tipos de cultivo celular.....	16
4.5.1.1. Cultivos primarios.....	16
4.5.1.2. Cultivos secundarios.....	16
4.5.1.3. Líneas celulares.....	17
4.5.2. Tipos de crecimiento celular.....	17
4.5.2.1. Células adherentes o cultivos fijos.....	17
4.5.2.2. Células no adherentes o cultivos en suspensión.....	17
4.5.3. Factores Básicos para la supervivencia celular.....	17
4.6. Viabilidad celular.....	18
4.7. Proliferación celular.....	18
4.8. ¿Qué es el pH y su importancia?.....	19
4.9. Terapia farmacológica para el cáncer.....	20
4.9.1. Fármacos antimetabolitos.....	20
4.9.1.1. Análogos de las bases pirimidínicas.....	20
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
6. RESULTADOS.....	25
7. DISCUSIÓN.....	29

8. CONCLUSIONES.....	32
9. RECOMENDACIONES.....	33
10. BIBLIOGRAFÍA.....	34
11. ANEXOS.....	38
11.1.    ANEXO 1.- Oficio que permita ser parte del presente proyecto de Investigación. ....	38
11.2.    ANEXO 2.- Obtención de líneas celulares ATCC.....	39
11.3.    ANEXO 3.- Preparación de extracto acuoso de las hojas de <i>Annona                     cherimola</i> .....	42
11.4.    ANEXO 4.- Preparación de medios de cultivo RPMI.....	43
11.5.    ANEXO 5.- Preparación de controles positivos con el fármaco Fluorouracilo en diferentes concentraciones.....	44
11.6.    ANEXO 6.- Tripsinización de células RKO.....	45
11.7.    ANEXO 7.- Colocación de células en los respectivos pocillos.....	46
11.8.    ANEXO 8.- Viabilidad celular con la técnica de coloración de azul de tripano.....	47
11.9.    ANEXO 9.- Proliferación celular basándose en la confluencia de las células.....	48
11.10.    ANEXO 10.- Cálculos para la determinación de proliferación celular basado en la confluencia.....	49
11.11.    ANEXO 11.- Cálculos de muerte celular.....	52
11.12.    ANEXO 12.- Análisis estadístico.....	56
11.13.    ANEXO 13.- Fotografías.....	61
12. ÍNDICE GENERAL.....	63