

# UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA

## FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS

### ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUIMICA



### “DETERMINACION DEL EFECTO CITOTOXICO DEL EXTRACTO DE HOJAS DE *Annona muricata* L. (Guanábana) EN CULTIVO DE LINEAS CELULARES DE CANCER DE PROSTATA (PC-3) Y CANCER DE PANCREAS (ASPC-1)”

Tesis presentado por el Bachiller:  
**CONDORI BARRENECHEA, BRENDA  
DEL CARMEN**

Para optar el Título Profesional de:  
**QUIMICO FARMACEUTICO**

Asesor:  
**JOSE VILLANUEVA SALAS, PhD**

**AREQUIPA – PERÚ**

**2017**

**DEDICADO A:**

Con todo mi amor y agradecimiento a Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de este camino; dándome la fortaleza para afrontar los diversos retos que se me presentaron.

A mis padres Yudy y Luis los cuales me alentaron siempre a cumplir mis sueños con responsabilidad y respeto; quienes con su amor y esfuerzo me permitieron culminar esta etapa de mi vida y siguen alentando en mí la superación personal y profesional.

A mi hermana Fiorella que estuvo ahí a mi lado a lo largo de este camino, que me alentó y no dejó que nunca me rindiera.

A Seo y Georgia porque siempre me impulsaron a dar lo mejor de mí.

## AGRADECIMIENTOS

De manera especial, agradecer al PhD José Villanueva Salas, por el tiempo, la dedicación y el apoyo brindado a este trabajo de investigación, y por estar conmigo a lo largo de mi carrera profesional. A mis jurados por el tiempo y dedicación brindada.

Gracias al Dr. Alejandro Pino Figueroa por la confianza depositada para desarrollar este proyecto, así como la oportunidad brindada y sugerencias brindadas; al MCPHS-UNIVERSITY por brindar las facilidades para el desarrollo de esta investigación. Mi agradecimiento a Ahavene y Leticia por el apoyo, orientación y atención a mis consultas sobre la investigación.

Gracias a las personas y amigos que estuvieron conmigo dándome su apoyo moral y humano, sin los cuales no hubiera sido posible afrontar los momentos difíciles de este proyecto y esta carrera profesional.

## INDICE

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	3
INTRODUCCION.....	5
HIPOTESIS .....	7
OBJETIVOS.....	8
CAPITULO I .....	9
MARCO TEORICO .....	9
1. <i>Annona muricata L.</i> .....	9
1.1. INTRODUCCION.....	9
1.2. CLASIFICACION TAXONOMICA.....	9
1.3. DESCRIPCION BOTANICA.....	10
1.4. ASPECTOS QUIMICOS.....	10
1.5. ASPECTOS FARMACOLOGICOS.....	11
2. ACETOGENINAS (ACG).....	12
2.1. CONCEPTO.....	12
2.2. DISTRIBUCION Y LOCALIZACION.....	13
2.3. ESTRUCTURA QUIMICA.....	13
2.4. BIOSINTESIS.....	14
2.5. CLASIFICACION.....	14
2.6. PROPIEDADES BIOLOGICAS.....	15
3. PROSTATA.....	16
3.1. FUNCION .....	17
4. PANCREAS.....	17
4.1. FUNCION.....	18
5. CANCER.....	18
5.1. TIPOS Y FASES DEL CANCER.....	18
5.2. FACTORES QUE INFLUYEN EN EL DESARROLLO DEL CANCER 19	
5.3. DIAGNOSTICO.....	20
5.4. TRATAMIENTO.....	20
5.5. CANCER DE PROSTATA.....	21
5.6. CANCER DE PANCREAS.....	22
6. MUERTE CELULAR.....	23
6.1. APOPTOSIS.....	24

7.	CULTIVO CELULAR.....	26
7.1.	TIPOS DE CULTIVOS CELULARES.....	27
8.	LINEAS CELULARES DE ESTUDIO.....	28
8.1.	LINEA CELULAR ASPC-1.....	28
8.2.	LINEA CELULAR PC-3.....	28
9.	ENSAYOS EN CULTIVOS CELULARES.....	28
9.1.	ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR.....	28
9.2.	CASPASA.....	29
9.3.	LACTATO DESHIDROGENASA.....	33
	CAPITULO II.....	36
	MATERIALES Y METODOS.....	36
1.	LUGAR DE LA INVESTIGACION.....	36
2.	TIPO DE INVESTIGACION.....	36
3.	MATERIALES.....	36
3.1.	UNIDADES DE ESTUDIO.....	36
4.	MATERIAL DE LABORATORIO.....	38
4.1.	MATERIAL DE VIDRIO.....	38
4.2.	EQUIPOS.....	38
4.3.	REACTIVOS.....	39
4.4.	OTROS.....	40
5.	METODOS.....	40
5.1.	TRATAMIENTO DE LA DROGA.....	40
5.2.	OBTENCION DEL EXTRACTO.....	40
5.3.	PREPARACION DE EXTRACTOS.....	43
5.4.	PREPACION DE DMSO 1% (CONTROL NEGATIVO).....	46
5.5.	PREPARACION DE SOLUCIONES STOCK DE LOS EXTRACTOS	46
5.6.	PREPARACION DE LAS DILUCIONES A DIFERENTES CONCENTRACIONES A PARTIR DE LA SOLUCION STOCK.....	48
5.7.	PREPARACION DE MEDIOS.....	50
5.8.	PASAGE CELULAR.....	51
5.9.	EXCLUSION CELULAR.....	53
5.10.	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	55
5.11.	METODO PARA LA DETERMINACION DEL EFECTO CITOTOXICO.....	59

5.10. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	55
<b>CAPITULO III.....</b>	<b>66</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSION.....</b>	<b>66</b>
1. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA Y OBTENCION DEL EXTRACTO.....	66
2. CONCENTRACION DE EXTRACTOS.....	67
3. PREPARACION DE SOLUCIONES STOCK Y DILUCIONES DE EXTRACTO.....	69
4. CULTIVO CELULAR.....	70
5. EXCLUSION CELULAR Y PORCENTAJE DE CELULAS VIABLES EN SUSPENSION CELULAR.....	73
6. DETERMINACION DE VIABILIDAD CELULAR FRENTE AL TRATAMIENTO CON LOS EXTRACTOS OBTENIDOS.....	74
6.1. DETERMINACION DEL MEJOR EXTRACTO.....	75
6.2. DETERMINACION DE CONCENTRACION Y TIEMPO DE TRATAMIENTO OPTIMO.....	79
7. ANALISIS DE LA ACTIVACION DE CASPASAS.....	89
8. ANALISIS DE LDH.....	96
<b>CAPITULO IV.....</b>	<b>100</b>
<b>CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS.....</b>	<b>100</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>100</b>
SUGERENCIAS.....	102
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>103</b>

## RESUMEN

El cáncer es una de las causas de muerte más importante a nivel mundial, dentro de ellas el cáncer de próstata y el cáncer de páncreas cuya principal diferencia es que el primero es de tipo localizado y desarrollo lento y el segundo es de tipo metastásico y desarrollo rápido; en ambos tipos se ha observado un incremento en la resistencia a las quimioterapias lo cual motiva la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento.

Desde tiempos remotos el uso de plantas ha demostrado efectividad frente a ciertas enfermedades, en la actualidad muchos estudios previos han sugerido que la *Annona muricata* L. (Guanábana) posee una actividad citotóxica frente a células cancerígenas, esto genera gran interés en el desarrollo de posibles alternativas de tratamiento para el cáncer.

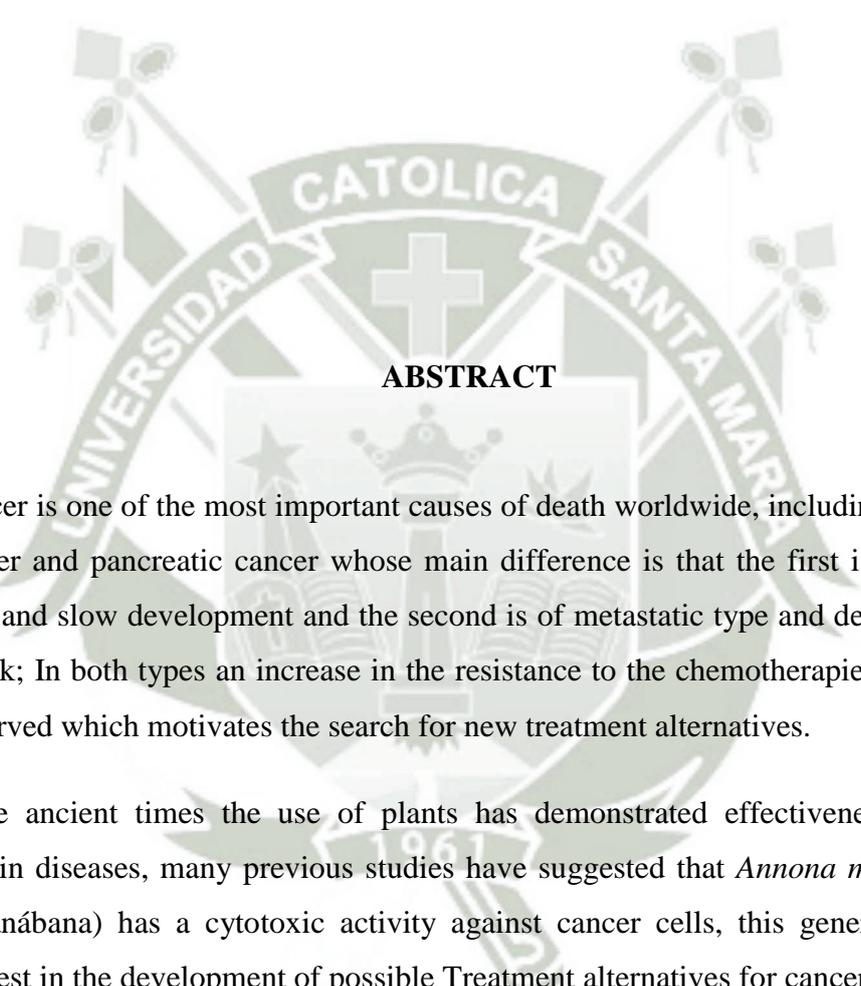
Dado que es un tratamiento de origen vegetal se debe determinar el solvente adecuado para extraer la mayor cantidad de sus componentes que le confieren sus propiedades, determinar la concentración y tiempo de exposición óptimo al extracto a utilizar para producir el efecto deseado. La reducción de la viabilidad celular es apoyada por la estadística de significancia, el cual indico una diferencia significativa en la viabilidad entre el control y los grupos de tratamiento ( $p < 0.05$ ).

La presente investigación se desarrolló teniendo como objetivo principal la evaluación del efecto citotóxico del extracto de hojas de *Annona muricata L.* (Guanábana) sobre las líneas celulares de cáncer de páncreas (ASPC-1) y cáncer de próstata (PC-3). Para lograr dicho fin se utilizó hojas de Guanábana las cuales fueron previamente recolectadas en Costa Rica y secadas en sombra; estas fueron molidas para su utilización; luego se procedió a realizar una extracción por maceración utilizando como solvente metanol 90%. Posteriormente se realizaron re-extracciones del primer extracto utilizando 3 solventes adicionales (diclorometano, acetato de etilo, n-butanol), obteniéndose finalmente 5 extractos diferentes: metanol 90% (extracto crudo), diclorometano, acetato de etilo, n-butanol, acuoso (residual); y se procedió a evaluar el rendimiento obtenido de cada re-extracto.

Los extractos fueron empleados para evaluar la viabilidad de las líneas celulares ASPC-1 y PC-3 tras ser expuestas a los 5 extractos obtenidos; por 24 y 48 horas de exposición al tratamiento en las siguientes concentraciones 1µg/mL, 3µg/mL, 10µg/mL, 30µg/mL y 100µg/mL. Para poder determinar los efectos de los extractos de hojas de *Annona muricata L.* sobre la viabilidad celular, se utilizó el ensayo de proliferación celular MTS.

También se evaluó si el extracto de hojas de *Annona muricata L.* puede ser el causante del proceso de activación de las caspasas, lo cual como consecuencia promueve una sucesión de eventos intracelulares que finalmente produce la destrucción controlada de los componentes celulares. El kit de ensayo CaspaseGlo®-3/7 luminescence fue utilizado para determinar y cuantificar el grado y/o nivel de destrucción celular. Paralelamente se midió el nivel de Lactato Deshidrogenasa (LDH) liberada; dado que es una enzima altamente estable la cual es útil para determinar el daño celular a nivel de la membrana.

**PALABRAS CLAVE:** Cáncer, Guanábana, Células



## ABSTRACT

Cancer is one of the most important causes of death worldwide, including prostate cancer and pancreatic cancer whose main difference is that the first is localized type and slow development and the second is of metastatic type and development Quick; In both types an increase in the resistance to the chemotherapies has been observed which motivates the search for new treatment alternatives.

Since ancient times the use of plants has demonstrated effectiveness against certain diseases, many previous studies have suggested that *Annona muricata L.* (Guanábana) has a cytotoxic activity against cancer cells, this generates great interest in the development of possible Treatment alternatives for cancer.

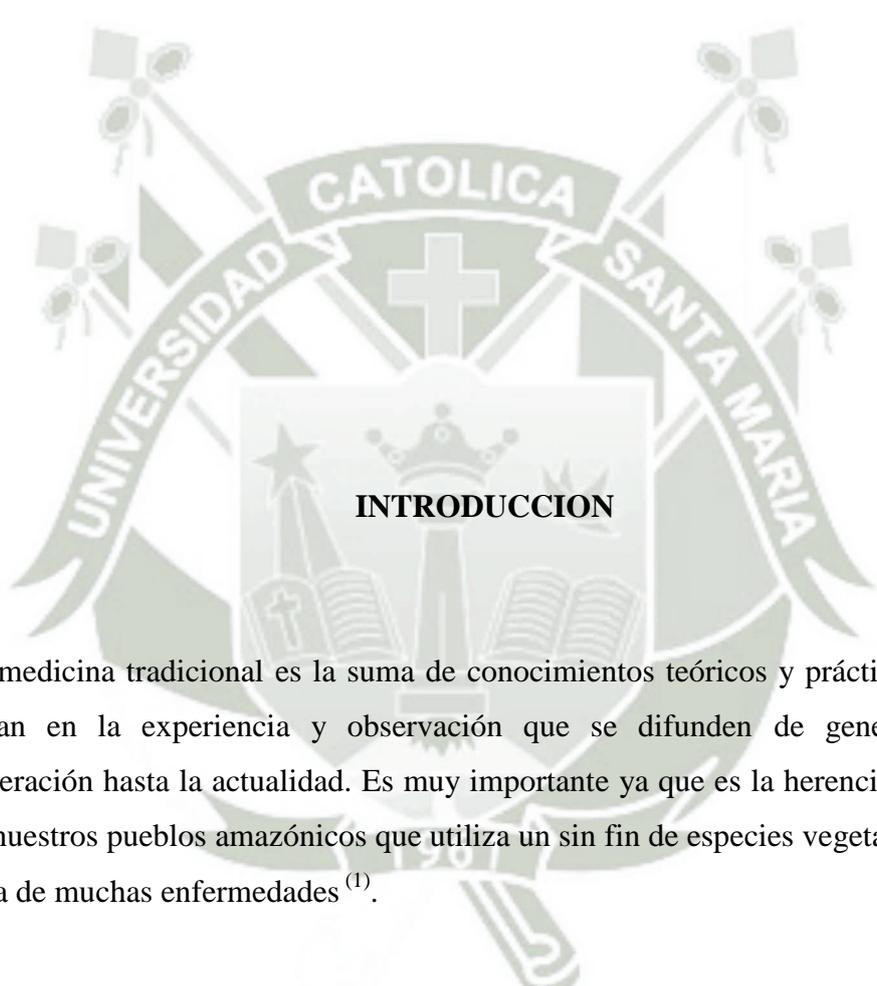
Since it is a treatment of plant origin, it is necessary to determine the adequate solvent to extract the greatest amount of its components that confer its properties, to determine the concentration and time of optimal exposure to the extract to be used to produce the desired effect. The reduction of cell viability is supported by the statistic of significance, which indicated a significant difference in viability between control and treatment groups ( $p < 0.05$ ).

The present research was developed with the main objective of evaluating the cytotoxic effect of *Annona muricata L.* (Guanabana) leaf extract on pancreatic cancer cell lines (ASPC-1) and prostate cancer (PC-3). To achieve this aim was used Guanábana leaves which were previously collected in Costa Rica and dried in shade; These were ground for use; Then extraction was carried out by maceration using 90% methanol as the solvent. Subsequently, extractions of the first extract were performed using 3 additional solvents (dichloromethane, ethyl acetate, n-butanol), finally obtaining 5 different extracts: 90% methanol (crude extract), dichloromethane, ethyl acetate, n-butanol, aqueous (residual); And the yield obtained from each re-extract was evaluated.

The extracts were used to evaluate the viability of ASPC-1 and PC-3 cell lines after being exposed to the 5 extracts obtained; For 24 and 48 hours of exposure to the treatment at the following concentrations: 1 $\mu$ g / mL, 3 $\mu$ g / mL, 10 $\mu$ g / mL, 30 $\mu$ g / mL and 100 $\mu$ g / mL. In order to determine the effects of *Annona muricata L.* leaf extracts on cell viability, the MTS cell proliferation assay was used.

It was also evaluated whether the extract of leaves of *Annona muricata L.* can be the cause of the process of activation of the caspases, which consequently promotes a succession of intracellular events that finally produces the controlled destruction of cellular components. The CaspaseGlo®-3/7 luminescence test kit was used to determine and quantify the degree and / or level of cell destruction. In parallel, the level of lactate dehydrogenase (LDH) released was measured; Since it is a highly stable enzyme which is useful for determining cell damage at the membrane level.

**KEY WORDS:** Cancer, Soursop, Cells



## INTRODUCCION

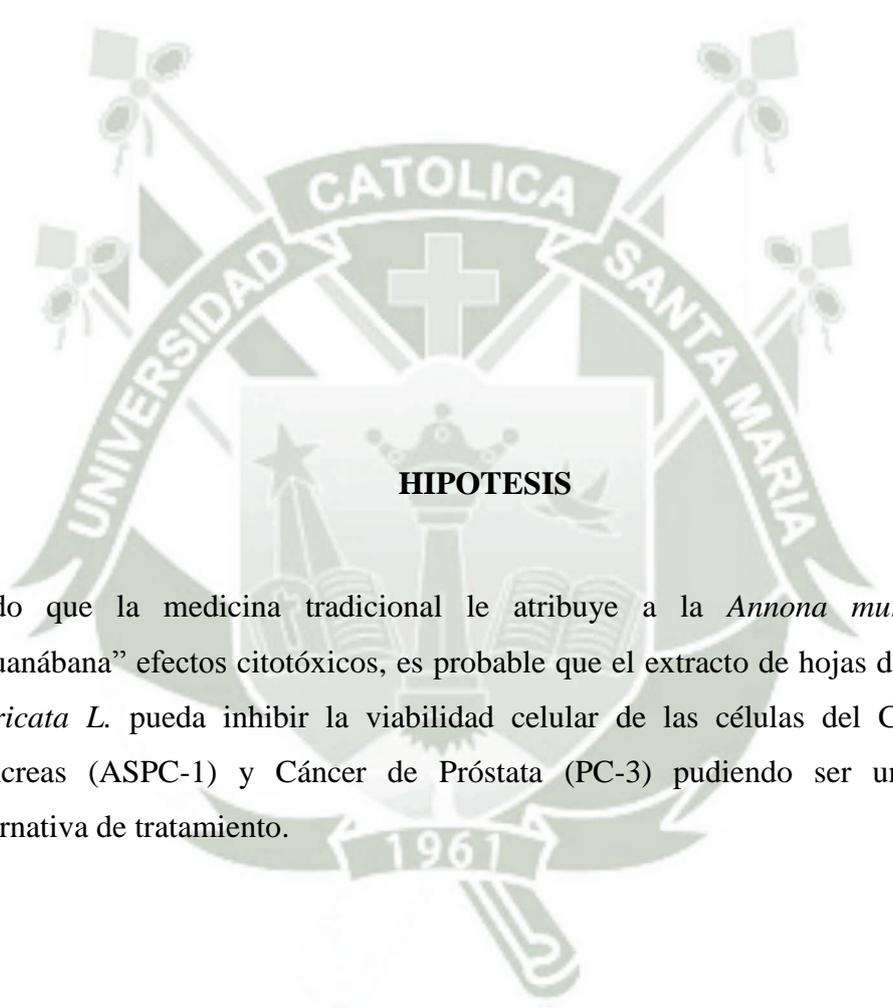
La medicina tradicional es la suma de conocimientos teóricos y prácticos que se basan en la experiencia y observación que se difunden de generación en generación hasta la actualidad. Es muy importante ya que es la herencia ancestral de nuestros pueblos amazónicos que utiliza un sin fin de especies vegetales para la cura de muchas enfermedades<sup>(1)</sup>.

En el Perú, nuestra flora amazónica constituye una de las mayores reservas de la fitoterapia, hoy en día numerosas especies han sido estudiadas, obteniéndose de ellas importantes compuestos biológicamente activos que han contribuido a aliviar las dolencias de la humanidad, de ahí mi gran interés de analizar y estudiar estos recursos tan importantes que nos da la naturaleza.

La Guanábana, planta anual de origen tropical, tiene como nombre científico *Annona muricata L.*; a sus hojas se les atribuyen diversas propiedades farmacológicas, una de gran interés es la propiedad citotóxica; la cual es importante mencionar se ha encontrado en la mayoría de partes que comprenden a la Guanábana observando una elevada presencia en los extractos de hojas de Guanábana las cuales cumplen con los requisitos establecidos por las farmacopeas internacionales para su uso como planta medicinal<sup>(1) (2)</sup>.

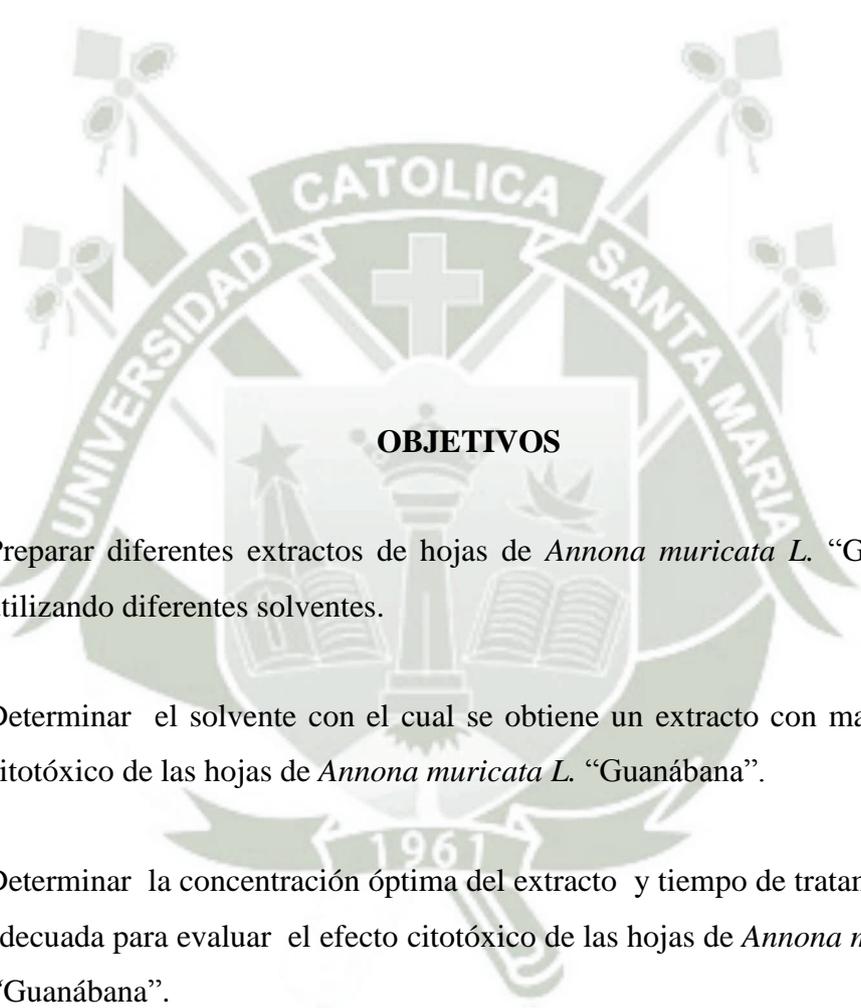
En el presente trabajo de investigación se desea corroborar la acción citotóxica de esta especie vegetal frente a líneas celulares de Cáncer de Páncreas (ASPC-1) y Cáncer de Próstata (PC-3); y también contribuir más en los conocimientos de nuestra flora que por investigaciones anteriores es una planta rica en principios activos.





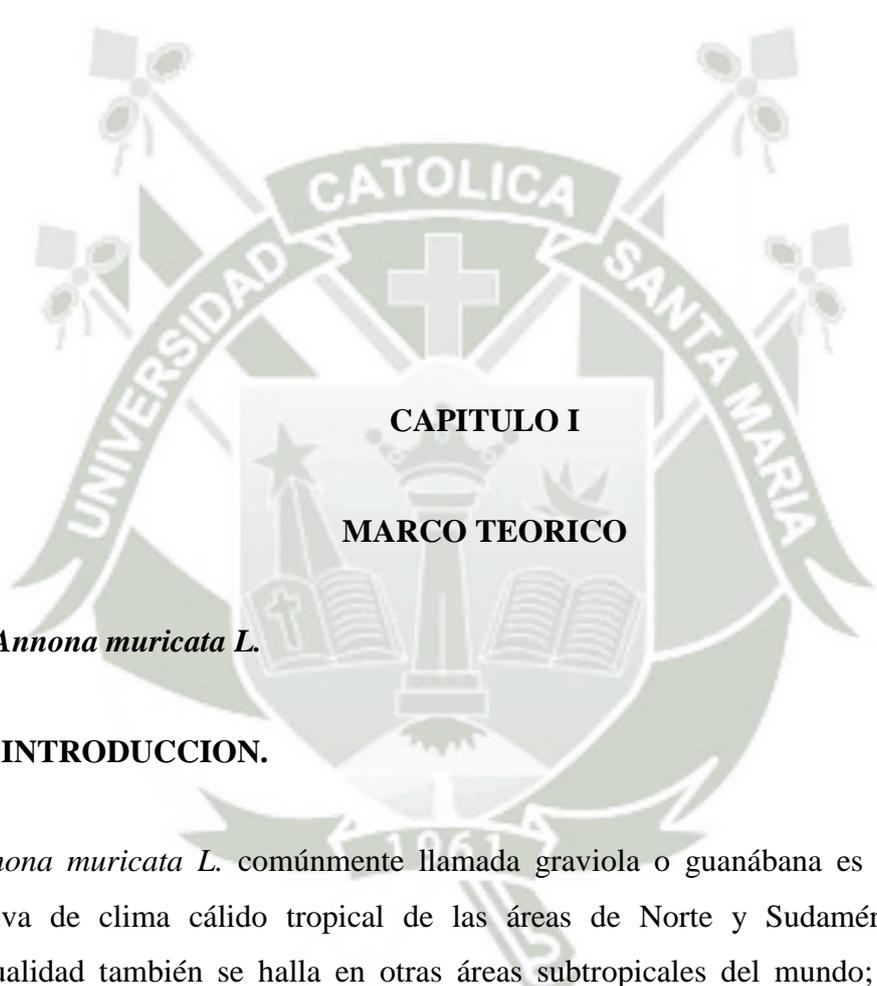
## HIPOTESIS

Dado que la medicina tradicional le atribuye a la *Annona muricata L.* “Guanábana” efectos citotóxicos, es probable que el extracto de hojas de *Annona muricata L.* pueda inhibir la viabilidad celular de las células del Cáncer de Páncreas (ASPC-1) y Cáncer de Próstata (PC-3) pudiendo ser una futura alternativa de tratamiento.



## OBJETIVOS

1. Preparar diferentes extractos de hojas de *Annona muricata* L. “Guanábana” utilizando diferentes solventes.
2. Determinar el solvente con el cual se obtiene un extracto con mayor efecto citotóxico de las hojas de *Annona muricata* L. “Guanábana”.
3. Determinar la concentración óptima del extracto y tiempo de tratamiento más adecuada para evaluar el efecto citotóxico de las hojas de *Annona muricata* L. “Guanábana”.
4. Determinar el posible mecanismo de acción que justifique el posible efecto citotóxico de las hojas de Guanábana.
5. Comparar el efecto citotóxico producido las líneas celulares PC-3 y ASPC-1; y analizar los resultados obtenidos.



## CAPITULO I

### MARCO TEORICO

#### 1. *Annona muricata* L.

##### 1.1.INTRODUCCION.

*Annona muricata* L. comúnmente llamada graviola o guanábana es una planta nativa de clima cálido tropical de las áreas de Norte y Sudamérica; en la actualidad también se halla en otras áreas subtropicales del mundo; todas las partes del árbol de guanábana son usados en la alimentación y medicina natural. <sup>(2)</sup>

##### 1.2.CLASIFICACION TAXONOMICA.

Basados en el Sistema de Clasificación de Engler & Prantl modificado en 1964 por Melchor; los biólogos, Hamilton Belytran S.; Severo Baldeón M. y Elida

Carrillo F., del Herbario San Marcos de la Universidad Mayor de San Marcos, indican para la *Annona muricata* L. (Guanábana) la siguiente clasificación taxonómica: <sup>(3)</sup>

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Magnoliales
Familia	Annonaceae
Género	Annona
Nombre	<i>Annona muricata</i>

### 1.3.DESCRIPCION BOTANICA.

La guanábana (**Figura N° 1**) es un árbol o arbusto perennifolio de 5 a 8 metros de altura; de tallo erguido ramificado.



**Figura N° 1:** *Annona muricata* L. (Guanábana)

Posee ramas largas con hojas oblongo-elípticas a oblongo-obovadas de 6 a 12 cm de largo por 2.5 cm de ancho, su tronco es ramificado posee ramas cilíndricas, arrugadas y ásperas; las flores son solitarias a lo largo del tallo; su fruto es abundantemente carnoso de color verde oscuro, posee una pulpa de color blanco y aspecto algodonoso, numerosas semillas por fruto, una por carpelo <sup>(3)</sup>.

#### 1.4.ASPECTOS QUIMICOS.

Diversas evaluaciones fitoquímicas han demostrado que las diferentes partes de la planta de Guanábana poseen diversos fitoconstituyentes y componentes entre los que se hallan comprendidos los alcaloides, triglicósidos flavonoides, compuestos fenólicos, ciclo péptidos y aceites esenciales. La parte de la planta que mayor cantidad de componentes presenta son las hojas de *Annona muricata L.* <sup>(4)</sup>

Las hojas de Guanábana poseen un amplio espectro de compuestos químicos, de los cuales los que han sido ampliamente investigados por su interés farmacológico son las acetogeninas (ACG), Moghadamtousi S. en un estudio químico de la *Annona muricata L.* plantea que posee la presencia de murihexina A,B y C, annocatalina, annocatacina B, anonaina, muricoreacina, muricatocina c, gigantetronenina, annopentocina A, B, C, cis-annomuricina-D-uno, trans-annomuricina-D-uno, cis-corossolona, annocatalina, gigantetrocina A, epomuriceina A y B<sup>(5)</sup>.

Otros compuestos de interés en las hojas de *Annona muricata L.* son los alcaloides como la reticulina, coclurina, coreximina, aterosperminina, anomurina; también los triglicósidos de flavonoides como el ácido gálico, epicatequina, quercetina 3-O- rutinosido, catequina, ácido clorogenico, argentinina, kaempferol 3-O- rutinosido, quercetina 3-O-glucosido, quercetina, kaempferol.<sup>(6)</sup>

#### 1.5.ASPECTOS FARMACOLOGICOS.

Los extractos de *Annona muricata L.* (Guanábana) presentan diversas propiedades farmacológicas que generan gran interés para la industria farmacéutica.<sup>(7)(8)</sup>

- **Antiartrítica:** Un estudio realizado e *in vitro* a diferentes dosis de un extracto etanolico realizado en ratas inducidas con artritis, la administración oral del extracto redujo el edema de forma dosis dependiente estos durante semanas de administración.

- **Anticonvulsivante:** En países de africanos es común el uso de decocciones para el control de fiebre elevada que desencadena convulsiones, estudios diversos realizados demuestran que posee el efecto de disminuir la incidencia de las convulsiones.
- **Antidiabético e Hipolipemiante:** Es considerado un coadyuvante en la terapia antidiabética para evitar futuras complicaciones y mejorar la calidad de vida de los pacientes, diversos estudios han demostrado su actividad *in vivo*, Wistar y colegas en un estudio realizado en ratas inducidas a diabetes con inyecciones de estreptozotocina a las cuales posteriormente se les administro extracto metanólico de hojas de *Annona muricata L.* por dos semanas observando que los niveles de glucosa disminuían significativamente, también se observó que la administración también disminuyo los niveles de colesterol, LDH y TG (Triglicéridos); lo cual indicaría un efecto positivo para pacientes con elevados niveles de colesterol en sangre
- **Anticancerígena:** Varios estudios *in vitro* e *in vivo* reportan la actividad citotóxica del extracto de hojas de *Annona muricata L.* han demostrado este efecto frente a diversos tipos de líneas celulares de cáncer, estudios diversos tratan de determinar el mecanismo exacto por el cual ejerce acción citotóxica entre las cuales puede ser por inducción de apoptosis, activación de caspasas y arresto del ciclo celular en la fase G1.<sup>(9)(10)</sup>

Entre otras propiedades, la Guanábana es antiinflamatoria, anticonceptiva, antioxidante, antiparasitaria, hepatoprotectora y gastroprotectora; muchas de estas propiedades están actualmente en proceso de investigación<sup>(11)</sup>

## 2. ACETOGENINAS (ACG).

### 2.1.CONCEPTO.

Son un grupo de metabolitos secundarios los cuales son derivados de ácidos grasos con cadena larga los cuáles son hallados en las diversas especies

pertenecientes a la familia Annonaceae, esta estructura se caracteriza por que la cadena larga posee un grupo alfa-lactónico alfa-beta-insaturado o saturado y uno a tres anillos tetrahidrofurano (THF). Son altamente apreciadas debido a que posee toxicidad múltiple (anticancerígeno, antibacteriano y antiviral), la primera acetogenina identificada fue la Uvaricina en 1982<sup>(12)</sup>.

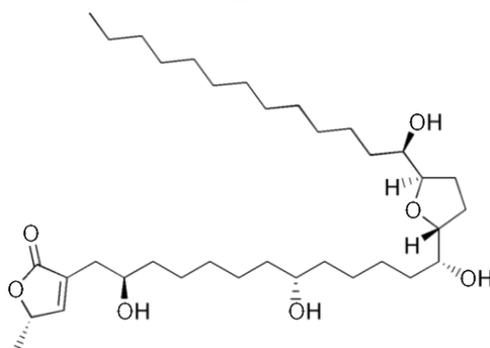
## 2.2.DISTRIBUCION Y LOCALIZACION.

Están ampliamente distribuidos en la familia de las Annonaceas, principalmente en los géneros Annona, Asimina, Disepallum, Goniothallamus, Ronilla, Uvaria y Xllopia, las cuáles se encuentran distribuidas en todas las partes de la planta.<sup>(13)</sup>

La composición, el tipo y la cantidad de acetogeninas presentes variara de acuerdo al órgano de la planta en el cual este presente.

## 2.3.ESTRUCTURA QUIMICA.

Las ACG son derivados policetidos los cuales se caracterizan por poseer una cadena alifática larga con uno a tres anillos de tetrahidrofurano (THF) estos pueden ser remplazados por anillos epóxido o dobles enlaces, y con un anillo de  $\gamma$ -lactona insaturado metil sustituido como grupo terminal<sup>(14)</sup> (**Figura N°2**), por lo general las posiciones alfa de los anillos son hidroxiladas. Estos compuestos poseen de 35 a 37 carbonos de origen poliacético unido a una cadena alifática la cual puede estar hidroxilada, cetonzada y/o acetoxilada.<sup>(15)</sup>



**Figura N° 2:** Estructura de una acetogenina (ACG) Annonacina

## 2.4. BIOSINTESIS.

Las acetogeninas o poliacetidos son productos derivados de una larga cadena de ácidos grasos existentes, estas son formadas por la extensión de la cadena de múltiples, propionatos y oxigenados para así conformar los anillos de THF y lactona presentes a lo largo de toda la cadena.<sup>(17)</sup>

## 2.5. CLASIFICACION.

La clasificación de las ACG en el grupo de las Annonaceae se hace de acuerdo a diversas características, siendo las más importantes las siguientes:

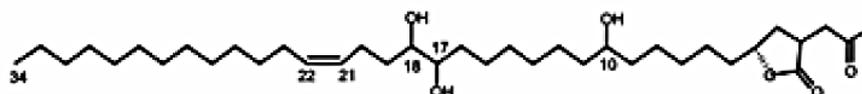
### 2.5.1. SEGUN LA CANTIDAD DE ANILLOS EN SU ESTRUCTURA<sup>(18)</sup>:

Pueden ser: Mono- tetrahydrofurano, adyacentes y no adyacentes Bis-THF.

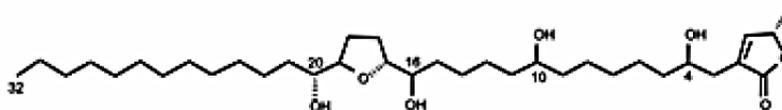
### 2.5.2. SEGUN EL TIPO Y UBICACION DE LOS SUSTITUYENTES Y POR SU ESTEREOQUIMICA<sup>(19)(20)(21)(22)</sup>:

Dentro de esta se encuentran 6 tipos:

**Lineales:** Precursor principal de las epoxiacetogeninas, su principal diferencia es el grado de insaturación de la cadena así como la hidroxilación alquílica de la cadena (**Figura N°3**).

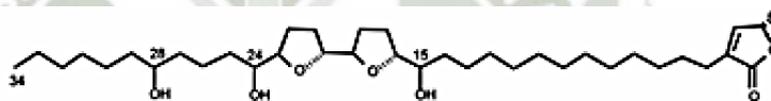
**Figura N° 3:** Estructura de una ACG lineal (Venezoina)

**Mono-THF:** Un solo anillo THF, por lo general posee 35 carbonos con diferentes grados de oxidación (**Figura N°4**).



**Figura N°4:** Estructura de una Mono-THF acetogenina (Annonacina).

**Bis-THF:** 2 anillos THF, los cuales son adyacentes o no adyacentes; cadena compuesta por 35-37 carbonos los cuales son diferenciables entre sí por su tipo de oxidación, número, tipo y ubicación de su sustituyente al igual que su estereoquímica. (**Figura N°5**)



**Figura N°5:** Estructura de una Bis-THF adyacente cetogenina (Esquamocina).

**Epoxiacetogeninas:** Por lo general poseen 1 a 2 anillos THF y uno de estos dos anillos es remplazado por un grupo epóxido, es precursor de las acetogeninas.

**Tri-THF:** 3 anillos THF, en la actualidad tan solo se conoce una que es la Goniocina.

**Tetrahidropiránica (THP):** Presencia de anillo tetrahidropirano (THP) como sustituyente en la cadena alquílica.

## 2.6. PROPIEDADES BIOLÓGICAS.

Las ACG poseen una acción directa en las mitocondrias mediante la alteración en la producción del ATP y también sobre el Aparato Reticular de Golgi; así como

sobre las membranas y el plasma celular; esto último principalmente sobre las células cancerígenas.<sup>(23)</sup>

### 3. PROSTATA.

Es un órgano masculino de tipo glandular ubicado en la pelvis por debajo de la vejiga urinaria y detrás de la sínfisis del pubis y rodea la primera porción de la uretra, pesa aproximadamente 20g y sus dimensiones son 3x4x2cm de ancho largo y espesor aproximadamente, esto último es variable de acuerdo a la edad del varón; la uretra prostática y los conductos eyaculadores pasan a través de esta y la dividen en dos lóbulos.<sup>(24)</sup>

En su configuración macroscópica se distinguen los siguientes componentes (**Figura N°6**)<sup>(25)</sup>:

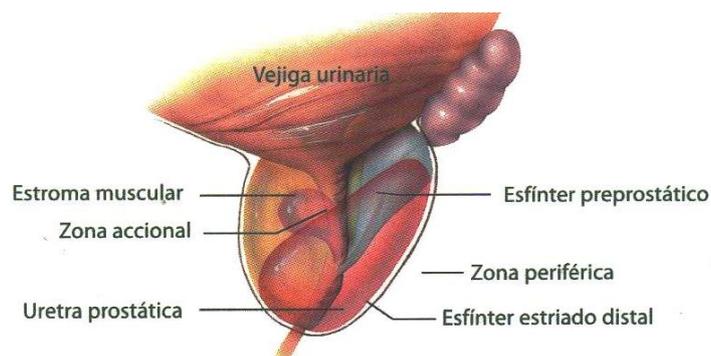
**La base prostática:** cuello vesical, extensión caudal intermedia, fibras longitudinales del extrusor vesical

**El ápex:** vena dorsal profunda del pene, ligamentos puboprostaticos.

**Cara anterior:** Complejo venoso prostático dorsal de Santorini, espacio virtual de Retzius

**Cara posterior:** Fascia recto prostática, Ampolla rectal, vesículas seminales, ampollas deferenciales, fondo de saco rectovasical

**Dos caras laterales:** Fascia endopelvica, Fascia peri prostática, Fascia del elevador del ano.



**Figura N° 6:** Estructura Anatómica de la Próstata

### 3.1. FUNCION <sup>(26)</sup>.

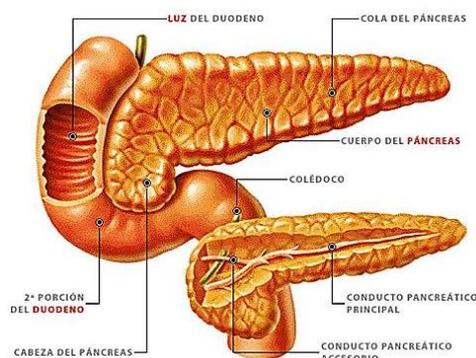
- Es el órgano encargado de la secreción del líquido prostático el cual va a unirse a las secreciones de las vías espermáticas y a los espermatozoides para así conformar el semen.
- Líquido prostático produce el aumento de la motilidad y fertilidad de los espermatozoides esto por su pH de naturaleza alcalina.
- Favorece la expulsión del semen.

### 4. PANCREAS.

Órgano de mucha importancia que está ubicado transversalmente en el retro perineo, específicamente entre el duodeno a la derecha y el bazo a la izquierda, pesa entre 85g a 100g aproximadamente y mide entre 14cm a 18cm aproximadamente <sup>(27)</sup>.

Este órgano presenta 4 porciones, son las siguientes <sup>(28)</sup> (**Figura N°7**):

- Cabeza
- Cuello
- Cuerpo
- Cola



### Figura N°7: Porciones Anatómicas del Páncreas

Dentro de este órgano hallamos tres tipos de células que cumplen funciones de suma importancia:

**Células alfa:** secreción de la hormona glucagón.

**Células beta:** secreción de la hormona insulina.

**Células delta:** secreción de la hormona inhibidora del crecimiento somatostatina (inhibidor de secreción de insulina y glucagón).

#### 4.1.FUNCION. <sup>(29)</sup>

- Secreción exocrina de enzimas, agua y electrolitos, siendo el más importante el bicarbonato, hacia el duodeno.
- Secreción endocrina de insulina y glucagón, ambas para regular el metabolismo energético del cuerpo.

#### 5. CANCER.

Considerada una de las principales causas de muerte a nivel mundial, según la OMS en el 2005 calculó que 7,6 millones de personas murieron a causa del cáncer.<sup>(30)</sup>

Designación que reciben un amplio grupo de enfermedades que afectan a gran parte de los de los órganos del cuerpo humano; enfermedad caracterizada por un crecimiento tisular producido por la proliferación de células anormales las cuales poseen gran capacidad de invasión y posterior destrucción de los tejidos, su origen puede ser a partir de cualquier célula que se halle en el organismo.<sup>(31)</sup>

#### 5.1.TIPOS Y FASES DEL CANCER.<sup>(32)(33)</sup>

Los tipos de cáncer se clasifican en función del tejido y de la célula de origen, existen cientos de diversas formas siendo los siguientes tres los principales tipos:

**Sarcomas:** Los cuales tienen su origen principalmente en tejido conectivo, aquí se halla por ejemplo el cáncer de hueso.

**Carcinomas:** Cuyo origen se encuentra principalmente en tejido epitelial y tejidos glandulares; constituyen el tipo de cáncer más frecuente; en este se encuentra el cáncer de próstata.

**Leucemias y linfomas:** Formado por los tipos de cáncer que afecta a tejidos formadores de las células sanguíneas, estas causan inflamación de ganglios, invasión del bazo y médula ósea y un incremento en la producción de células blancas.

## 5.2.FACTORES QUE INFLUYEN EN EL DESARROLLO DEL CANCER.

Existen diversos factores que pueden causar el cáncer en ciertos individuos expuestos a ellos, muchas investigaciones estudian como la interacción de estos factores entre sí pueden causar la presencia de tumores malignos, muchos de los pacientes que presentan cáncer presentan una clara característica de herencia o como consecuencia de una lesión causada de manera externa.<sup>(34)</sup>

Entre las principales causas se encuentran:<sup>(35)</sup>

**Herencia:** Se debe principalmente a la ausencia de los genes supresores tumorales o anti oncogenes los cuales en condiciones normales previenen la multiplicación celular; la OMS tiene estimado que entre un 5-10% de los cánceres existentes tienen su origen a nivel hereditario. Algunas formas cuya causa es la herencia es: el cáncer de mama, cáncer de colon, retinoblastoma.

**Sustancias químicas:** Existen algunas sustancias presentes en la vida cotidiana así como en el trabajo que realizan muchas personas las cuales están expuestas a sustancias altamente cancerígenas, dentro de estas la sustancia más conocida es el

cigarrillo el cual entre sus componentes presenta: nicotina, óxidos de carbono y el alquitrán; los cuales en conjunto incrementan la tendencia de la persona a padecer cáncer de pulmón. Algunas de las sustancias de alto nivel cancerígeno son: alquitrán, benzopireno, arsénico, asbesto, alcohol, etc.

**Radiaciones:** Esta es la segunda causa más importante y conocida, las radiaciones producen alteraciones a nivel del ADN (roturas o transposiciones cromosómicas) estos cambios producen el inicio del proceso de carcinogénesis el cual luego de un periodo largo de latencia desencadenara el cáncer. Entre los tipos de radiación más comunes estas: rayos UV (sol), Rayos X, los cuales por lo general son los causantes del Cáncer de piel y las leucemias.

Entre otras posibles causas se encuentran: Infecciones causadas por virus y traumas externos.

### 5.3. DIAGNOSTICO.

Se hace a través de: historia clínica y familiar, examen físico, estudios radiológicos, RMN, ecografía, marcadores tumorales, centelleo gamma, tomografía de emisión de protones (PET), radioinmunoconjugados, endoscopia, estudios citológicos, biopsia y pruebas de laboratorio. <sup>(35)</sup>

### 5.4. TRATAMIENTO. <sup>(35)</sup>

El tratamiento a usar dependerá del tipo de cáncer del paciente:

#### **Cáncer local:**

- Cirugía
- Radioterapia

#### **Cáncer sistémico:**

- Quimioterapia
- Hormonoterapia

- Inmunoterapia

## 5.5.CANCER DE PROSTATA:

Es el cáncer más predominante en el sexo masculino; en el año 2012 el Ministerio de Salud estimó que 65 de cada 10000 hombres principalmente entre 50 – 65 años fueron diagnosticados de cáncer de próstata<sup>(36)</sup>, el cual se forma en los tejidos que componen a la próstata, muchas veces es confundida con la hiperplasia prostática benigna la cual solo es un agrandamiento no canceroso de la próstata dado que los síntomas producidos por ambas patologías son similares.<sup>(37)</sup>

Entre las causas más frecuentes se encuentran: edad, origen étnico, herencia, genes, alimentación, hormonas y estilo de vida.<sup>(38)</sup>

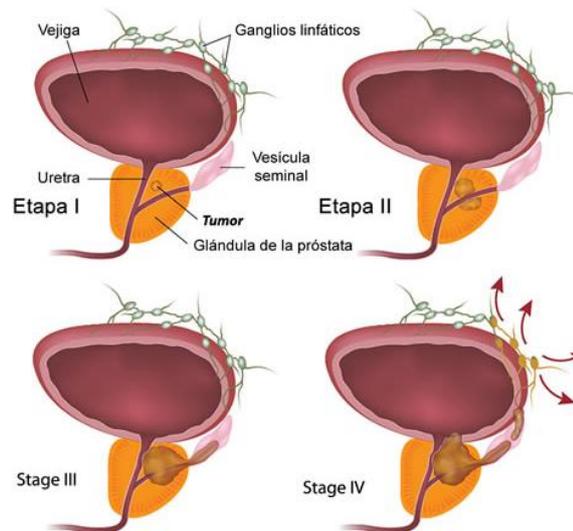
El diagnóstico se realiza a través de un examen físico (tacto rectal) y la medición de una proteína producida por la próstata denominada test de antígeno prostático específico (PSA) en sangre; y posteriormente a ello una biopsia.<sup>(39)</sup>

El tratamiento dependerá del estadio en el cual se halle el cáncer:<sup>(40)(41)(42)</sup> (**Figura N°8**)

**Estadio I y II:** Estadio temprano, el cáncer se halla localizado únicamente en la próstata, el tratamiento a utilizar es la cirugía, la radioterapia y terapia hormonal.

**Estadio III:** Cáncer localmente avanzado dado que se ha expandido hasta la capa externa que recubre la próstata llamada cápsula, el tratamiento a utilizar es: radioterapia y terapia hormonal asociada.

**Estadio IV:** Cáncer avanzado o metastásico, tratamiento es la terapia hormonal.



**Figura N°8:** Estadios del Cáncer de Próstata

## 5.6.CANCER DE PANCREAS.

El Ministerio de Salud Peruano en el año 2012 indicó que 12 varones de cada 10000 y 8 mujeres de cada 10000 son diagnosticados de cáncer de páncreas anualmente, muchos de estos casos van en aumento principalmente en personas mayores a los 65 años lo cual ocasiona un diagnóstico tardío de la enfermedad que es cuando el cáncer se ha extendido e invadido otros órganos<sup>(43)</sup>; por lo tanto es considerada por la OMS la quinta causa más importante de muerte a nivel mundial, es un tipo de cáncer en el cual se observa la aparición de células anormales en el tejido pancreático, el 80% de estos casos se producen en el páncreas exócrino.<sup>(44)</sup>

Entre las causas más frecuentes del cáncer de páncreas se encuentran: herencia, tabaquismo, edad, obesidad, pancreatitis crónica, diabetes, alcoholismo.<sup>(45)(46)</sup>

El diagnóstico de este tipo de cáncer se realiza con: exploración clínica (síntomatología), exploración radiológica, pruebas de laboratorio, examen histopatológico, biopsia.<sup>(47)</sup>

El tratamiento de este tipo de cáncer será variable de acuerdo al estadio de la enfermedad:<sup>(48)(49)(50)(51)</sup>

**Estadio 0, IA y IB:** Cáncer se halla confinado dentro del páncreas; como tratamiento se utiliza: extirpación (cabeza de páncreas, conducto biliar, vesícula biliar, estomago), pancreatemia distal con esplenectomía (cuerpo, cabeza de páncreas y bazo), quimio radiación y tratamiento coadyuvante.

**Estadio IIA:** Cáncer ha invadido tejidos que rodean al páncreas pero no a grandes vasos sanguíneos ni nervios importantes ni ganglios linfáticos; se utiliza: extirpación completa del páncreas, quimio radiación, tratamiento coadyuvante.

**Estadio IIB y III:** Cáncer ha invadido tejidos circundantes y ganglios linfáticos pero no ha invadido otras partes del cuerpo, se utiliza: quimioterapia y quimio radiación (por separado o asociadas).

**Estadio IV:** El cáncer se ha diseminado a otras partes del cuerpo, no es posible la cura pero si aliviar los síntomas del paciente, se utiliza: quimioterapia y fármacos (gemcitabina, 5-fluorouracilo).

## 6. MUERTE CELULAR.

Se denomina así a la respuesta celular del organismo la cual desempeña un papel importante tanto en el desarrollo del cuerpo durante su formación así como en la regulación de la homeostasis en los tejidos a través de la eliminación de células no deseadas.<sup>(52)</sup>

Este proceso puede iniciarse por diversas causas como la pérdida de la función, daño mecánico, infecciones, exposición a agentes químicos o ausencia de nutrientes. Basado en los criterios clásicos la muerte celular transcurre de tres formas principalmente como son los mecanismos regulados, apoptosis y la muerte celular no regulada.<sup>(53)</sup>

## 6.1. APOPTOSIS.

También denominada muerte celular programada, es el término comúnmente utilizado para describir el proceso en el cual las células mueren en un tiempo predecible y este tiene lugar durante el remodelado tisular; en este proceso pueden existir defectos que desencadenan el cáncer, enfermedades autoinmunes y las infecciones virales persistentes.<sup>(54)</sup>

Este proceso posee ciertas características que lo diferencian de la necrosis, y son:<sup>(55)</sup>

- Hay reducción del volumen celular
- Compactación de organelos
- Condensación de la cromatina
- Formación y aparición de cuerpos apoptóticos
- No se destruye la membrana celular
- No hay presencia de inflamación

### 6.1.1. VIAS DE INDUCCIÓN DE LA APOPTOSIS.

#### 6.1.1.1. VIA INTRINSECA O MITOCONDRIAL.

Actúan las proteínas de la Familia BCL-2 (Bcl-2, Bax, Bad, Bcl-X1, Bcl-Xs, Mcl-1) las cuales determinan mediante su expresión la muerte o supervivencia de una célula dado que algunas son promotoras y otras inhibidoras de las señales de apoptosis.<sup>(56)</sup>

En esta vía intrínseca (**Figura N°9**), actúan las del grupo de las pro-apoptóticas (Bax y Bak) que se localizan en el citoplasma, estas regulan la apoptosis ejerciendo su acción principalmente sobre la mitocondria, esta activación causa la aparición de poros en la membrana externa de la mitocondria produciendo con esto la liberación de las proteínas del espacio intramembrana principalmente el Citocromo C.<sup>(57)</sup>

Este citocromo C una vez ya liberado en el citosol, activa a un complejo proteico denominado “apoptosoma”, el cuál activa directamente al sistema de caspasas, inicialmente se activa la caspasa-9 la cuál procede a activar a las caspasas efectoras como es el caso de las caspasa-3, esto desencadena las últimas fases del proceso de apoptosis.<sup>(58)(59)</sup>

Esta vía intrínseca esta también conectada a la vía de receptores de la muerte, dado que hay activación de la caspasa-8 la cual activa a la proteína Bi, lo cual tiene como consecuencia la apertura del poro mitocondrial y la posterior activación de la caspasa-9.<sup>(60)</sup>

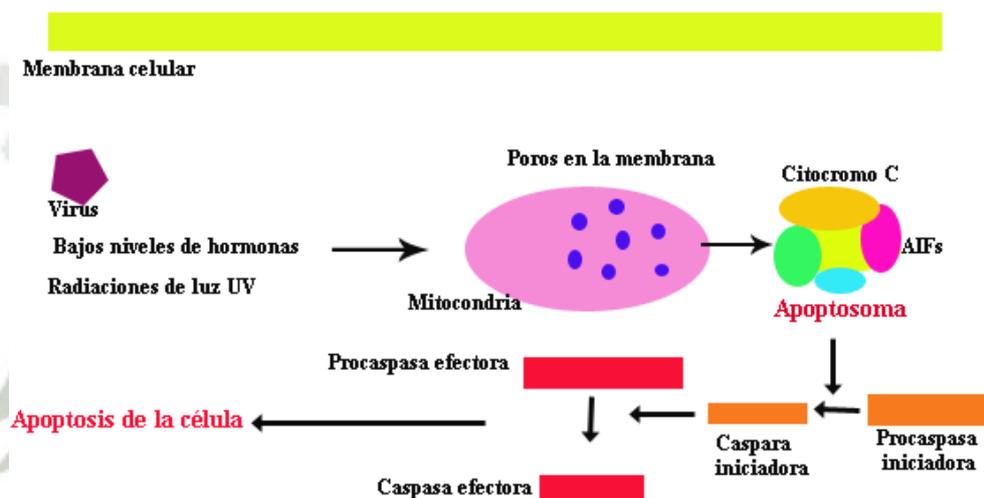


Figura N°9: Vía intrínseca de la inducción de apoptosis

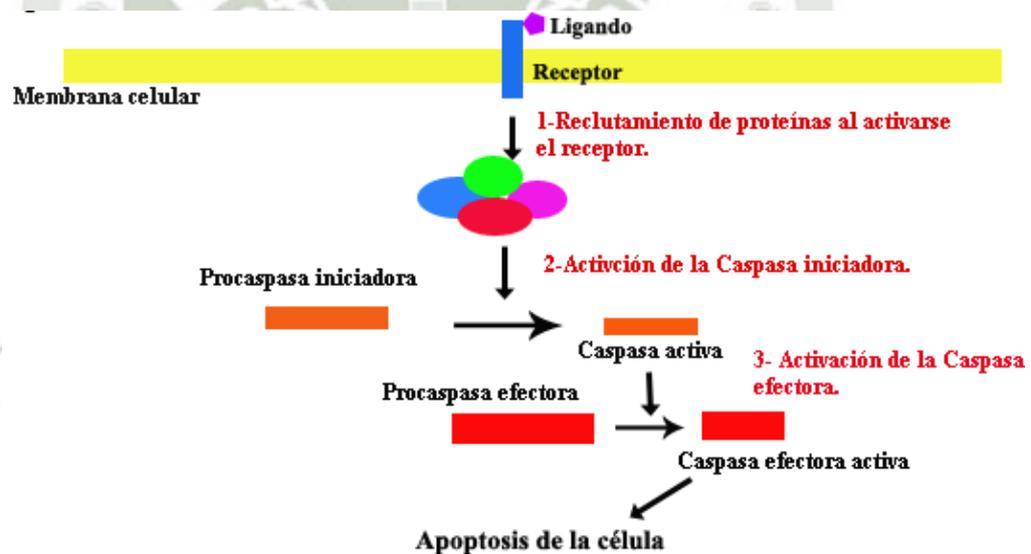
#### 6.1.1.2.VIA EXTRINSECA O RECEPTORES DE MUERTE.

En esta vía las señales pro- apoptoticas son recibidas desde el exterior de las células así como de células vecinas a esta. Dentro de esta vía se han identificado dos familias de receptores que actúan principalmente: Proteína FAS y en Factor de Necrosis Tumoral (TNF).<sup>(61)(62)(63)</sup> (Figura N°10).

- La proteína FAS a nivel intracelular se enlaza con el factor intermedio FADD (Factor Associated Death Domain), participa activando a las caspasas- 8 y 10; esta vía esta inactiva hasta que en su parte externa se produce el enlace con un

cofactor llamado ligando FAS el cual actúa como un desencadenante de una vía en la cual las caspasas están inactivas y el resto de la cadena está preparado para recibir el enlace exterior, es esta característica la que le da la rapidez de actuar sin la necesidad de necesitar la síntesis de otros factores.

- El receptor de membrana TNF en su porción intracelular se conecta con los denominados complejos intermedios como el Tradd (TNF Receptor Associated Death Domain) y RAID (Receptor Associated Interleukine Death Domain) las cuales activan a las caspasas iniciadoras. Pero si se asocian al complejo denominado Tradd el cual activa a las protein-quinasas y con ello estimulan la proliferación celular (efecto inverso).



**Figura N°10:** Vía extrínseca de la inducción de la Apoptosis

## 7. CULTIVO CELULAR.

Se refiere al procedimiento en el cuál se realiza el crecimiento y mantenimiento *in vitro* de células, tejidos u órganos de origen vegetal y animal, la obtención de las células se da por medios mecánicos o enzimáticos, luego de su extracción son llevadas a un medio artificial el cual posee todas las características y nutrientes que permiten su desarrollo, crecimiento, propagación y mantenimiento de las

mismas, pero permite que el investigador pueda controlar su desarrollo según sus requerimientos.<sup>(64)</sup>

Permite tener líneas celulares de un solo tipo ya sean vegetales o animales; el cultivo celular está relacionado con los cultivos de tejidos y órganos, este tipo de cultivos permite la realización de gran cantidad de estudios *in vitro* en muchos laboratorios, se debe tener extremo cuidado con los materiales y reactivos que estén en contacto con los cultivos celulares ya que pueden causar contaminación o alteraciones en los tipos celulares.<sup>(65)</sup>

## **7.1.TIPOS DE CULTIVOS CELULARES.<sup>(66)</sup>**

### **7.1.1. CULTIVOS PRIMARIOS.**

Las células son provenientes del tejido original, es el primer paso que se da luego del aislamiento celular a partir del tejido y se lleva a condiciones apropiadas para su proliferación hasta agotar el contenido disponible para su crecimiento. La preparación de estos cultivos es complicado dado que las células se mantienen *in vitro* solo por un periodo de tiempo limitado, en este periodo de tiempo las células primarias conservan muchas características diferenciadas de las células *in vivo*.

### **7.1.2. LINEA CELULAR.**

Se obtiene a partir del primer sub-cultivo exitoso de un cultivo primario, esta línea celular prolifera por tiempo indefinido siempre que se hallen en un medio fresco apropiado.

### **7.1.3. CEPAS CELULARES.**

Se obtiene mediante la utilización de la clonación por selección de un cultivo derivado de un cultivo primario o línea celular, a través de esta selección se aísla la población positiva de las líneas celulares las cuales se convierten en cepas celulares.

#### **7.1.4. PASAGE CELULAR.**

Se denomina así al trasplante de células de un recipiente a otro con o sin dilución, este traspaso genera la pérdida de un número de células lo cual produce una disolución en la totalidad de los cultivos, esto se denomina sub-cultivo.

### **8. LINEAS CELULARES DE ESTUDIO.**

#### **8.1. LINEA CELULAR ASPC-1.**

Son células de adenocarcinoma ascitis metástasicas pancreáticas humanas estas son derivadas de xenoinjertos de ratones desnudos previamente iniciados con células de la ascitis de una paciente de raza caucásica de 62 años de edad con Cáncer de Páncreas; estas células producen el antígeno carcinoembrionario (CEA) asociado al cáncer de páncreas humano y mucina específica.<sup>(67)</sup>

#### **8.2. LINEA CELULAR PC-3.**

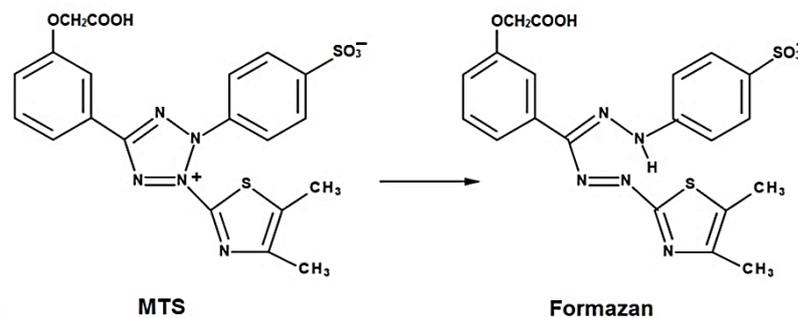
Son células de adenocarcinoma de próstata grado 4 derivadas de xenoinjertos de ratones desnudos iniciados con células de adenocarcinoma de una paciente varón de 64 años de raza caucásica con cáncer de próstata en estadio terminal; esta célula produce presencia de fosfatasa acida y una baja actividad de la reductasa de la testosterona-5-alfa al igual que las células de origen.<sup>(68)</sup>

### **9. ENSAYOS EN CULTIVOS CELULARES.**

#### **9.1. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR.**

Permite la determinación de la inhibición del crecimiento celular utilizando un ensayo colorimétrico CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay el cual permite la determinación de células viables en el ensayo de proliferación o citotoxicidad. En este tipo de ensayo se utiliza el colorante tetrazolio [3-(4,5-dimetil-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS) y su reactivo de acoplamiento el etosulfato de fenazina (PES); este colorante es reducido por las hidrogenasas en las células vivas produciendo el formazán (**Figura N°11**) el cual es soluble en agua y medio de cultivo tisular. La

absorbancia de este formazán es cuantificada a la longitud de onda de 490 – 500 nm.<sup>(69)</sup>



**Figura N°11:** Estructura química del MTS tetrazolio y su producto formazán

La cantidad de formazán producido es proporcional a la cantidad de células vivas; la intensidad del color observado es directamente proporcional al número de células vivas presentes en el medio. En este tipo de ensayo el reactivo MTS es agregado directamente sobre el medio de cultivo celular; comparado con otros métodos este no requiere una gran cantidad de pasos previos por lo que es muy utilizado comparado con otros ensayos que tienen la misma finalidad.<sup>(70)</sup>

## 9.2.CASPASA.

Son un grupo de enzimas que pertenecen a la familia de las cistein proteasas y cuya acción es cortar específicamente tras residuos de aspartato, es de aquí el origen de su nombre C-isteinas-asp-artato prote-asas, en la actualidad se conocen aproximadamente 12 caspasas de las cuales las que se hallan involucradas en la regulación y posterior ejecución de la apoptosis son la 2, 3, 6, 7, 8, 9 y 10; las caspasas pueden ser clasificadas como iniciadoras las cuales degradan pro-formas activas de las caspasas efectoras las cuales degradan a otros sustratos proteicos en la célula para así dar inicio a los procesos apoptóticos.<sup>(71)</sup>

Todas las caspasas pro-apoptóticas se hallan en la célula sana como pro-enzimas inactivas; estas se activan cuando las células entra en el proceso de apoptosis, esta activación se da a través de pasos proteolíticos que culminan con la generación de dos fragmentos las cuales componen a la enzima ya activa. Existen

actualmente dos tipos de cascadas de activación de las caspasas las cuales son importantes en el proceso de regulación de apoptosis.<sup>(72)</sup>

### 9.2.1. ACTIVACION DE CASPASAS INICIADORAS.

Diversos estudio han tratado de dilucidar exactamente el proceso por el cual las caspasas iniciadoras son activadas, por ejemplo la caspasa-9 se encuentra como un monómero tanto antes como después de todo el procesamiento proteolítico y la caspasa-8 se halla en un equilibrio constante de monómero y dimero; estas dos caspasas son las caspasas iniciadoras más importantes; las activación de estas es llevada a cabo por los complejos multiproteicos de nominados DISC y apoptosoma para la caspasa 8 y 9 respectivamente.<sup>(73)</sup>

Los DR son un grupo de proteínas que pertenece a la familia de los receptores de TNF y son: Fas, TNFR1, DR-3 y los receptores Trail; estas poseen una región con abundante Cys en sus dominios extracelulares, tanto el Fas y TNFR poseen una región homóloga en sus dominios intracelulares denominada DD (Death Domain) el cuál es necesario para la transducción del suicidio celular.<sup>(74)</sup>

La unión del Fas a su ligando produce tres eventos importantes entre ellos la activación de las caspasas, esta ruta de activación se inicia con la unión del DR de la superficie celular con sus ligandos específicos y favoreciendo la conformación del FADD (Fas Associating Protein with Death Domain ) el cual en su extremo posee el DED (Death Efector Domain) el cual es útil en la reclutación de las pro-caspasas iniciales de la cascada como son la pro-caspasa 8 y 10; luego de un procesamiento la pro-caspasa 8 genera dos fragmentos catalíticos uno de los cuales conforma la caspasa 8 activa.<sup>(74)(75)</sup>

La caspasa-9 es iniciadora y la maquinaria responsable de su activación es la formación del apoptosoma; este apoptosoma comprende a 7 moléculas de Apaf-1 y a la proteasa caspasa-9, el ensamble del apoptosoma requiere de citocromo c y nucleótidos, al tener una estructura similar el apoptosoma captura a la pro-caspasa

9 y la activa, la cual al estar asociada exhibe su mayor actividad catalítica; el apoptosoma también requiere la presencia de ATP para su formación.<sup>(75)</sup>

### **9.2.2. ACTIVACION DE LAS CASPASAS A TRAVES DE LA MITOCONDRIA.**

Esto se da debido a que existen tres proteínas capaces de activar a las caspasa 3; las cuales son: citocromo C, Apaf-1 y la procaspasa-9.

Mientras se da esta conformación del apoptosoma, la mitocondria libera proteínas que actúan específicamente a nivel del núcleo para inducir la degradación del ADN y el fraccionamiento del ADN nucleosomal, entre las proteínas liberadas se encuentra el AIF (Factor Inductor de Apoptosis) el cual induce la fragmentación del ADN de alto peso molecular y la condensación de la cromatina a su vez también desencadena la despolarización de la membrana (traslado de fosfatidilserina) todo este proceso inicial es realizado de manera independiente a la presencia de las caspasas.<sup>(76)</sup>

Luego de que la estructura es afectada por la despolarización de la membrana y las caspasas ya están activas estas proceden a degradar la mayoría de los componentes (microfilamentos de actina, proteínas microtubulares, tubulina, etc) presentes en la membrana de las células, todo este proteólisis de las membranas que conforman el citoesqueleto es evidenciado en el redondeamiento y retracción de la célula, el cual es observado a nivel microscópico en las primeras etapas del proceso apoptótico al igual que la presencia de citoplasma celular en áreas en las cuales no debería hallarse.<sup>(75)(76)</sup>

Posteriormente se desarrolla la fragmentación nuclear la cual es producto de la desintegración de la lámina nuclear y colapso de la envoltura nuclear, la primera como producto de la acción de las caspasas y al colapso de la envoltura por desgarramiento debido a la ausencia de actina, todo este proceso genera que las células en proceso de apoptosis se retraigan de células vecinas esto generado por las caspasas que causan ruptura en los sitios de adhesión local así como en los

complejos de adhesión célula-célula facilitando así la remoción de las células por acción de los fagocitos.<sup>(76)</sup>

Por otro lado, las caspasas cumplen una función de interruptores en el proceso de activación de la muerte celular, actúan sobre las proteínas involucradas en los procesos básicos necesarios para la sobrevivencia de la célula (transcripción, transducción, degradación de ARNr) también realiza la hidrolización de ADN genómico al igual que causa la fragmentación de la red de Golgi, Retículo endoplasmático (RE) y la mitocondria. La fragmentación del ADN se da como resultado de la degradación de la cromatina lo cual elimina cualquier posibilidad de futura división celular a la vez facilita la acción de eliminación por parte de los fagocitos, durante la apoptosis el Inhibidor de Endonucleasas Activadas por Caspasas (ICAD) es degradado por las caspasas lo cual favorece la liberación de Endonucleasas Activadas por Caspasas (CAD) y posterior fraccionamiento de la cromatina, la caspasas que actúan principalmente en este proceso es la caspasa-3. El aparato de Golgi es fragmentado por degradación mediada por la caspasa-3 y el RE es desensamblado y redistribuido a las ampollas apoptóticas para formar una membrana que rodea a la cromatina.<sup>(77)</sup>

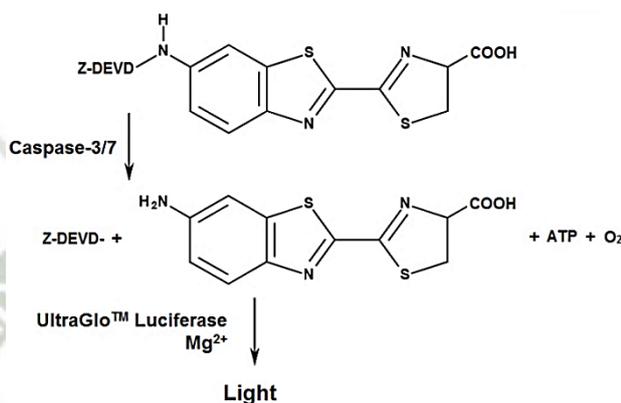
Finalmente la parte final se lleva a cabo con la degradación completa de la célula mediada por los fagocitos, esto permite una eliminación de células con membrana intacta y evita la liberación de otros constituyentes al medio que rodea a la célula, existen diversas moléculas y sustancias que detectan las señales de engullimiento de estas células en fase terminal del proceso de apoptosis, estas son consumidas por células como los macrófagos, células dendríticas u otras células que posean capacidad fagocítica, al igual que el proceso existen muchos mediadores y receptores que intervienen en este proceso.<sup>(77)</sup>

### **9.2.3. ENSAYO DE CASPASAS.**

El Kit de ensayo Caspase –Glo® 3/7 es un ensayo luminiscente homogéneo el cual mide la actividad de las caspasas 3/7, este ensayo contiene el sustrato DEVD (Asp-Glu-Val-Asp)-caspasa aminoluciferin el cual es un pro-luminiscente y

finalmente una luciferasa termoestable la cual es un reactivo altamente optimizado para la caspasa 3 y 7.<sup>(78)</sup>

Posterior a la lisis celular se da la escisión del sustrato de caspasa, lo cual causa la liberación del aminoluciferin libre el cual es consumida por la luciferasa, y esto genera una reacción luminiscente. La señal producida es proporcional a la actividad de las caspasas 3/7 (**Figura N°12**).



**Figura N°12:** Proceso de escisión Caspasa-3/7 del sustrato luminógeno que posee la secuencia DEVD

### 9.3.LACTATO DESHIDROGENASA.

La Lactato Deshidrogenasa (LDH) es una enzima citoplasmática que se halla presente en las células del organismo hallándose en mayor concentración en ciertos órganos (corazón, riñón, hígado, músculo esquelético y eritrocitos) pero solo se detectan pequeñas cantidades de ella a nivel sanguíneo, su presencia en el plasma se da como consecuencia del proceso de destrucción celular.<sup>(79)</sup>

Se encuentra en la categoría de las oxido-reductasas; cataliza la reacción en la cual el piruvato es reducido a lactato como consecuencia de la oxidación de NADH a NAD<sup>+</sup>; a nivel anaeróbico reduce el piruvato (glicolisis) para generar NAD<sup>+</sup> el cual en presencia de glucosa limita la vía glicolítica.<sup>(80)</sup>

Los incrementos en la cantidad de LDH se determinan como LDH total (no específica) o como isoenzimas de LDH (específicas):<sup>(80)</sup>

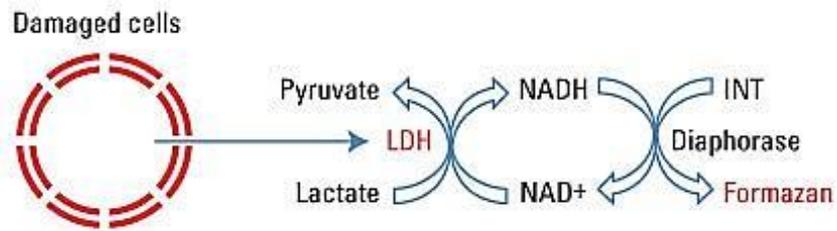
- **LDH-1:** corazón, músculos y eritrocitos
- **LDH-2:** SER y leucocitos
- **LDH-3:** pulmones
- **LDH-4:** riñones, placenta y páncreas
- **LDH-5:** hígado y músculo esquelético

Por lo tanto sus niveles pueden incrementarse en diversas patologías, entre las más comunes: Infarto agudo al miocardio, Miocarditis aguda, Fiebre reumática, Hepatitis aguda, Cáncer, Infarto cortical renal, Hipotiroidismo, Pancreatitis aguda, Obstrucción intestinal.

### 9.3.1. ENSAYO LDH.

El Kit de ensayo LDH Cytotoxicity™ utiliza un método colorimétrico simple para la cuantificación de la citotoxicidad celular a cualquier tipo de célula producida por algún tratamiento ya sea físico o químico.<sup>(81)</sup>

El LDH se encuentra presente en la mayoría de líneas celulares, el daño en la membrana celular se da como consecuencia de la salida de la enzima LDH al medio de cultivo celular, el LDH extracelular es cuantificable a través de una reacción enzimática acoplada en la cual el LDH cataliza la conversión de lactato a piruvato implicando en el proceso la reducción de NAD<sup>+</sup> a NADH; posteriormente la diaforasa utiliza el NADH producido para reducir el INT (sal de tetrazolio) a formazan (color rojo) el cual se puede medir a 490 nm. (**Figura N°13**)



**Figura N°13:** Mecanismo del LDH de ensayo en la medición de citotoxicidad

La cantidad e intensidad de color del formazán es proporcional a la cantidad de LDH en el medio e indica el grado de citotoxicidad sufrida por la línea celular en estudio.



## **CAPITULO II**

### **MATERIALES Y METODOS**

#### **1. LUGAR DE LA INVESTIGACION.**

En el presente trabajo, la obtención del extracto se realizó en las instalaciones de los Laboratorios de Investigación y Química Orgánica del Massachusetts College of Pharmacy and Health Science University (MCPHS-U). Los ensayos para la determinación del efecto citotóxico del extracto se realizó en el Laboratorio de Investigación del MCPHS-U; ambos ubicados en el campus del Massachusetts College of Pharmacy and Health Science University en la Ciudad de Boston, Estados Unidos.

#### **2. TIPO DE INVESTIGACION.**

La presente investigación fue de tipo experimental, prospectivo.

#### **3. MATERIALES.**

##### **3.1.UNIDADES DE ESTUDIO.**

### 3.1.1. UNIDAD VEGETAL.

Para la realización del presente trabajo se utilizaron hojas de *Annona muricata* L. (Guanábana), las cuales fueron recolectadas en Costa Rica, y posteriormente desecadas en un lugar seco y seguro a cargo del Laboratorio de Investigación, esto ubicado en el MCPHS-U (**Figura N°14**).



**Figura N°14:** Hojas secas de *Annona muricata* L.

### 3.1.2. UNIDAD BIOLÓGICA *IN VITRO*.

Como unidad *in vitro* se utilizaron dos líneas celulares; la primera de Cáncer de Páncreas (ASPC-1) la cual se hallaba en su 3<sup>er</sup> pasaje, la cual originalmente fue adquirida de la casa ATCC y requiere del medio de cultivo base Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (2mM L-glutamina, HEPES 10Mm, piruvato de sodio 1mM, 4500mg/L glucosa y 1500mg/L bicarbonato de sodio) de la casa ATCC.

La segunda línea fue de Cáncer de Próstata (PC-3) que se encontraba en su 16<sup>vo</sup> pasaje, adquirida inicialmente de la casa ATCC y requiere el medio de cultivo Kainghn's Modification of Ham's F12 (F-12K) (2Mm L-glutamina y 1500mM bicarbonato de sodio) de la casa ATCC.

Ambos medios fueron enriquecidos con Suero Fetal Bovino (FBS) al 10% de la casa ATCC, y para la mantención de un medio estéril se les adiciono solución de penicilina-estreptomicina (10000unidades/ml de penicilina y 10000 $\mu$ g/mL de estreptomicina) de la casa Hyclone; y para la obtención de las suspensiones celulares se usó la solución Tripsina-EDFTA (0.25%) de la casa ATCC.

#### **4. MATERIAL DE LABORATORIO.**

##### **4.1.MATERIAL DE VIDRIO.**

- Matraz Erlenmeyer 1000mL y 2500mL.
- Beacker 1000mL
- Probetas de 100 ml, 250mL, 500mL
- Vasos de Precipitado de 100mL, 250mL, 500mL y 1000mL
- Pipeta de 1mL, 5mL, 10mL, 20mL y 50mL.
- Frascos de vidrio de 10mL y 20mL
- Fiola de 5mL y 10mL
- Baguetas
- Balón para rota vapor de 5mL, 50mL, 500mL y 1000mL
- Pera de decantación

##### **4.2.EQUIPOS.**

- Maquina moladora de maíz Corona
- Balanza Shimadzu serie UX/UW
- Balanza Analítica Boeco-Al
- Equipo rota vapor BÜCHI R-215
- Sonicador VWR® SymphonyTM
- Lector de Microplacas multi-modal Synergy TM HTX
- Celulometro Nexcelom Cellometer® Auto T4
- Equipo de Baño María VWR

- Equipo de Baño digital para descongelar reactivos LabARMOR Bead Baths
- Ultracongelador Vertical (-80°C) REVCO
- Estufa de CO<sub>2</sub> con camisa de aire para esterilización Symphony VWR
- Centrifuga Dynac III
- Microscopio OLYMPUS® CKX31
- Vortex Genie 2 Fisher Brand®
- Refrigeradora (-20°C) Thermo Scientific
- Cabina de bioseguridad Clase II tipo A2 - ESCO

#### 4.3. REACTIVOS.

- Agua ultrapura
- Alcohol 70%
- Lejía
- Metanol 90%
- Dicloro Metano UP
- Acetato de Etilo UP
- Reactivo de Conteo Celular CellTiter96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay – Promega.
- Dimetil Sulfoxido (DMSO)
- Sal de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2-H-tetrazolio o MTS
- Kit de Ensayo de Citotoxicidad LDH Thermo Scientific
- Kit de Ensayo de Caspasas 3/7 Thermo Scientific
- Medio RPMI-1640-ATCC
- Medio F-12K - ATCC
- Buffer Fosfato Salino ( PBS-1X)- ATCC
- Solución Antibiótica de Penicilina y Estreptomina 1% - HyClone
- Tripsina-EDTA- ATCC

#### **4.4. OTROS.**

- Micro placas de 96 pocillos estériles- Thermo Scientific
- Guantes de Látex
- Rotulador tipo indeleble
- Caja contenedora
- Papel para-film

#### **5. METODOS.**

##### **5.1. TRATAMIENTO DE LA DROGA.**

###### **5.1.1. RECOLECCION Y DESECACION.**

La recolección fue realizada por una estudiante de Post-Grado del MCPHS-U en Costa Rica; la desecación se realizó en el Laboratorio de Investigación del MCPHS-U, Boston, Estados Unidos.

###### **5.1.2. TRATAMIENTO DE LA DROGA.**

Se tomaron 100.05g de hojas previamente secadas y molidas utilizando la maquina moladora de maíz Corona, y posteriormente se colocó en un Erlenmeyer de 2500mL.

##### **5.2. OBTENCION DEL EXTRACTO.**

###### **5.2.1. EXTRACTO.**

Es una mezcla compleja y concentrada de droga animal o vegetal, la cual es obtenida por procesos físicos, químicos y/o microbiológicos; entre los químicos se encuentran los que son obtenidos por concentración parcial o total de los líquidos utilizados para la extracción. En la actualidad se hablan de 4 tipos:

**Extractos fluidos:** La sustancia disolvente es evaporada utilizando el rotavapor, esto se hace hasta lograr una concentración de principio activo (PA) en la droga original. Son de consistencia líquida y por lo general el extracto es obtenido por maceración o percolación, son de fácil manipulación, pero su principal desventaja es que se alteran fácilmente al contacto con la luz y el medio ambiente.

**Extractos blandos:** Este tipo de extractos la concentración de PA es por encima de la concentración de la droga original, son de consistencia semisólida y son poco utilizadas dado que su manipulación así como su estabilidad son complicadas.

**Extractos secos:** Se realiza con una evaporación total del solvente utilizado es por ello que su forma es de polvo y la concentración de PA es superior a la droga original, por su forma son de fácil manipulación así como bastante estables.

**Crio-extractos:** Son obtenidos de la droga fresca congelada, en la cual los PA son obtenidos por tratamiento con nitrógeno líquido y posteriormente se agrega un solvente por lo general alcohol etílico; su principal desventaja es que son altamente costosos pero son muy útiles en el caso que se desee una extracción de enzimas y/o proteínas de alguna especie.

### 5.2.2. METODO DE CONCENTRACION.

#### PROCEDIMIENTO:

Se colocaron los 100.05g de hojas previamente molidas a un Erlenmeyer de 2500mL, se procedió a humedecerla con 1500mL de metanol 90%, se utilizó una bagueta para que toda la muestra estuviera humedecida. Se observó que la cantidad agregada de metanol cubría adecuadamente a la totalidad de la muestra, se cubrió y rotulo adecuadamente el Erlenmeyer utilizando papel para-film y papel indeleble respectivamente y finalmente se dejó macerando por 24 horas.

Transcurridas las 24 horas se procedió a realizar una filtración al vacío quedando como residuo en el embudo las hojas molidas utilizadas en el proceso de maceración (**Figura N°15**), el extracto obtenido se colocó en otro Erlenmeyer

(Erlenmeyer 2) de 2500mL; al residuo del extracto anterior se le agrego otros 1000mL de metanol 90 % y se dejó nuevamente por otras 24 horas.



**Figura N°15:** Residuo obtenido posterior a la filtración al vacío

Se realizó un filtrado al vacío al segundo extracto y se colocó en el Erlenmeyer 2 junto al filtrado anterior (**Figura N°16**), se procedió a colocar el extracto en un balón de 500mL previamente pesado (267.15g), en el cual se colocaron 300mL del extracto y se procedió a concentrar el extracto utilizando el rota vapor a 55° C y 200 Torr de presión, cada 15 minutos se retiraba el balón del rota vapor y se agregaban 300mL del extracto hasta concentrar los 2500mL totales del extracto (**Figura N°17**), finalmente se dejó enfriar el balón y se pesó para así realizar el cálculo de rendimiento.



**Figura N°16:** Total de primer extracto recolectado



**Figura N°17:** Concentración del Extracto

Se extrajo una fracción (2.42g) de este concentrado metanólico en un frasco de vidrio el cual se rotulo como Extracto Metanólico Crudo; y se colocó en la caja contenedora de extractos y se almaceno en un lugar fresco y seco para su posterior utilización en los análisis de Viabilidad Celular.

### 5.3. PREPARACION DE EXTRACTOS.

A partir del extracto inicial se prepararon 4 extractos diferentes utilizando solventes de diversas polaridades.

El balón que contenía el extracto metanólico crudo previamente concentrado se re disolvió con 150mL de agua con la ayuda del equipo de ultrasonicación (**Figura N°18**), luego de obtener una solución en una pera de decantación se colocó 150mL de diclorometano y se agregó los 150mL de disolución del extracto crudo, se mezcló enérgicamente hasta la obtención de dos fases, la fase inferior de un color verdoso era la correspondiente al diclorometano, esta fue extraída de la pera de decantación y se colocó en un Erlenmeyer de 500mL el cual se rotulo (E. Diclorometano); dicho procedimiento fue realizado 3 veces consecutivas utilizando la misma cantidad de diclorometano en las 3 operaciones (**Figura N°19**).



**Figura N°18:** Disolución de Primer extracto



**Figura N°19:** Extracción utilizando Diclorometano

Al líquido residual en la pera de decantación se le agrego 150mL de acetato de etilo y se realizó en mismo procedimiento que con el diclorometano, en este caso se extrajo la fase superior de color amarillo correspondiente al acetato de etilo, y se colocó en un Erlenmeyer de 500mL, se rotulo (E. Acetato de Etilo). Dicho procedimiento fue realizado 3 veces consecutivas utilizando la misma cantidad de acetato de etilo en las 3 operaciones (**Figura N°20**).



**Figura N°20:** Extracto con Acetato de Etilo

Como ultima extracción el líquido residual aun contenido en la pera de decantación; se le agrego 150mL de n-butanol y se realizó el mismo procedimiento anteriormente descrito, se extrajo la fase superior de color amarillo pálido correspondiente al n-butanol en un Erlenmeyer de 250mL y se rotulo (E.

n-But). Dicho procedimiento fue realizado 3 veces consecutivas utilizando la misma cantidad de acetato de etilo en las 3 operaciones (**Figura N°21**).



**Figura N°21:** Extracción con n-Butanol

Finalmente el residuo final de la extracción que contenía agua se colecto en un Erlenmeyer de 250mL y se rotulo (E. H<sub>2</sub>O), este último extracto era de color amarillo tenue.

Todos los extractos ya colocados en los Erlenmeyer fueron adecuadamente cubiertos con papel para-film para evitar la evaporación del solvente, así como la posible contaminación.

La concentración de los extractos se realizó utilizando el rotavapor BUCHI , se colocaron los extractos en el balones para rota vapor previamente pesados y se realizaba la concentración del extracto, las condiciones para cada extracto variaban de acuerdo al solvente como se muestra en la **Tabla 1**, luego se dejaron enfriar los balones para pesarlos nuevamente y poder realizar los cálculos correspondientes al rendimiento; posteriormente a ello se recolecto la mayor cantidad de extracto concentrado de los balones utilizando espátulas de metal y colocando lo obtenido en frascos de vidrio debidamente rotulados para cada extracto. En el caso del extracto acuoso se evaporo el agua utilizando el calor en un equipo de Baño María a 98°C.

**Tabla 1:** Condiciones para eliminación de los solventes utilizados

SOLVENTE	PRESION (Toor)	TEMPERATURA (° C)
Diclorometano	400	39
Acetato de Etilo	250	77
N-Butanol	350	117

*Fuente: Elaboración propia*

#### 5.4. PREPACION DE DMSO 1% (CONTROL NEGATIVO).

Se prepararon 20mL de solución de DMSO 1%:

$$\begin{array}{r} 20 \text{ mL} \text{ -----} 100 \% \\ X \text{ mL} \text{ -----} 1 \% \end{array}$$

$$X = 0.2 \text{ ml de DMSO}$$

Se tomó 0.2mL de DMSO y se agregó 19.8mL de agua destilada pura, se colocó en un frasco de vidrio rotulado (DMSO 1%) y se conservó en un lugar fresco y seco, conjuntamente con los frascos que contienen los extractos (caja contenedora).

#### 5.5. PREPARACION DE SOLUCIONES STOCK DE LOS EXTRACTOS.

Para la preparación de las soluciones Stock de los diferentes extractos se usó como requerimiento que la concentración final de la solución stock debería ser de 2000µg/mL dado que en trabajos referenciales anteriores se observa que esta concentración es utilizada.

Se procedió a tomar una cantidad determinada del extracto (mg) y se calculó la cantidad de DMSO y agua destilada en la cual se disolvió para alcanzar la concentración deseada, el cálculo se realizó como se muestra a continuación:

- **Metanol:**

$$\begin{aligned} 41400 \mu\text{g} & \text{-----} X \\ 2000 \mu\text{g} & \text{-----} 1\text{mL} \\ 20.7\text{mL} & = 0.207\text{mL DMSO (1\%)} \\ & 20.493\text{mL Agua destilada (90\%)} \end{aligned}$$

- **Diclorometano:**

$$\begin{aligned} 41900 \mu\text{g} & \text{-----} X \\ 2000 \mu\text{g} & \text{-----} 1\text{mL} \\ 20.95\text{mL} & = 0.2095\text{mL DMSO (1\%)} \\ & 20.691\text{mL Agua destilada (90\%)} \end{aligned}$$

- **Acetato del etilo:**

$$\begin{aligned} 21600 \mu\text{g} & \text{-----} X \\ 2000 \mu\text{g} & \text{-----} 1\text{mL} \\ 10.18\text{mL} & = 0.1080\text{mL DMSO (1\%)} \\ & 10.692\text{mL Agua destilada (90\%)} \end{aligned}$$

- **N-Butanol:**

$$\begin{aligned} 43300 \mu\text{g} & \text{-----} X \\ 2000 \mu\text{g} & \text{-----} 1\text{mL} \\ 20.65\text{mL} & = 0.2165\text{mL DMSO (1\%)} \\ & 21.485\text{mL Agua destilada (90\%)} \end{aligned}$$

- **Agua:**

$$\begin{aligned}
 44500 \mu\text{g} & \text{-----} X \\
 2000 \mu\text{g} & \text{-----} 1\text{mL} \\
 20.30\text{mL} & = 0.2230\text{mL DMSO (1\%)} \\
 & 22.077\text{mL Agua destilada (90\%)}
 \end{aligned}$$

Estas diluciones de cada extracto se colocaron en envases rotulados y se conservaron en un lugar fresco y seco para su posterior utilización en la preparación de las soluciones de diferentes concentraciones de cada extracto.

### 5.6. PREPARACION DE LAS DILUCIONES A DIFERENTES CONCENTRACIONES A PARTIR DE LA SOLUCION STOCK.

Se usaron 5 concentraciones finales (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) diferentes, preparadas a partir de cada solución stock para cada tipo de extracto, inicialmente se calculó el volumen que se debería tomar de la solución stock para la dilución cuyo volumen final sería de 10mL, el cual se completó con DMSO 1%.

- **1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ :**

$$\begin{aligned}
 C_1 \times V_1 & = C_2 \times V_2 \\
 2000 \mu\text{g} \times V_1 & = 10 \mu\text{g} \times 10 \text{ mL} \\
 V_1 & = 0.05\text{mL sol. Stock} + 9.95\text{mL DMSO 1\%}
 \end{aligned}$$

- **3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ :**

$$\begin{aligned}
 C_1 \times V_1 & = C_2 \times V_2 \\
 2000 \mu\text{g} \times V_1 & = 30 \mu\text{g} \times 10 \text{ mL} \\
 V_1 & = 0.15\text{mL sol. Stock} + 9.85\text{mL DMSO 1\%}
 \end{aligned}$$

- **10µg/mL:**

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$2000 \mu\text{g} \times V_1 = 100 \mu\text{g} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0.50\text{mL sol. Stock} + 9.50\text{mL DMSO } 1\%$$

- **30µg/mL:**

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$2000\mu\text{g} \times V_1 = 300\mu\text{g} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 1.5\text{mL sol. Stock} + 8.5\text{mL DMSO } 1\%$$

- **100µg/mL:**

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$2000\mu\text{g} \times V_1 = 1000\mu\text{g} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 5\text{mL sol. Stock} + 5\text{mL DMSO } 1\%$$

Estas diluciones se colocaron en envases de vidrio debidamente rotulados y colocados en la caja contenedora (**Figura N°22**) en un lugar fresco y seco, para su posterior utilización en los ensayos de viabilidad celular, y análisis de citotoxicidad (caspasas y ldh).



**Figura N°22:** Caja contenedora de soluciones para el estudio

## 5.7. PREPARACION DE MEDIOS.

Los medios contienen solo los nutrientes necesarios para las células según sus tipos, se utilizaron dos tipos de medios: F-12K (**Figura N°23**) y RPMI-1640 (**Figura N°24**) para las células PC3 Y ASPC1 respectivamente; para el desarrollo de los pasajes celulares y cambios de medio.



**Figura N°23:** Medio F-12K para línea celular PC-3

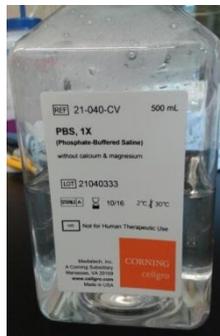


**Figura N°24:** Medio RPMI-1640 para línea celular ASPC-1

### 5.7.1. MEDIO COMPLETO.

La preparación se realiza en una cabina de flujo laminar debidamente esterilizada a la cual se ingresó todo el material y los reactivos a utilizar correctamente esterilizados, el volumen del medio es de 500mL, se removi6 55mL del medio y se agreg6 50mL de buffer fosfato salino (FBS) (**Figura N°25**) y 5mL de antibiótico (Penicilina + estreptomycin) ; de tal manera que el FBS se halla en un

10% y la Estreptomicina en un 1%, las cuales son las concentraciones óptimas para el desarrollo y crecimiento adecuado para las células.



**Figura N°25:** Buffer fosfato salino (FBS)

El medio se rotulo adecuadamente indicando que era medio completo y la fecha que se preparó, se guardó en la refrigeradora para su conservación adecuada.

#### **5.7.2. MEDIO BLANCO.**

El medio blanco era el medio al cual no se le agrega ningún componente adicional, es decir tan solo se rotulo y se colocó la fecha, dado que este medio se utiliza paralelamente al medio completo, también se guardó a refrigeración para su conservación.

#### **5.8.PASAGE CELULAR.**

Las células PC-3 y ASPC-1 fueron entregadas en su 3<sup>er</sup> y 16<sup>vo</sup> pasage respectivamente, para que estas células se mantuvieran vivas se realiza los pasages de células lo cual implica que también genera una mayor cantidad de células para realizar los ensayos posteriores, los pasages se realizaron cuando se observaba al microscopio abundancia de células en el flask; y se realizaba cambio de medio cada 3 días aproximadamente para mantener los nutrientes necesarios para las células.

Aproximadamente 30 minutos antes de la realización de los pasajes se colocó tanto el medio F-12K para las células PC-3 y el medio RPMI-1640 para las células ASPC-1 y la tripsina en baño maría a 37°C para su utilización en los pasajes o cambios de medio.

Las células entregadas estaban contenidas en un flask de 160mL como se muestra en la **Figura N°26**; los pasajes se realizaron en las cabinas de flujo laminar las cuales fueron esterilizadas con alcohol 98% y se trabajó con guantes de látex descartables también esterilizados con alcohol 98%, todo el material que ingreso a la cabina fue debidamente esterilizado; se procedió a eliminar el medio anterior y agregar 3mL de tripsina para cebar y eliminar los residuos de medio y células que ya hubieran muerto, se descarta esta tripsina a un vaso precipitado el cual contiene alcohol 98% ; se volvió a agregar 3mL de tripsina al flask y se llevó a incubación por 15 minutos a la estufa a 37°C, se observó cada 5 minutos y se agito levemente, transcurridos los 15 minutos se retiró de la estufa y se agregó 8mL del medio blanco correspondiente a la célula y se re suspendió con la ayuda de la pipeta utilizada.

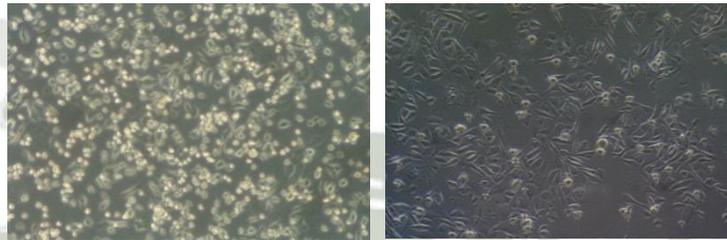


**Figura N°26:** Flasks conteniendo células

Se colecto la re suspensión en un tubo falcón de 45mL y se centrifugo a 800 rpm por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se colecto el pellet y se le agrego 10mL de medio blanco y se re suspendió el pellet suavemente con al pipeta automática utilizada (Suspensión Celular), se agregó 3mL de suspensión celular en un flask de 160mL y se agregó 12mL de medio completo. En algunos casos se

utilizaron flask de 40mL en los cuales la cantidad de suspensión celular es de 3mL y se agregó 6mL de medio completo.

Para finalizar el procedimiento se rotulaba los flask con el tipo de célula, fecha y número de pasaje respectivamente; se observaba al microscopio para poder visualizar la presencia de las células en el medio (**Figura N°27**) .y se lleva a la estufa a 37° C respectivamente para su desarrollo adecuado.



**Figura N°27:** Células ASPC-1 y PC-3 al microscopio (10X)

Cuando se realizó el cambio de medio a los 3 días, fue llevado a cabo con las mismas características de esterilidad; para este caso se realiza la remoción y descarte del medio anterior y se agregaron 15mL de medio completo cuando era flask grande y 9mL de medio completo en flask pequeño; y se coloca nuevamente el flask en la estufa a 37°C.

## **5.9. EXCLUSION CELULAR.**

### **5.9.1. OBTENCION DE LA SUSPENSION CELULAR.**

Posteriormente a los tres días de incubación, se procedió a llevar un flask conteniendo las células a la cabina de flujo laminar la cual previamente fue esterilizada y desinfectada al igual que todos los materiales y reactivos que se utilizaron; dentro de esta cabina se procedió a eliminar el medio del flask en un recipiente conteniendo lejía; para así evitar una posible contaminación biológica; las células residuales se hallaban adheridas a la pared del flask; se procedió a lavar con 4mL de tripsina para eliminar los residuos del medio los cuales contienen el

inhibidor de tripsina y se descartó; luego se agregaron 8mL de tripsina nuevamente para separar las células adheridas al flask, dado que la tripsina tienen acción de peptidasa. Se agitó levemente y se incubó el flask a 37° C con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire por 15 minutos, se agitó suavemente en intervalos de 5 minutos.

Luego, se transfirió el contenido a un tubo falcón de 50mL y se centrifugó a 1000 rpm por 5 minutos; posterior a ello se descartó el sobrenadante y se procedió a resuspender las células utilizando 30mL de medio enriquecido con FBS. Se tomaron 15mL de la suspensión obtenida en un flask nuevo para realizar un pasaje posterior.

### 5.9.2. EXCLUSIÓN CELULAR.

De la suspensión celular obtenida anteriormente se tomaron 20µL y se colocaron en una cámara de recuento celular desechable, la suspensión celular se colocó de tal manera que cubriera completamente la cámara, esta cámara fue colocada en el Cellometer Auto T4 (**Figura N°28**), el cual es un contador automático de células.



**Figura N°28:** Cellometer Auto T4

Se procedió a programar el software con los parámetros correspondientes a cada tipo celular; se indicó el tamaño de célula el cual fue de Media Size Cells para el caso de las PC3 y New Type Cells para las ASPC1; y el tipo de dilución utilizada que para nuestros dos tipos de células fue de 1/1; el equipo como resultado de lectura indico el número de células viables/mL de suspensión y el porcentaje de células viables, como requisito fundamental este último debe ser mayor al 90%; con estos resultados de la lectura se realizaron los cálculos posteriores para los diferentes ensayos que se realizaron.

## **5.10. DISEÑO EXPERIMENTAL.**

### **5.10.1. PRUEBA DE VIABILIDAD CELULAR (MTS).**

La prueba de viabilidad celular se realizó en la cabina de flujo laminar en la cual se ingresó todo el material y reactivos utilizados debidamente esterilizados, este ensayo fue utilizada para la determinación de:

### **5.10.2. DETERMINACION DEL MEJOR EXTRACTO.**

Se realizó utilizando las soluciones stock de los extractos, se preparó una suspensión celular y se procedió a determinar el número de células viables.

Para el desarrollo de MTS usaron plato de 96 celdas, el cual posee una capacidad de hasta 220 $\mu$ L por celda y el número óptimo de células para desarrollar la prueba es de 20000 células/celda; se realizó el cálculo de los “ $\mu$ L” de suspensión celular que se agregó a cada celda además se le adiciono medio completo y 20 $\mu$ L de extracto como tratamiento.

- **PC3:**

Conteo celular: 6.54 x10<sup>5</sup> cel/mL

Viabilidad celular: 95%

$$2000 \frac{\text{cel}}{\text{celda}} \times \frac{1 \text{ mL}}{6.54 \times 10^5 \text{ cel}} = 30.58 \mu\text{L suspension}$$

30,58  $\mu\text{L}$  suspension + 149.42 $\mu\text{L}$  medio blanco  
+ 20  $\mu\text{L}$  tratamiento

200 $\mu\text{L}$  ( volumen total celda)

- **ASPC1:**

Conteo celular: 4.82 x10<sup>5</sup> cel/mL

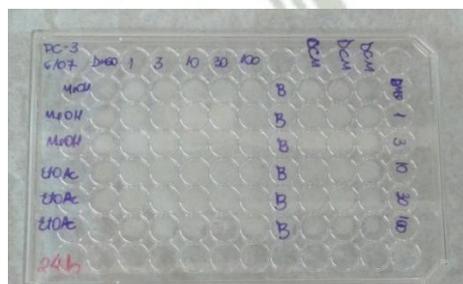
Viabilidad celular: 98%

$$2000 \frac{\text{cel}}{\text{celda}} \times \frac{1 \text{ mL}}{4.82 \times 10^5 \text{ cel}} = 42.00 \mu\text{L suspension}$$

42,00  $\mu\text{L}$  suspension + 138,00 $\mu\text{L}$  medio blanco  
+ 20 $\mu\text{L}$  tratamiento

200 $\mu\text{L}$  ( volumen total celda)

Se dividió el plato de 96 celdas como se muestra en la **Figura N°29**, se rotulo cada plato con el tipo de célula, el nombre del extracto a analizar, la fecha y hora, la ubicación del tipo de extracto, el blanco (180 $\mu\text{L}$  medio blanco + 20 $\mu\text{L}$  DMSO 1%) y un control negativo (180 $\mu\text{L}$  suspensión celular + 20 $\mu\text{L}$  DMSO 1%).



**Figura N°29:** División de plato de 96 celdas para la determinación del mejor extracto

Primeramente se colocó el medio completo en las celdas necesarias, luego se añadió la suspensión celular en las cantidades calculadas para cada tipo celular y se dejó en incubación por 24 horas en la estufa a 37°C; transcurridas las 24 horas se procedió a remover cuidadosamente el medio completo con ayuda de una pipeta diferente para cada línea de tratamiento, se evitó la remoción de las células adheridas al fondo de la celda, luego de la remoción de medio se agregó 180µL de medio blanco y 20µL del extracto correspondiente a las celdas de tratamiento; en el caso del blanco y control negativo los 20µL de DMSO 1%, en los bordes externos del área de plato utilizada se colocó 200µL de medio blanco para evitar que el calor de la estufa evaporara el área de estudio, se dejó en reposo por 24 horas a 37°C; se retiró el plato de la estufa transcurrido el tiempo necesario y se agregó 10µL de MTS a todos los pocillos, el MTS fue previamente temperado a 37°C en baño maría, luego de agregar el MTS se dejó incubar por 3 horas a 37°C, luego se retiró el plato y se llevó a enfriar hasta temperatura ambiente en un ambiente adecuado, se procedió a programar el Software Gen 5 del equipo Lector de Microplacas multi-modal Synergy TM HTX, se programó: el tipo de plato (96 well plate), modo (Absorbancia) y longitud de onda (490 nm).

Con los datos obtenidos se logró determinar cuál extracto era el que producía un mayor efecto en la disminución en el número de células vivas y un decrecimiento en el porcentaje de viabilidad celular.

### **5.10.3. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION Y TIEMPO DE EXPOSICIÓN AL TRATAMIENTO ÓPTIMO.**

Luego de determinar el extracto con mayor acción citotóxica se procedido a desarrollar un nuevo MTS teniendo como finalidad poder determinar cuál era la concentración del extracto a la cual produce un mayor efecto citotóxico deseado, se procedido a obtener una nueva suspensión celular para determinar los “µL” a utilizar para obtener una concentración de 20000 cel/celda:

• **PC3:**

Conteo celular: 6.145 x10<sup>5</sup> cel/mL

Viabilidad celular: 99,1%

$$2000 \frac{\text{cel}}{\text{celda}} \times \frac{1 \text{ mL}}{6.145 \times 10^5 \text{ cel}} = 33.00 \mu\text{L suspension}$$

$$33.00 \mu\text{L suspension} + 147.00 \mu\text{L medio blanco} \\ + 20 \mu\text{L tratamiento}$$

200  $\mu\text{L}$  ( *volumen total celda* )

• **ASPC1:**

Conteo celular: 5.12 x10<sup>5</sup> cel/mL

Viabilidad celular: 95.6%

$$2000 \frac{\text{cel}}{\text{celda}} \times \frac{1 \text{ mL}}{5.120 \times 10^5 \text{ cel}} = 39.00 \mu\text{L suspension}$$

$$39.00 \mu\text{L suspension} + 141.00 \mu\text{L medio blanco} \\ + 20 \mu\text{L tratamiento}$$

200  $\mu\text{L}$  ( *volumen total celda* )

Se usaron platos de 96 celdas, los cuales se dividieron y rotularon adecuadamente cada plato con el tipo de célula, fecha y hora, la fila correspondiente a cada concentración del extracto (10  $\mu\text{g/mL}$ , 30  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$ , 300  $\mu\text{g/mL}$  y 1000  $\mu\text{g/mL}$ ), el blanco (180  $\mu\text{L}$  medio blanco + 20  $\mu\text{L}$  DMSO 1%) y control negativo (180  $\mu\text{L}$  suspensión celular + DMSO 1%) y los tiempos de 24 y 48 horas respectivamente.

Se colocó medio completo en las celdas que lo requerían, luego se agregó la suspensión celular a las celdas necesarias y se dejó en incubación a 37°C por 24 horas y se colocó medio blanco en los bordes externos.

Transcurrido el periodo de tiempo necesario se retiró de la estufa y se removió cuidadosamente el medio completo de las celdas y se agregó 180uL de medio blanco y 20µL del extracto en la concentración correspondiente a cada celda de estudio, para el blanco y el control negativo se agregó los 20µL de DMSO 1%,; y se dejó por 24 horas en incubación a 37°C.

Luego se agregó 10µL de MTS a 37°C a todos los pocillos de estudio, se dejó en incubación por 3 horas a 37°C, posteriormente se dejó enfriar el pocillo hasta llegar a temperatura ambiente y se procedido a programar el software Gen 5 con las especificaciones anteriormente indicadas. Con los datos obtenidos se pudo determinar cuál era la concentración y tiempo de exposición al tratamiento óptimo del extracto que produce el efecto deseado en las células en estudio.

## **5.11. METODO PARA LA DETERMINACION DEL EFECTO CITOTOXICO.**

Se usaron dos ensayos para determinar el posible mecanismo por el cual el extracto de hojas de *Annona muricata L.* posee un efecto en la disminución de la viabilidad celular de las células de estudio. Ambos ensayos fueron realizados en una cabina de flujo laminar esterilizada; los materiales y reactivos utilizados también fueron esterilizados y temperados antes de ser ingresados a la cabina de flujo laminar.

### **5.11.1. CASPASAS.**

Se inició con la obtención de una suspensión celular de la cual se calculó los “µL” necesarios para alcanzar la cantidad de 15000 cel/celda necesarias para este tipo

de ensayo según lo indicado en el protocolo del Kit de CaspaseGlo® 3/7 (Figura N°30).



**Figura N°30:** Kit CaspaseGlo® 3/7 Assay

• **PC3:**

Conteo celular: 4.82 x10<sup>5</sup> cel/mL

Viabilidad celular: 95%

$$15000 \frac{\text{cel}}{\text{celda}} \times \frac{1 \text{ mL}}{4.820 \times 10^5 \text{ cel}} = 31.10 \mu\text{L suspension}$$

$$31.10 \mu\text{L suspension} + 168.90 \mu\text{L medio completo}$$

$$200 \mu\text{L (volumen total celda)}$$

• **ASPC1:**

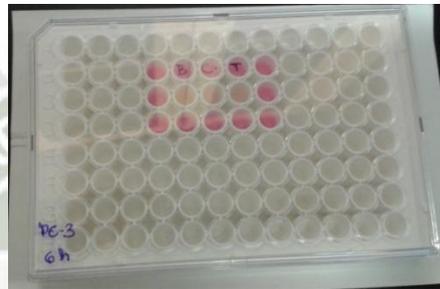
Conteo celular: 4.76 x10<sup>5</sup> cel/mL

Viabilidad celular: 97.3%

$$15000 \frac{\text{cel}}{\text{celda}} \times \frac{1 \text{ mL}}{4.760 \times 10^5 \text{ cel}} = 31.50 \mu\text{L suspension}$$

$$31.50\mu\text{L suspension} + 168.50\mu\text{L medio completo}$$
$$200\mu\text{L (volumen total celda)}$$

Se utilizaron platos de 96 celdas blancos y se realizó una división en tres columnas como se muestra en la **Figura N°31**. Se rotularon tres columnas que son el blanco, el control negativo y estudio; se prepararon 3 platos para cada tipo de células dado que el kit de ensayo así lo requiere, se rotulo cada plato con horas (3, 6, 12 horas).



**Figura N°31:** División plato de 96 celdas blanco para ensayo Caspasa

Se agregó primero el medio completo correspondiente a cada tipo de célula y en la cantidad calculada para cada una, este medio solo se agregó a las columnas de estudio y control negativo y se dejó en incubación por 24 horas a 37°C en la estufa, transcurrido este tiempo se removi6 cuidadosamente el medio completo y se agregó 90μL de medio blanco a todas las columnas (blanco, control y estudio) y se dejó en reposo por 15 minutos dentro de la cabina de flujo laminar; luego se agregó 10μL del extracto a la columna de blanco y estudio y 10μL de DMSO 1% a la de control, se dejó en incubación a 37°C.

Transcurrida la primera hora de incubación se retir6 el plato rotulado con 1h y se le agrego 100μL de la solución reaccionante a todas las columnas, y se cubri6 el plato con papel aluminio dado que el reactivo es fotosensible, y se dejó en reposo por 1 hora dentro de la cabina de flujo laminar; 20 minutos antes de concluir este periodo de tiempo se procedi6 a programar el equipo Lector de Microplacas

Multi-modal Synergy TM HTX programando el software Gen 5 con las siguientes especificaciones:

- **Type plate:** Costar 96 white opaque
- **Read:** luminescent
- **Optic Posicion:** Top
- **Gain:**135
- **Set Temperature:** 37°C

Se esperó aproximadamente 15 minutos que el equipo alcance la temperatura de 37°C para su lectura , luego de culminar la hora de reposo se procedió a realizar la lectura en el equipo; de igual manera se procedió en la lectura a los platos correspondientes a las 3, 6, 12 horas.

Con los datos obtenidos se pudo evaluar la actividad de las hojas de *Annona muricata* L. en la producción de caspasas como la posible causa de inducción de citotoxicidad en ambos tipos de líneas celulares. Para estos ensayos se utilizó en extracto con mejor efecto que es el EDCM y la concentración de 30ug/mL que presento mayor efecto deseado.

#### 5.11.2. LDH.

Al igual que ensayos previos se comenzó con la preparación de una suspensión celular para calcular los “ $\mu$ L” necesarios para tener 20000 cel/celda necesaria para este tipo de análisis, la cantidad de células fue determinado por el protocolo del kit de ensayo de LDH.

- **PC3:**

Conteo celular:  $8.03 \times 10^5$  cel/mL

Viabilidad celular: 98.9%

$$20000 \frac{\text{cel}}{\text{celda}} \times \frac{1 \text{ mL}}{8.030 \times 10^5 \text{ cel}} = 24.90 \mu\text{L suspensión}$$

$$24.90 \mu\text{L suspensión} + 175.10 \mu\text{L medio completo}$$

$$200 \mu\text{L (volumen total celda)}$$

- **ASPC1:**

Conteo celular:  $4.54 \times 10^5$  cel/mL

Viabilidad celular: 98.6%

$$20000 \frac{\text{cel}}{\text{celda}} \times \frac{1 \text{ mL}}{4.540 \times 10^5 \text{ cel}} = 44.10 \mu\text{L suspensión}$$

$$44.10 \mu\text{L suspensión} + 155.90 \mu\text{L medio completo}$$

$$200 \mu\text{L (volumen total celda)}$$

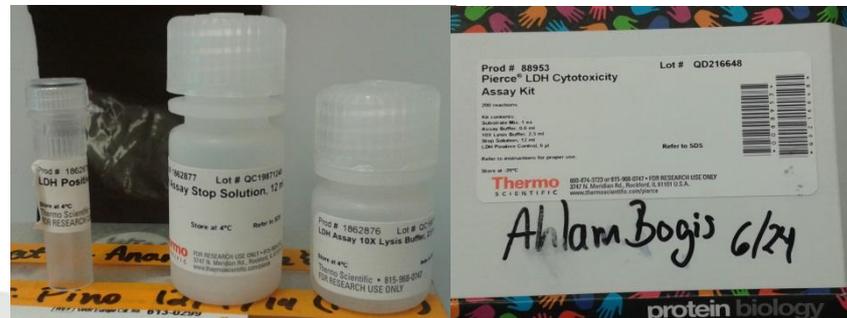
Se usaron platos de 96 celdas transparentes los cuales fueron rotulados adecuadamente.

#### 5.11.2.1. PREPARACION DEL REACTIVO DE MIXTURA.

El kit LDH Cytotoxicity Assay (**Figura N°32**) contenía el substrato de mixtura al cual se le agrego 11.4.mL de agua ultra pura en un tubo falcón de 15mL, todo esto se hizo en condiciones estériles, se realizó la mezcla agregando 0.6mL de solución buffer a temperatura ambiente, se cubrió el tubo falcón que contiene el reactivo de mixtura con papel aluminio dado que es un reactivo sensible a la luz.

Se procedió a rotular los platos utilizados; con tipo de célula, tipo de ensayo, fecha, hora y tiempo de tratamiento (48 horas); se usaron cuatro columnas: LDH espontaneo (E), LDH máximo (M) y Muestra (S); primeramente se agregó

suspensión celular a las columnas E, M y S; y la cantidad correspondiente de medio completo a cada tipo de célula, se dejó en incubación por 24 horas a 37°C.



**Figura N°32:** Kit LDH Cytotoxicity Assay

Luego de 24 horas se removió el medio completo, y se agregó 100µL de medio blanco a la columna B, 10µL de agua ultra pura a las columnas E y S; y se dejó en reposo por 48 horas correspondientemente, finalmente se agregó 10µL de buffer de lisis a la columna M y se dejó en reposo por 45 minutos a temperatura ambiente.

Se realizó la transferencia usando un plato nuevo de 96 celdas, inicialmente se tomaron 50µL de cada celda (B, E, M, S) y se transfirieron a un nuevo plato de 96 celdas; se agregaron 50µL del reactivo de mixtura y se mezclaron con ayuda de la pipeta automática, se cubrió de la luz y dejó en reposo por 30 minutos a temperatura ambiente; finalmente se agregó 50µL del reactivo stop y se mezcló enérgicamente.

Se procedió a programar el equipo lector de Micro placas Multimodal Sinergi TM Gen5, indicando: modo de medición (Absorbancia), longitudes de onda (490 y 680 nm) correspondientemente a lo indicado por el protocolo del kit de ensayo.

### 5.11.3. METODOS ESTADISTICOS PARA LA INTERPRETACION DE RESULTADOS.

Los resultados obtenidos fueron expresados como media  $\pm$  SEM, para la obtención de estos resultados se utilizó el software estadístico SigmaPlot 12.5.

### 5.11.3.1. ESTADÍSTICA PARA LA COMPARACION DE MEDIAS.

#### 5.11.3.1.1. TEST ANOVA.

Método estadístico utilizado para realizar la comparación de dos medias, es útil para realizar la comparación de varios grupos de estudio a la vez y así poder determinar si existe una diferencia significativa entre los grupo de evaluación, para lo cual se utiliza el modelo indicado a continuación en la **Tabla 2**.

**Tabla 2:** ANOVA

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	ESTADISTICO F
<i>ENTRE GRUPOS</i>	$K-1$	$\sum X_1^2 - \frac{T^2}{N}$	$C.M.E = \frac{S.C.E}{K-1}$	$F = \frac{C.M.E}{C.M.D}$
<i>DENTRO DE GRUPOS</i>	$N-K$	$\frac{\sum t_1^2}{ni} - \frac{T^2}{N}$	$C.M.D = \frac{S.C.D}{N-K}$	
<i>TOTAL</i>	$N-1$	$S.C.E + S.C.D$		

*Fuente: Elaboración propia*

#### 5.11.3.1.2. PRUEBA DE DUNNET.

Prueba utilizada cuando se busca hacer una comparación del o los grupos de estudio con un grupo control, en esta investigación se utilizó una  $p < 0.05$ ; se expresa de la siguiente manera:

$$T_i = \frac{|L_i|}{\sqrt{MCE \sum_{j=1}^J \frac{c_j^2}{n_j}}}$$

### CAPITULO III

#### RESULTADOS Y DISCUSION

El presente trabajo de investigación tuvo como principal objetivo determinar el efecto citotóxico del extracto de hojas de *Annona muricata* L. conocida comúnmente como Guanábana. También se pudo determinar el tipo de extracto más óptimo, la concentración optima del extracto así como el tiempo de tratamiento; el cual presenta propiedad citotóxica.

#### 1. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA Y OBTENCION DEL EXTRACTO.

Luego de que la droga fue desecada se procedió tal como se describió previamente en el Capítulo II, las hojas fueron previamente molidas para posteriormente ser utilizadas en la extracción por maceración.

Se obtuvieron diversos extractos siendo el primero el extracto metanólico por proceso de maceración, el cual es uno de los métodos más simples de extracción, el solvente extractante fue el metanol el cual fue seleccionado dado que es un muy buen solvente de sustancias polares además es fácilmente volatilizable y miscible, el segundo fue el extracto con diclorometano; el cual es un solvente orgánico

soluble en agua, fácilmente volátil (bajo punto de ebullición) y es ampliamente utilizado para la extracción de sustancias de las plantas, la tercera fue el extracto de acetato de etilo el cual es un solvente poco soluble con el agua, miscible con cetonas y alcoholes y tiene un bajo punto de ebullición; el cuarto fue el extracto de n-butanol el cual es un solvente orgánico soluble en agua, miscible con la mayoría de solventes orgánicos; los solventes fueron seleccionados principalmente en función a su polaridad para favorecer la extracción de los diversos componentes de la planta. El último fue el extracto acuoso el cual concentraba a todos los residuos de las extracciones previas.

El proceso de extracción se realizó como se indicó en el capítulo anterior, tras realizar toda la maceración se obtuvieron 2450mL de extracto, cuyas características se muestran en la **Tabla 3**.

**Tabla 3:** Características del extracto metanólico de hojas de *Annona muricata* L.

DISOLVENTE	CARACTERÍSTICA	COLOR	ASPECTO	OLOR
METANOL	Extracto por maceración	Verde oscuro	Turbio	Alcohólico
DICLOROMETANO	Separación de fases	Anaranjado	Límpido	Aromático
ACETATO DE ETILO	Separación de fases	Amarillo oscuro	Límpido	Aromático
N-BUTANOL	Separación de fases	Amarillo	Límpido	Aromático
AGUA	Residual	Pardo	Límpido	Aromático

Fuente: Elaboración propia

## 2. CONCENTRACION DE EXTRACTOS.

Luego de la obtención de cada extracto se realizó la concentración de los extractos se utilizó el rota vapor, especificando la condiciones de temperatura y presión para cada tipo de solvente.

Luego de realizar las concentraciones se calculó primero el rendimiento para el extracto metanólico dado que este se trabajó directamente con el producto de la

maceración de 100,05g de hojas de *Annona muricata L.*, el resultado se muestra en la **Tabla 4**.

**Tabla 4:** Rendimiento extracto metanólico

SOLVENTE	PESO BALON INICIAL (g)	PESO BALON FINAL (g)	PESO RESIDUO (g)	RENDIMIENTO (%)
<b>METANOL</b>	267.1508	302.8500	35.6992	35.68%

*Fuente: Elaboración propia*

De este primer residuo se tomaron 2,415g para colocarlo en un vial para ser utilizado posteriormente, quedando como residuo 33.2842g para realizar las re-extracciones posteriores.

Luego de realizar las extracciones con los otros solventes y sus concentraciones respectivas utilizando el rotavapor se procedió a calcular los rendimientos para cada solvente como se muestra en la **Tabla 5**

**Tabla 5:** Rendimiento Solventes

SOLVENTE	PESO BALON INICIAL	PESO BALON FINAL	PESO RESIDUO	RENDIMIENTO
<b>DICLOROMETANO</b>	267.1315	268.8951	1.7636	5.3%
<b>ACETATO DE ETILO</b>	174.3708	176.0615	1.6907	5.1%
<b>N-BUTANOL</b>	55.7111	55.7373	0.0262	0.07%
<b>AGUA</b>	55.7218	55.7556	0.0338	0.1%

*Fuente: Elaboración propia*

### 3. PREPARACION DE SOLUCIONES STOCK Y DILUCIONES DE EXTRACTO.

Posteriormente a la obtención de los extractos libres de solvente se procedió a la preparación de la soluciones stock para cada tipo de extracto los cuales tendrían como concentración final de 2000 $\mu$ g/mL.

Se procedió a tomar una fracción de cada extracto y se realizó el cálculo correspondiente para la preparación de cada solución stock, la preparación de cada solución stock se realizó utilizando una solución de DMSO 1% y agua de calidad ultra pura, la preparación de cada solución stock se muestra en la **Tabla 6**.

**Tabla 6:** Soluciones stock de los extractos

EXTRACTO	CANTIDAD DE EXTRACTO ( $\mu$ g)	DMSO 1% (ml)	AGUA DESTILADA (ml)	VOLUMEN FINAL (DMSO 0.1%) (ml)
Metanol	41 400	0.207	20.493	20.70
Dicloro metano	41 900	0.209	20.691	20.95
Acetato de etilo	21 600	0.108	10.692	10.80
n-Butanol	43 300	0.217	21.483	21.65
Agua	44 500	0.223	22.077	22.30

*Fuente: Elaboración propia*

A partir de estas soluciones stock se procedió a preparar 5 soluciones (10mL) de cada extracto a diferentes concentraciones finales (1 $\mu$ g/mL, 3 $\mu$ g/mL, 10 $\mu$ g/mL, 30 $\mu$ g/mL y 100 $\mu$ g/mL) las cuales fueron utilizadas posteriormente, la preparación se realizó como se indica en la **Tabla 7**.

**Tabla 7:** Preparación de diluciones

CONCENTRACION FINAL ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	VOLUMEN DE SOLUCION STOCK (mL)	SOLUCION DMSO 1% (mL)
1	0.05	9.95
3	0.15	9.85
10	0.50	9.5
30	1.5	8.5
100	5	5

*Fuente: Elaboración propia*

A partir de estos cálculos se prepararon las diluciones para cada tipo de extracto.

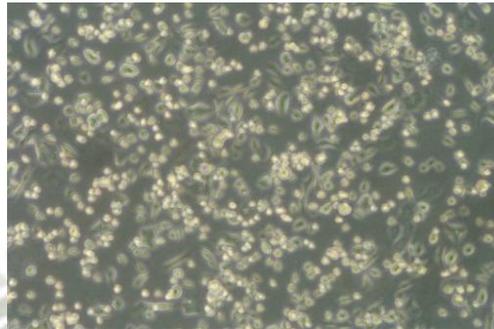
#### 4. CULTIVO CELULAR.

Tanto el desarrollo y el comportamiento de ambos tipos de líneas celulares ASPC-1 y PC-3, se logró obtener una confluencia mayor al 80% en ambos casos y una viabilidad celular aproximada al 90% en ambos tipos celulares; esto debido a que se brindaron todas las condiciones adecuadas a ambos tipos celulares. Su crecimiento se vio favorecido por la utilización del medio selectivo RPMI 1640 y F-12K respectivamente, el cual fue enriquecido adecuadamente para favorecer el crecimiento de cada tipo de línea celular. Las imágenes mostradas a continuación muestran el crecimiento de ambas líneas celulares y fueron obtenidas por el microscopio óptico invertido con el uso del objetivo 10X.

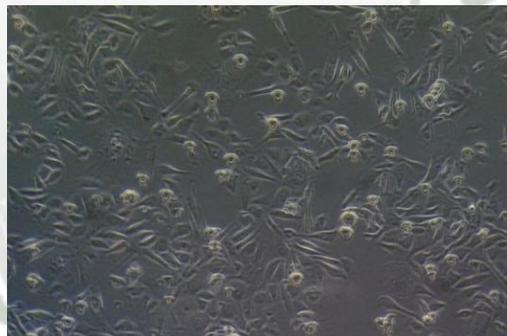
En la **Figura N°33** y **Figura N°34** se puede observar el crecimiento y adaptación de las líneas celulares ASPC-1 y PC-3 respectivamente, tras 12 horas de adecuada incubación y presencia del medio enriquecido correspondiente a cada línea celular.

Transcurridas 24 horas de incubación podemos observar en las **Figura N°35** y **Figura N°36**, que ha habido un cambio a nivel morfológico así como de

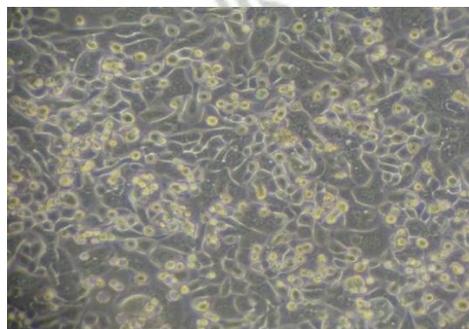
crecimiento y aumento de la confluencia celular, y finalmente a las 48 horas de incubación se puede observar en las **Figura N°37** y **Figura N°38**, que la morfología se ha definido completamente así como se observa una confluencia adecuada para la realización de estudios y pasajes posteriores; esto para ambos tipos de líneas celulares ASPC-1 y PC-3.



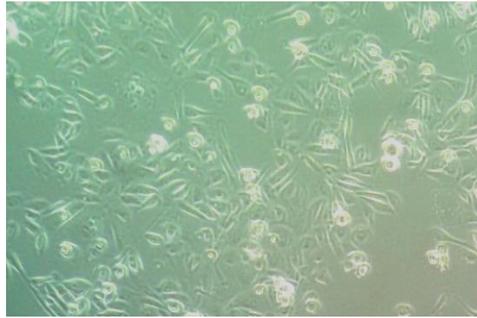
**Figura N°33:** Desarrollo de Células ASPC-1 a 12 horas de incubación



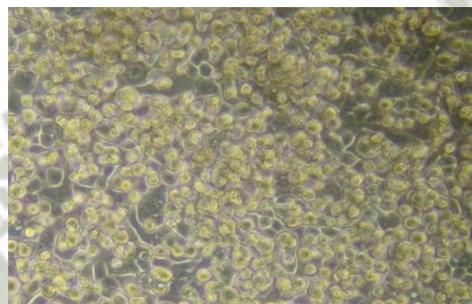
**Figura N°34:** Desarrollo de Células PC-3 a 12 horas de incubación



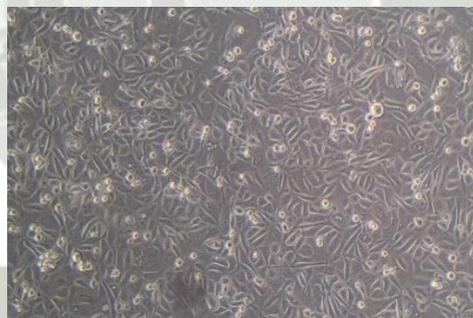
**Figura N°35:** Desarrollo de Células ASPC-1 a 24 horas de incubación



**Figura N°36:** Desarrollo de Células PC-3 a 24 horas de incubación



**Figura N°37:** Desarrollo de Células ASPC-1 a 48 horas de incubación



**Figura N°38:** Desarrollo de Células PC-3 a 48 horas de incubación

Ambas líneas celulares que fueron utilizadas en el presente estudio poseen cada una un crecimiento característico. Cada tiempo de crecimiento celular es independiente para cada tipo celular; cada línea celular posee una fase latente diferente en la cual la célula se adapta a las condiciones de cultivo así como al medio enriquecido, y posterior a ello se da inicio a la fase exponencial en la cual

las líneas celulares alcanzan un crecimiento exponencial adecuado proporcionado por el medio selectivo para cada línea celular.

## 5. EXCLUSION CELULAR Y PORCENTAJE DE CELULAS VIABLES EN SUSPENSION CELULAR.

En la siguiente **Tabla 8** se muestra el conteo celular y el porcentaje de células viables en los 20 $\mu$ L de suspensión celular obtenida por cada frasco utilizado; las células ASPC-1 tienen como característica el desarrollo rápido al cabo de 48 horas y una confluencia superior al 80%, lo cual favorece la obtención de una suspensión celular y posterior determinación de la viabilidad celular la cual se encontraba en promedio superior al 90% el cual es un requisito básico para los estudios posteriores.

**Tabla 8:** Conteo celular y porcentaje de viabilidad de células ASPC-1

Línea Celular ASPC-1	
Células/mL	% Células viables
5.12 x 10 <sup>5</sup>	95%
5.59 x 10 <sup>5</sup>	98%
6.07 x 10 <sup>5</sup>	98%
3.75 x 10 <sup>5</sup>	95%
4.54 x 10 <sup>5</sup>	93%
3.63 x 10 <sup>5</sup>	98%
4.91 x 10 <sup>5</sup>	97%
8.31 x 10 <sup>5</sup>	95%
7.86 x 10 <sup>5</sup>	95%
8,64 x 10 <sup>5</sup>	94%
<b>Promedio</b>	96%
<b>Desviación Estándar</b>	2%

*Fuente: Elaboración propia*

La **Tabla 9** muestra el conteo celular y porcentaje de células viables en los 20uL de suspensión celular obtenida por cada frasco utilizado; las células PC-3 tienen un desarrollo rápido al cabo de 36 horas, completan su desarrollo y confluencia al cabo de las 48 horas alcanzando una confluencia superior al 80%, lo cual favorece la obtención de una suspensión celular y posterior determinación de la viabilidad celular la cual se encontraba en promedio superior al 90% el cual es un requisito básico para los estudios posteriores.

**Tabla 9:** Conteo celular y porcentaje de viabilidad de células PC-3

<b>Línea Celular PC-3</b>	
<b>Células/ml</b>	<b>% Células viables</b>
<b>6.15 x 10<sup>5</sup></b>	99%
<b>8,50 x 10<sup>5</sup></b>	97%
<b>5.10 x 10<sup>5</sup></b>	98%
<b>3.63 x 10<sup>5</sup></b>	96%
<b>7.24 x 10<sup>5</sup></b>	95%
<b>8.80 x 10<sup>5</sup></b>	96%
<b>9.78 x 10<sup>5</sup></b>	98%
<b>8.70 x 10<sup>5</sup></b>	95%
<b>8.03 x 10<sup>5</sup></b>	98%
<b>5.12 x 10<sup>5</sup></b>	96%
<b>Promedio</b>	97%
<b>Desviación Estándar</b>	2%

*Fuente: Elaboración propia*

## 6. DETERMINACION DE VIABILIDAD CELULAR FRENTE AL TRATAMIENTO CON LOS EXTRACTOS OBTENIDOS.

Posteriormente se procedió a determinar la viabilidad celular frente a los diferentes extractos obtenidos de las hojas de *Annona muricata L.* (Guanábana)

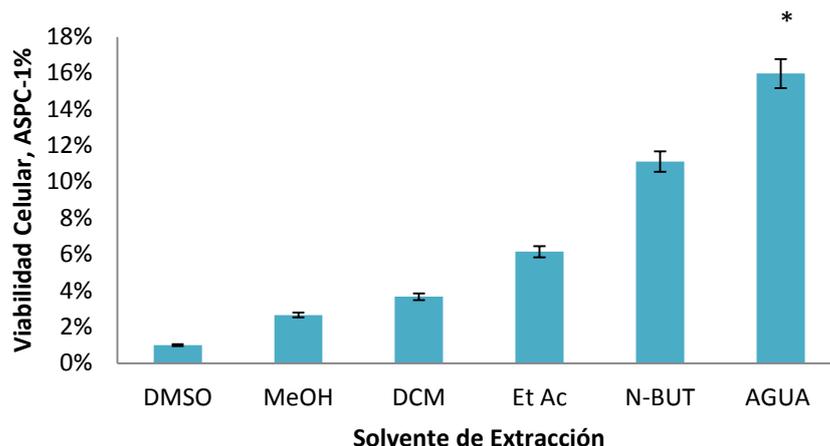
sobre las líneas celulares mencionadas, cuyo resultado fue comparado con un grupo control (DMSO 1%).

Se obtuvieron imágenes utilizando el microscopio óptico invertido con un objetivo 10X de las células ASPC-1 y PC-3 ambas tratadas con los diversos extractos obtenidos de las hojas de *Annona muricata L.*, a diversas concentraciones (1µg/mL, 3µg/mL, 10µg/mL, 30µg/mL y 100µg/mL) y diversos tiempos de exposición al tratamiento (24 y 48 horas). La actividad citotóxica de los diversos extractos de hojas de *Annona muricata L.* han sido analizadas *in vitro* mediante el ensayo de proliferación MTS,

### 6.1. DETERMINACION DEL MEJOR EXTRACTO.

El ensayo de proliferación MTS fue utilizado para determinar cuál de los 5 extractos obtenidos presentaba un mayor efecto citotóxico, ambas líneas celulares ASPC-1 y PC-3 fueron evaluadas en las mismas condiciones y utilizando los mismos reactivos, se procedió tratando a las líneas celulares por separado con cada extracto obtenido (metanol, dicloro metano, acetato de etilo, n-butanol y acuoso), se usó la solución stock en todos los casos, para poder determinar el extracto con mayor actividad citotóxica. Las lecturas de absorbancias realizadas en el Lector Multimodal Synergy HT de los grupos de estudio y el análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía, estos datos pueden ser observados en el ANEXO 1.

La proliferación celular en el cáncer de páncreas es medido y comparado con la ausencia o presencia del efecto citotóxico del extracto de hojas de *Annona muricata L.* en relación con el estudio control (DMSO 0.5% y PBS) sobre las células ASPC-1. Los siguientes datos muestran que existe una diferencia significativa en todos los extractos respecto al grupo control como se evidencia en la **Tabla 10** en la cual se representa la media y el error estándar (n=5; \*p<0-05, diferencia significativa respecto al control negativo, ANOVA de una sola vía y post-hoc Dunnett).



**Figura N°39:** Diferentes Extractos de Hojas de *Annona muricata L.* Inhiben la proliferación de células de cáncer pancreático ASPC-1.

**Tabla 10:** Promedio del porcentaje de viabilidad celular afectada por los diferentes extractos de hojas de *Annona muricata L.* sobre las líneas celulares de cáncer de páncreas ASPC-1.

DMSO (Control)	MeOH	DCM	Et Ac	N-BUT	AGUA
1%	3%	4%	6%	11%	16%

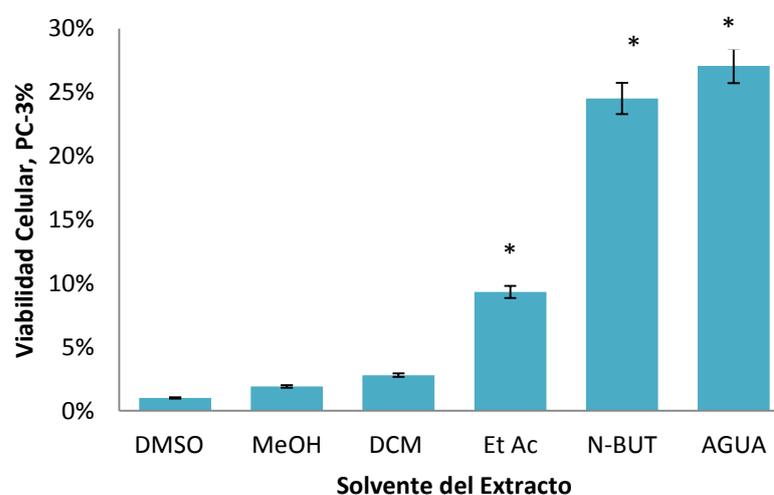
Fuente: *Elaboración Propia*

**Tabla 11:** Diferencia Significativa del Grupo de Estudio de las Células ASPC-1

Concentraciones	Media A490nm	Media %	Grupos Homogéneos
DMSO (Control)	0.3223	1	X
MeOH	0.4203	3	X
DCM	0.5673	4	X
Et Ac	0.9533	6	X
N-BUT	1.7423	11	X
AGUA	1.9283	16	X

Fuente: *Elaboración Propia*

La proliferación celular en el cáncer de próstata es medido y comparado con la ausencia o presencia del efecto citotóxico del extracto de hojas de *Annona muricata L.* en relación con el estudio control (DMSO 0.5% y PBS) sobre la línea celular PC-3. Los siguientes datos muestran que hay una diferencia significativa entre todos los extractos respecto al grupo control como se evidencia en la **Tabla 12**, en la cual se representa la media y el error estándar (n=5; \*p<0.05, diferencia significativa respecto al control negativo, ANOVA de una sola vía y post-hoc Dunnett).



**Figura N°40:** Diferentes Extractos de Hojas de *Annona muricata L.* Inhiben la proliferación de células de cáncer prostático PC-3.

**Tabla 12:** Promedio del porcentaje de viabilidad celular afectada por los diferentes extractos de hojas de *Annona muricata L.* sobre la línea celular de cáncer de próstata PC-3

DMSO (Control)	MeOH	DCM	Et Ac	N-BUT	AGUA
1%	2%	3%	9%	25%	27%

Fuente: *Elaboración Propia*

**Tabla 13:** Diferencia Significativa del Grupo de Estudio de las Células PC-3

Concentraciones	Media A490nm	Media %	Grupos Homogéneos
DMSO (Control)	0.297	1	X
MeOH	0.363	2	X
DCM	0.552	3	X
Et Ac	0.842	9	X
N-BUT	1.635	25	X
AGUA	2.168	27	X

*Fuente: Elaboración Propia*

Ambos resultados de la viabilidad celular demuestran que las líneas celulares ASPC-1 y PC-3 al ser tratadas con los diferentes extractos de hojas de *Annona muricata L.* son consistentes en ambos tipos de líneas celulares y evidencian el efecto citotóxico del extracto de hojas de *Annona muricata L.* En las células ASPC-1 y PC-3 *in vitro* habiendo diferencia significativa en todas las extracciones comparadas con el grupo control (células sin daño alguno). Se debe indicar que los resultados de la efectividad del grupo de estudio en ambos casos, ratifican y evidencian semejanza el estudio.

Luego de la evaluación de ambos resultados de los dos tipos de líneas celulares (ASPC-1 y PC-3) se pudo observar que en ambos casos el extracto que produce un mayor efecto en las líneas celulares es el extracto de diclorometano (DCM) evidenciando así el efecto citotóxico de las hojas de *Annona muricata L.*; existiendo diferencia significativa en la mayoría de los extractos con relación al grupo que se trató con DMSO; excepto en los grupos tratados con los extractos de n-butanol y el extracto residual de agua.

En el trabajo realizado anteriormente por George V. y sus colaboradores, en el año 2015, este pudo determinar que el extracto metanólico de hojas de *Annona*

*muricata* L. poseía actividad citotóxica, afirmando que este extracto posee un elevado potencial citotóxico sobre líneas celulares cancerosas, considerando que la mayor parte de su potencial quimio-preventivo esta correlacionado con la cantidad de fenoles totales presentes en el extracto.<sup>(82)</sup> George et. al.; también indico que este extracto era moderadamente citotóxico para células sanas comparado con células cancerosas, esta investigación se basó en antecedentes previos sobre la posible actividad anticancerígena de la *Annona muricata* con otros solventes como el realizado por Kumar et. al.; que realizo la extracción inicial utilizando como solvente el etanol.<sup>(83)</sup>

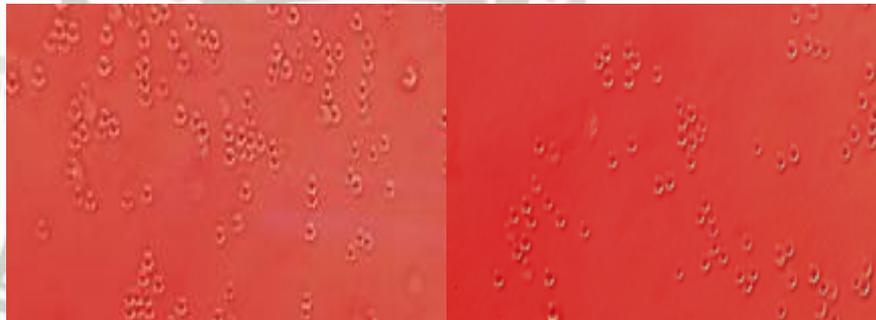
ASARE G. et. al.; 2016, indica la actividad citotóxica del extracto de hojas de *Annona muricata* L. utilizando un extracto acuoso sobre líneas celulares de cáncer de próstata y también realizo un estudio sobre el órgano afectado por estas células; lo cual es una base para diversos estudios posteriores. En conclusión, el estudio revelo el efecto citotóxico sobre la línea celular de estudio y a su vez la reducción del tamaño del órgano sobre el cual causa el daño esto causado por un posible efecto sobre la apoptosis.<sup>(84)</sup>

## **6.2. DETERMINACION DE CONCENTRACION Y TIEMPO DE TRATAMIENTO OPTIMO.**

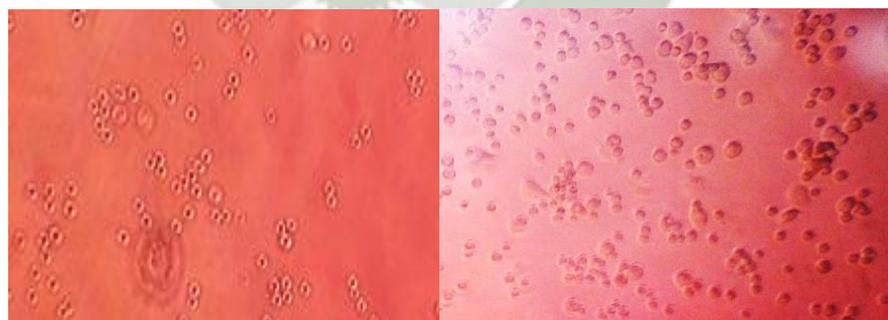
Se utilizó el ensayo de proliferación MTS también fue utilizado determinar la concentración y tiempo de tratamiento optimo del Extracto de Diclorometano (EDCM); el cual previamente se determino era el que presentaba mayor efecto citotóxico, se utilizaron 5 soluciones a diferentes concentraciones finales (1µg/mL, 3µg/mL, 10µg/mL, 30µg/mL y 100µg/mL), preparadas a partir de una solución stock del EDCM y dos tiempos de exposición al tratamiento (24 y 48 horas); este efecto citotóxico ha sido evaluado *in vitro* utilizando el ensayo MTS.

Las lecturas de absorbancias fueron realizadas en el lector multimodal Synergy HT del grupo de estudio y en análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía la cual se puede observar en el ANEXO 2.

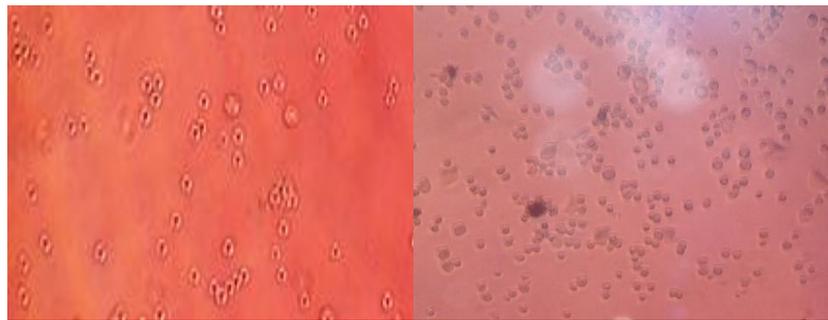
Se obtuvieron algunas fotografías utilizando el microscopio óptico invertido vistas con un objetivo 10X de las células ASPC-1 y PC-3 respectivamente tratadas con el EDCM de hojas de *Annona muricata L.* a diferentes concentraciones de 1 $\mu$ g de la **Figura N°41**, 3 $\mu$ g de la **Figura N°42**, 10 $\mu$ g de la **Figura N°43**, 30 $\mu$ g de la **Figura N°44** y 100 $\mu$ g de la **Figura N°45**; respectivamente las cuales muestran de manera visual el efecto citotóxico del EDCM, guardando relación con el primer grupo de estudio como se observa en la **Figura N°46** y **Tabla 14**, donde los efectos citotóxicos del EDCM han sido analizados *in vitro* a diversas concentraciones 1 $\mu$ g/mL, 3 $\mu$ g/mL, 10 $\mu$ g/mL, 30 $\mu$ g/mL y 100 $\mu$ g/mL mediante el ensayo de proliferación MTS.



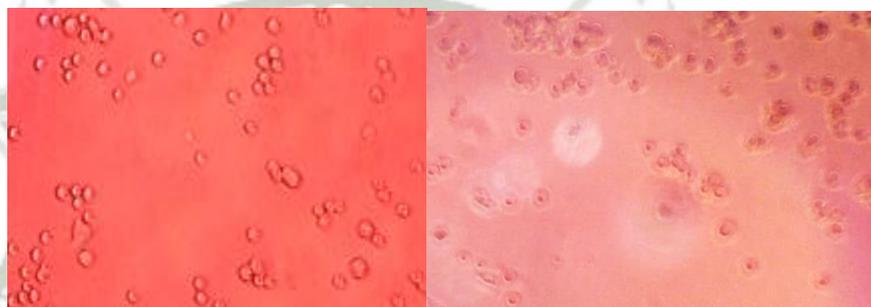
**Figura N°41:** Células ASPC-1 y PC-3 respectivamente tratadas con 1 $\mu$ g/mL del EDCM



**Figura N°42:** Células ASPC-1 y PC-3 respectivamente tratadas con 3 $\mu$ g/mL del EDCM



**Figura N°43:** Células ASPC-1 y PC-3 respectivamente tratadas con 10µg/mL del EDCM



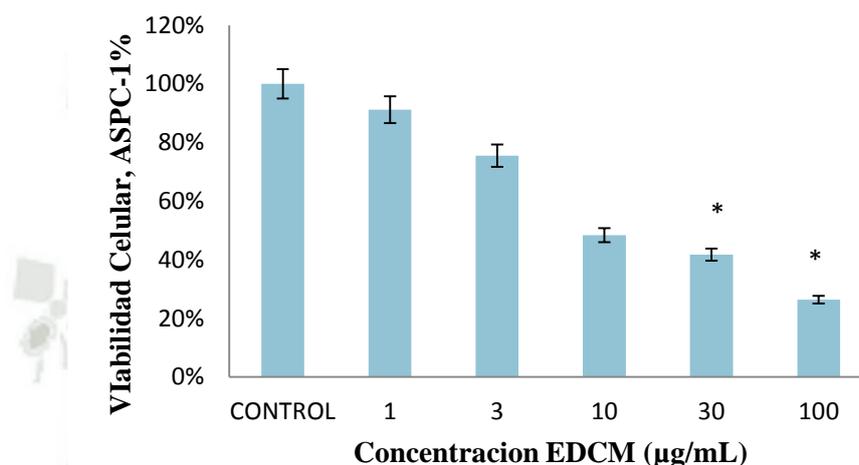
**Figura N°44:** Células ASPC-1 y PC-3 respectivamente tratadas con 30µg/mL del EDCM



**Figura N°45:** Células ASPC-1 y PC-3 respectivamente tratadas con 100ug/ml del EDCM

La proliferación celular en el cáncer de páncreas es medido y comparado con la ausencia o presencia del efecto anti proliferativo del extracto de hojas de *Annona muricata L.* a diferentes concentraciones y a las 12 horas de tratamiento en

relación con el estudio control (DMSO 0.5% y PBS) sobre las células ASPC-1 (Tabla 15). Los siguientes datos muestran que existe una diferencia significativa en todas las concentraciones respecto al grupo control como se evidencia en la Tabla 16 en la cual se representa la media y el error estándar (n=5; \*p<0.05, diferencia significativa respecto al control negativo, ANOVA de una sola vía y post-hoc Dunnett).



**Figura N°46:** Extracto Diclorometano de Hojas de *Annona muricata L.* Inhiben la proliferación de células de cáncer pancreático ASPC-1 a las 24 horas de tratamiento.

**Tabla 15:** Promedio del porcentaje de viabilidad celular afectada por las diferentes concentraciones a las 24 horas del EDCM de hojas de *Annona muricata L.* Sobre las líneas celulares de cáncer de páncreas ASPC-1.

DMSO (Control)	1µg	3µg	10µg	30µg	100µg
100%	91%	76%	48%	42%	26%

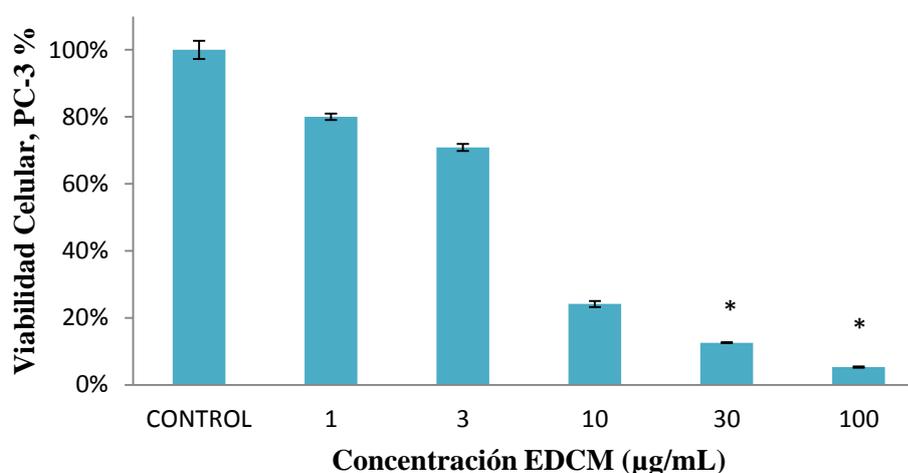
Fuente: Elaboración Propia

**Tabla 16:** Diferencias significativas del grupo de estudio de las células ASPC-1 a las 24 horas de tratamiento

Concentraciones	Media A490nm	Media %	Grupos Homogéneos
DMSO (Control)	2.163	100	X
1µg	1.993	91	X
3µg	1.655	76	X
10µg	1.124	48	X
30µg	0.968	42	X
100µg	0.672	26	X

Fuente: Elaboración Propia

La proliferación celular del cáncer de próstata es medido y comparado con la ausencia o presencia del efecto citotóxico del extracto de hojas de *Annona muricata* L. a diferentes concentraciones a las 24 horas de tratamiento en relación con el estudio control (DMSO 0.5% y PBS) sobre las células PC-3 (Tabla 17). Los siguientes datos muestran que existe una diferencia significativa en todas las concentraciones respecto al grupo control como se evidencia en la Tabla 18 en la cual se representa la media y el error estándar (n=5; \*p<0.05, diferencia significativa respecto al control negativo, ANOVA de una sola vía y post-hoc Dunnett)



**Figura N°47:** Extracto Diclorometano de Hojas de *Annona muricata L.*  
Inhiben la proliferación de células de cáncer prostático PC-3 a las 24 horas.

**Tabla 17:** Promedio del porcentaje de viabilidad celular afectada por las diferentes concentraciones del EDCM de hojas de *Annona muricata L.* Sobre la línea celular de cáncer de próstata PC-3.

DMSO (Control)	1µg	3µg	10µg	30µg	100µg
100%	80%	71%	24%	13%	5%

Fuente: *Elaboración Propia*

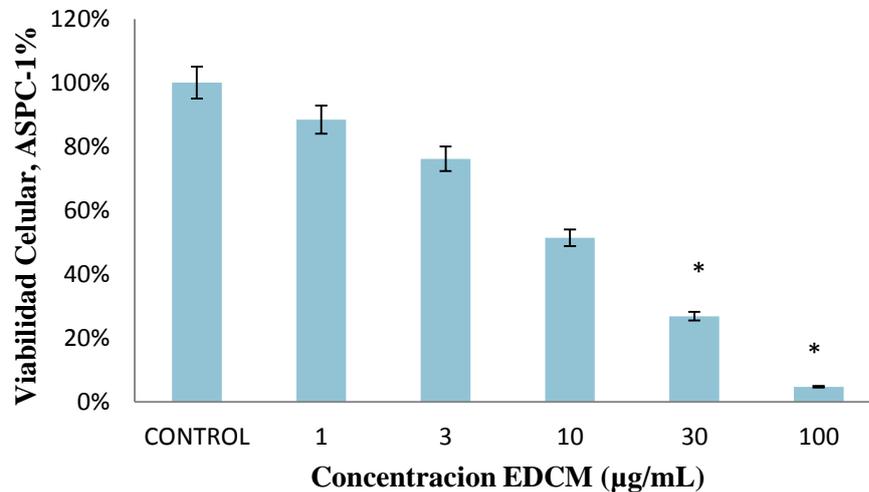
**Tabla 18:** Diferencias significativas del grupo de estudio de las células PC-3 a las 24 horas de tratamiento

Concentraciones	Media A490nm	Media %	Grupos Homogéneos
DMSO (Control)	1.805	100	X
1µg	1.413	80	X
3µg	1.329	71	X
10µg	0.593	24	X
30µg	0.383	13	X
100µg	0.333	5	X

Fuente: *Elaboración Propia*

La proliferación celular en el cáncer de páncreas es medido y comparado con la ausencia o presencia del efecto citotóxico del extracto de hojas de *Annona muricata L.* a diferentes concentraciones a las 48 horas de exposición al tratamiento con el EDCM en relación con el estudio control (DMSO 0.5% y PBS) sobre las células ASPC-1 (**Tabla 19**). Los siguientes datos muestran que existe una diferencia significativa en todas las concentraciones respecto al grupo control como se evidencia en la **Tabla 20** en la cual se representa la

media y el error estándar (n=5; \*p<0.05, diferencia significativa respecto al control negativo, ANOVA de una sola vía y post-hoc Dunnett)



**Figura N°48:** Extracto Diclorometano de Hojas de *Annona muricata L.* Inhiben la proliferación de células de cáncer prostático ASPC-1 a las 48 horas.

**Tabla 19:** Promedio del porcentaje de viabilidad celular afectada por las diferentes concentraciones a las 24 horas de exposición al EDCM de hojas de *Annona muricata L.* Sobre la línea celular de cáncer de páncreas ASPC-1.

DMSO (Control)	1µg	3µg	10µg	30µg	100µg
100%	88%	76%	51%	27%	5%

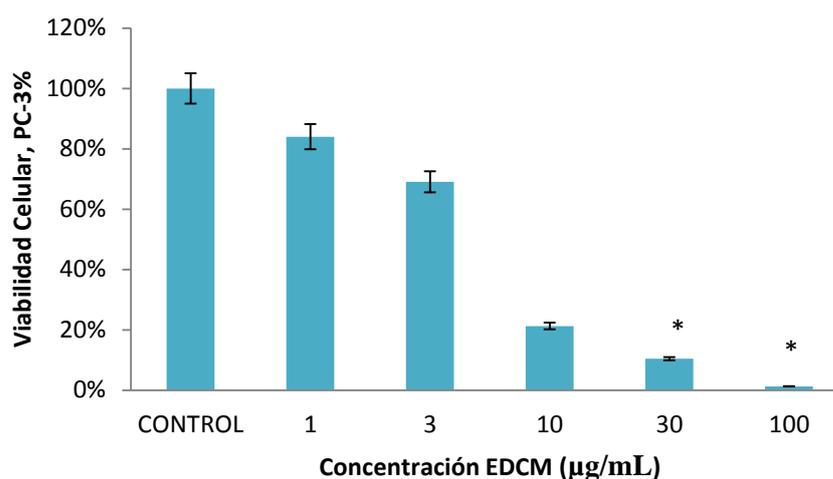
Fuente: Elaboración Propia

**Tabla 20:** Diferencias significativas del grupo de estudio de las células ASPC-1 a las 48 horas.

Concentraciones	Media A490nm	Media %	Grupos Homogéneos
DMSO (Control)	1.699	100	X
1µg	1.565	88	X
3µg	1.307	76	X
10µg	1.007	51	X
30µg	0.634	27	X
100µg	0.255	5	X

Fuente: Elaboración Propia

La proliferación celular en el cáncer de próstata es medido y comparado con la ausencia o presencia del efecto anti proliferativo del extracto de hojas de *Annona muricata L.* a diferentes concentraciones a las 48 horas de exposición al tratamiento con el EDCM en relación con el estudio control (DMSO 0.5% y PBS) sobre las células PC-3 (Tabla 21). Los siguientes datos muestran que existe una diferencia significativa en todas las concentraciones respecto al grupo control como se evidencia en la Tabla 22 en la cual se representa la media y el error estándar (n=5; \*p<0.05, diferencia significativa respecto al control negativo, ANOVA de una sola vía y post-hoc Dunnett).



**Figura N°49:** Extracto Diclorometano de Hojas de *Annona muricata L.* Inhiben la proliferación de células de cáncer prostático PC-3 a las 48 horas.

**Tabla 21:** Promedio del porcentaje de viabilidad celular afectada por las diferentes concentraciones a las 48 horas de exposición al EDCM de hojas de *Annona muricata L.* Sobre la línea celular de cáncer de próstata PC-3.

DMSO (Control)	1µg	3µg	10µg	30µg	100µg
100%	84%	69%	21%	10%	1%

*Fuente: Elaboración Propia*

**Tabla 22:** Diferencias significativas del grupo de estudio de las células PC-3 a las 48 horas

Concentraciones	Media A490nm	Media %	Grupos Homogéneos
DMSO (Control)	1.545	100	X
1µg	1.267	84	X
3µg	1.131	69	X
10µg	0.499	21	X
30µg	0.324	10	X
100µg	0.205	1	X

*Fuente: Elaboración Propia*

Ambos resultados de la viabilidad celular demuestran que las líneas celulares ASPC-1 y PC-3 al ser tratadas con los diferentes concentraciones y a diferentes tiempos de exposición al tratamiento con el EDCM de hojas de *Annona muricata L.* Son consistentes en ambos tipos de líneas celulares y evidencian el efecto citotóxico del EDCM de hojas de *Annona muricata L.* En las células ASPC-1 y PC-3 *in vitro* habiendo diferencia significativa en todas las diferentes concentraciones utilizadas comparadas con el grupo control (células sin daño alguno).

Posterior a la evaluación de ambos resultados de las dos líneas celulares ASPC-1 y PC-3 se observó en ambos casos que la concentración de 30µg/mL del Extracto con Diclorometano de hojas de *Annona muricata L.*; evidenciando así el efecto citotóxico de las hojas; existiendo una diferencia significativa en todas las concentraciones en relación al grupo control.

Se quiso obtener un mayor efecto del EDCM a una concentración elevada de 100µg/mL y se pudo observar su efecto significativo comparado con el grupo control, sin embargo, no se observó gran diferencia del efecto frente a las otras concentraciones. De igual manera se deseó determinar el efecto del EDCM a una menor concentración de 1µg/mL y 3µg/mL, en ambos casos se observó un efecto significativo en comparación con el grupo control utilizado

En ambos casos el tiempo de exposición al tratamiento el óptimo fue el de 24 horas para la línea celular PC-3 y 48 horas para la línea celular ASPC-1 , evidenciando también así el efecto citotóxico del EDCM de hojas de *Annona muricata L.*

La investigación realizada previamente por Zavala D. y sus colaboradores, en el 2013, demostró la actividad citotóxica del extracto de hojas de *Annona muricata in vitro*, se utilizaron diluciones a diferentes concentraciones las cuales mostraron diferente actividad sobre la línea celular de estudio, logrando finalmente obtener la concentración inhibitoria adecuada expresada en mg/mL. Zavala et. al., 2013, se basó en antecedentes investigativos en los cuales se refería que la concentración del extracto utilizado determina la intensidad del efecto antiproliferativo, tal como Zavala D. et. al., 2016, manifiesta en su estudio sobre el efecto anticancerígeno de *Annona muricata*.<sup>(85)</sup>

Syed et. al., 2016, manifiesta que un extracto bruto de *Annona muricata Linn.* exhibe diferentes niveles de citotoxicidad de acuerdo al tiempo de exposición de las líneas celulares al extracto. En resumen, este estudio revelo que el tipo de extracción así como el tiempo de exposición al extracto de *Annona muricata Linn*

disminuye la proliferación celular de células cancerosas. Además de ello esta investigación demuestra que la *Annona muricata* Linn. es un candidato prometedor para el posible tratamiento futuro del cáncer y ofrece una alternativa a los tratamientos convencionales.<sup>(86)</sup>

El ensayo MTS solo proporciona información básica más no proporciona información referente a la vía por la cual se produce la muerte celular activada por la *Annona muricata* L.. Sin embargo, cuando el ensayo MTS es combinado con otros ensayos este puede proporcionar algunas pistas para poder determinar la posible ruta de la muerte de las células ASPC-1 y PC-3 del cáncer de páncreas y próstata respectivamente.

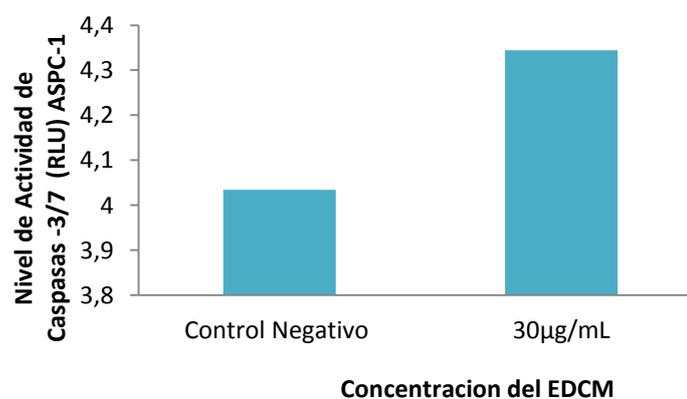
## 7. ANALISIS DE LA ACTIVACION DE CASPASAS.

Con la finalidad de conocer las vías de señalización implicadas en el proceso de inducción del proceso de apoptosis, se procedió a la realización de un estudio *in vitro* en el cual se podrá evidenciar si el extracto de Hojas de *Annona muricata* L. induce la activación de las caspasas 3 y 7 haciendo uso del kit caspasa-Glo-3/7 sobre las líneas celulares ASPC-1 y PC-3. Dichos resultados fueron obtenidos en base al grupo control (DMSO 0.5% y PBS) y utilizando el EDCM con mayor actividad a una concentración de 30 $\mu$ g/ml de extracto que presento la mayor actividad, estas determinaciones se realizaron en el periodo de 3, 6 y 12 horas.

En la **Figura N°50** se puede evidenciar que el nivel de actividad de las caspasas 3 y 7 en la línea celular ASPC-1 se incrementan levemente después de las 12 horas de tratamiento con el EDCM a 30 $\mu$ g/mL de concentración; por otro lado; en la **Figura N°51** se evidencia que el nivel de actividad de las caspasas 3 y 7 en la línea celular PC-3 después de 6 horas de exposición al tratamiento se eleva considerablemente después de tratamiento con el EDCM a 30 $\mu$ g/mL; en ambos casos se observó que a las 3 horas de exposición al tratamiento con EDCM a 30 $\mu$ g/mL de concentración no produce ningún efecto.

Estos resultados indican que el Extracto Diclorometano de Hojas de *Annona muricata L.* podría inducir el proceso de apoptosis sobre las líneas celulares cancerosas ASPC-1 y PC-3 en su fase inicial de tratamiento, además el EDCM a una concentración de 30µg/mL demostraron ser los más óptimos. La activación de caspasas por el EDCM han sido analizadas *in vitro* a una concentración de 30µg/mL en el lapso de 3, 6 y 12 horas sobre la línea celular ASPC-1 como se puede observar en la **Figura N°50**, **Figura N°51**, **Figura N°52**; en los cuales se utilizó el Kit Caspasa-Glo®-3/7. La lectura se realizó a nivel de la actividad de caspasas (RLU) tras 3,6 y 12 horas de exposición al tratamiento. También se midió la activación de caspasas por el EDCM han sido analizadas *in vitro* a una concentración de 30µg/mL en el lapso de 3, 6 y 12 horas sobre la línea celular PC-3 como se puede observar en la **Figura N°53**, **Figura N°54**, **Figura N°55**; en los cuales se utilizó el Kit Caspasa-Glo®-3/7. La lectura se realizó a nivel de la actividad de caspasas (RLU) tras 3, 6 y 12 horas de exposición al tratamiento; el análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía cuyos resultados se evidencian en el ANEXO 3.

La actividad de las caspasas 3 y 7 fueron medidas durante 3 horas con el EDCM de hojas de *Annona muricata L.* a una concentración de 30µg/mL medidos por luminiscencia. Este nivel de actividad de las caspasas 3 y 7 se expresa como unidad de luz relativa (ULR) por miligramo de proteína celular total.



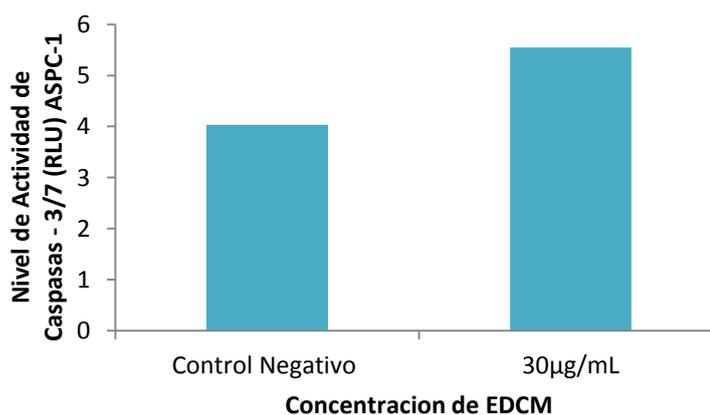
**Figura N°50:** Expresión relativa del nivel de activación de caspasas 3 y 7 sobre la línea celular ASPC-1.

**Tabla 23:** Diferencia significativa tras 3 horas de tratamiento

Concentración	Nivel de Actividad (URL)	Grupos Homogéneos
Control Negativo	4.0342	X
30 µg/mL	4.344	X

*Fuente: Elaboración Propia*

La actividad de las caspasas 3 y 7 fueron medidas durante 6 horas con el EDCM de hojas de *Annona muricata L.* a una concentración de 30µg/mL medidos por luminiscencia. Este nivel de actividad de las caspasas 3 y 7 se expresa como unidad de luz relativa (ULR) por miligramo de proteína celular total.



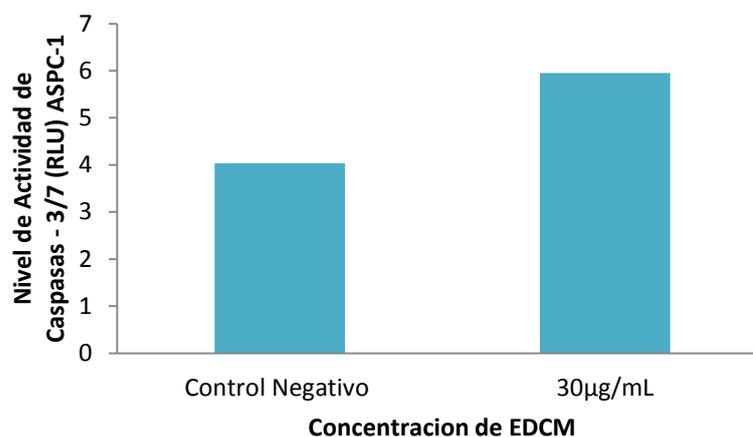
**Figura N°51:** Expresión relativa del nivel de activación de caspasas 3 y 7 sobre la línea celular ASPC-1.

**Tabla 24:** Diferencia significativa tras 6 horas de tratamiento

Concentración	Nivel de Actividad (URL)	Grupos Homogéneos
Control Negativo	4.0342	X
30 µg/mL	5.5447	X

*Fuente: Elaboración Propia*

La actividad de las caspasas 3 y 7 fueron medidas durante 12 horas con el EDCM de hojas de *Annona muricata L.* a una concentración de 30µg/mL medidos por luminiscencia. Este nivel de actividad de las caspasas 3 y 7 se expresa como unidad de luz relativa (ULR) por miligramo de proteína celular total.



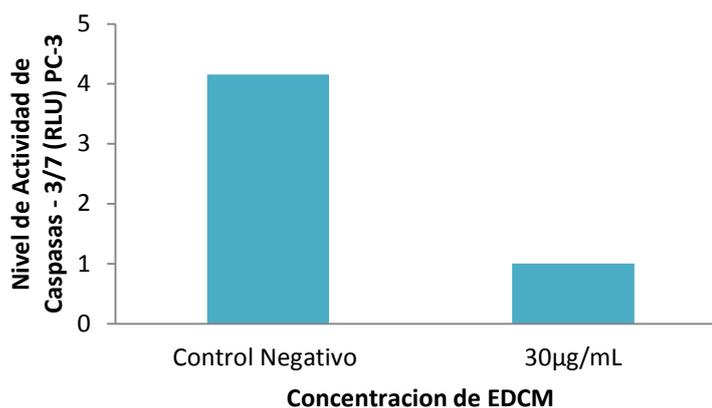
**Figura N°52:** Expresión relativa del nivel de activación de caspasas 3 y 7 sobre la línea celular ASPC-1.

**Tabla 25:** Diferencia significativa tras 12 horas de tratamiento

Concentración	Nivel de Actividad (URL)	Grupos Homogéneos
Control Negativo	4.0342	X
30 µg/mL	5.9496	X

*Fuente: Elaboración Propia*

La actividad de las caspasas 3 y 7 fueron medidas durante 3 horas con el EDCM de hojas de *Annona muricata L.* a una concentración de 30µg/mL medidos por luminiscencia. Este nivel de actividad de las caspasas 3 y 7 se expresa como unidad de luz relativa (ULR) por miligramo de proteína celular total.



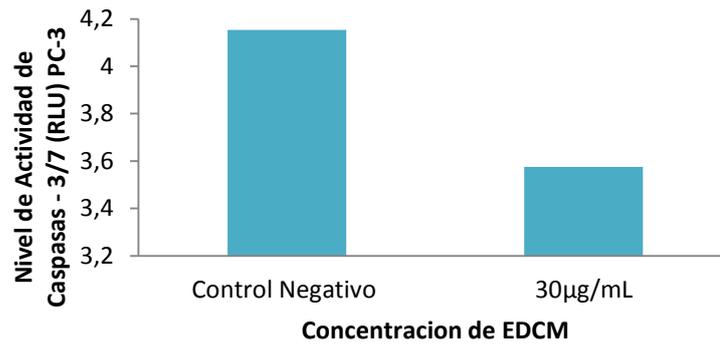
**Figura N°53:** Expresión relativa del nivel de activación de caspasas 3 y 7 sobre la línea celular PC-3

**Tabla 26:** Diferencia significativa tras 3 horas de tratamiento

Concentración	Nivel de Actividad (URL)	Grupos Homogéneos
Control Negativo	4.1542	X
30 µg/mL	1.0053	X

*Fuente: Elaboración Propia*

La actividad de las caspasas 3 y 7 fueron medidas durante 6 horas con el EDCM de hojas de *Annona muricata L.* a una concentración de 30µg/mL medidos por luminiscencia. Este nivel de actividad de las caspasas 3 y 7 se expresa como unidad de luz relativa (ULR) por miligramo de proteína celular total.



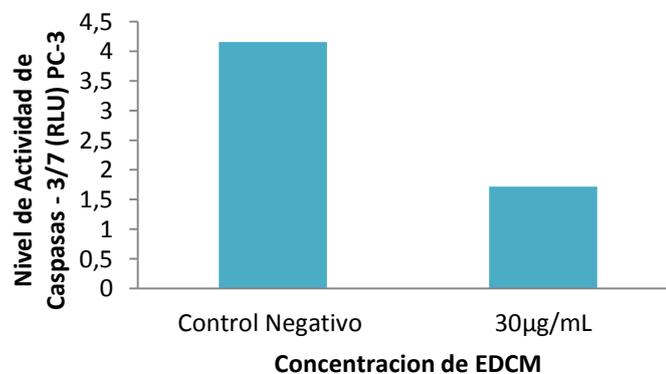
**Figura N°54:** Expresión relativa del nivel de activación de caspasas 3 y 7 sobre la línea celular PC-3.

**Tabla 27:** Diferencia significativa tras 6 horas de tratamiento

Concentración	Nivel de Actividad (URL)	Grupos Homogéneos
Control Negativo	4.1542	X
30 µg/mL	3.5751	X

*Fuente: Elaboración Propia*

La actividad de las caspasas 3 y 7 fueron medidas durante 12 horas con el EDCM de hojas de *Annona muricata L.* a una concentración de 30µg/mL medidos por luminiscencia. Este nivel de actividad de las caspasas 3 y 7 se expresa como unidad de luz relativa (ULR) por miligramo de proteína celular total.



**Figura N°55:** Expresión relativa del nivel de activación de caspasas 3 y 7 sobre la línea celular PC-3.

\*

**Tabla 28:** Diferencia significativa tras 12 horas de tratamiento

Concentración	Nivel de Actividad (URL)	Grupos Homogéneos
Control Negativo	4.1542	X
30 µg/mL	1.7176	X

*Fuente: Elaboración Propia*

De Groene E. et. al., 2008, en su investigación indica la relación que podría existir entre la viabilidad celular y la activación de las caspasas, en esta investigación que se realizó sobre la línea celular HepG-4 utilizando el Kit CaspaseGlo®-3/7, logro obtener resultados similares a los obtenidos en este estudio, dado que este realizo sus estudios utilizando como sustancia de análisis el Extracto de *Annona muricata*, pudiendo logrando una elevación significativa en la activación de las caspasas, indicando finalmente indico que la concentración determina la manera de actuar de la sustancia y que a algunas concentraciones el efecto puede no ser el esperado.<sup>(87)</sup>

Yang J. y sus colaboradores, en el 2009, indica que los agentes externos pueden causar al sensibilización de las células cancerosas al proceso apoptótico, esto inducido por diversos estímulos como son los fármacos quimioterapéuticos, además, indica que la apoptosis es un proceso que debe ser obviado en el proceso de malignización. Por ello, la células de tipo cancerígenas mutan para poder evadir este proceso y así poder evitar ser eliminadas por los sistemas existentes en el organismo y poder sobrevivir al ambiente tumoral interno.<sup>(88)</sup>

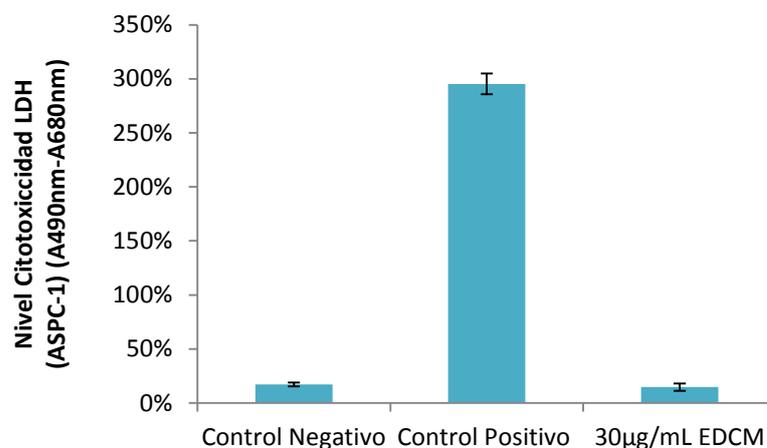
El efecto citotóxico del Extracto Diclorometano de Hojas de *Annona muricata L.* se evidencia y existen pruebas investigativas de ello; sin embargo poder dilucidar el mecanismo de acción por el cual produce este efecto es complejo; dado que existe evidencia previa del efecto citotóxico del Extracto de Hojas de *Annona muricata L.*, se utilizó la expresión de la actividad de las caspasas 3 y 7 sobre las células ASPC-1 y PC-3 ambas tratadas con el EDCM de hojas de *Annona*

*muricata* L.; logrando obtener como punto inicial la hipótesis del posible mecanismo de acción así como poder explicar con mayor amplitud el papel funcional de estas caspasas. Estos resultados obtenidos demuestran una vez más el efecto citotóxico del extracto de hojas de *Annona muricata* L. relacionado con el proceso de apoptosis, lo cual podría ser útil en el desarrollo de nuevos fármacos tratamientos para el cáncer con origen en esta planta.

## 8. ANALISIS DE LDH.

La citotoxicidad se produce por diversos factores, en gran parte de los casos se produce por efecto de agentes externos causando una elevada permeabilidad en la membrana plasmática causando daño irreversible en la célula. El LDH es una enzima citosólica que es un potencial marcador de la lesión a nivel celular, este LDH cataliza la oxidación del L-lactato a piruvato esto a través de la reducción del NAD<sup>+</sup> a NADH, lo cual produce la reducción de la sal de tetrazolio en un producto de color rojo denominado formazan el cual es medio a una longitud de onda de 490nm y 680nm siendo la sustracción de estos directamente proporcional al grado de citotoxicidad. El presente trabajo de investigación demuestra que el tipo de cáncer podría jugar un rol importante en la aparición del daño a nivel celular y medición de los niveles de LDH; ya que se observó que el EDCM a una concentración de 30µg/mL no produjo ninguna lesión en las células ASPC-1 a esta concentración lo cual indicaría que el EDCM no produce daño a nivel de la membrana celular tal como se observa en la **Figura N°52**; pero se observó un incremento de los niveles de LDH en las células PC-3 lo cual evidencia la aparición de daño a nivel celular como se observa en la **Figura N°53**. Las lecturas realizadas de dichas absorbancias a dos longitudes de onda y el análisis de varianza de una sola vía se evidencian en el **ANEXO 4**.

Los índices de citotoxicidad en las células tratadas con el grupo control negativo y el EDCM tienen una diferencia significativa con el grupo control positivo como se evidencia en la **Tabla 29**. Se representan la media y el error estándar (n=3; \*p<0.05, diferencias significativas respecto al control positivo, ANOVA de una vía y *post-hoc* Dunnett).



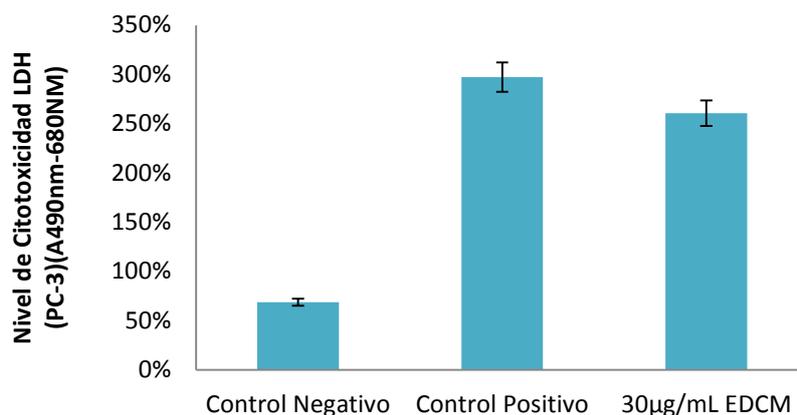
**Figura N°56:** Liberación del LDH (Citotoxicidad) tras 48 horas de tratamiento con el EDCM a partir de las células ASPC-1.

**Tabla 29:** Diferencias significativas del nivel de Citotoxicidad

Concentraciones	Nivel de Citotoxicidad (A490nm-680nm)	Grupos Homogéneos	
Control Negativo	0.561	X	
Control Positivo	3.345		X
30µg/mL	0.439	X	

*Fuente: Elaboración Propia*

Los índices de citotoxicidad en las células tratadas con el grupo control negativo y el EDCM tienen una diferencia significativa con el grupo control positivo como se evidencia en la **Tabla 30**. Se representan la media y el error estándar (n=3; \*p<0.05, diferencias significativas respecto al control positivo, ANOVA de una vía y *post-hoc* Dunnett).



**Figura N°57:** Liberación del LDH (Citotoxicidad) tras 24 horas de tratamiento con el EDCM a partir de las células PC-3.

**Tabla 30:** Diferencias significativas del nivel de Citotoxicidad

Concentraciones	Nivel de Citotoxicidad (A490nm-680nm)	Grupos Homogéneos
Control Negativo	1.092	X
Control Positivo	3.445	X
30µg/mL	3.145	X

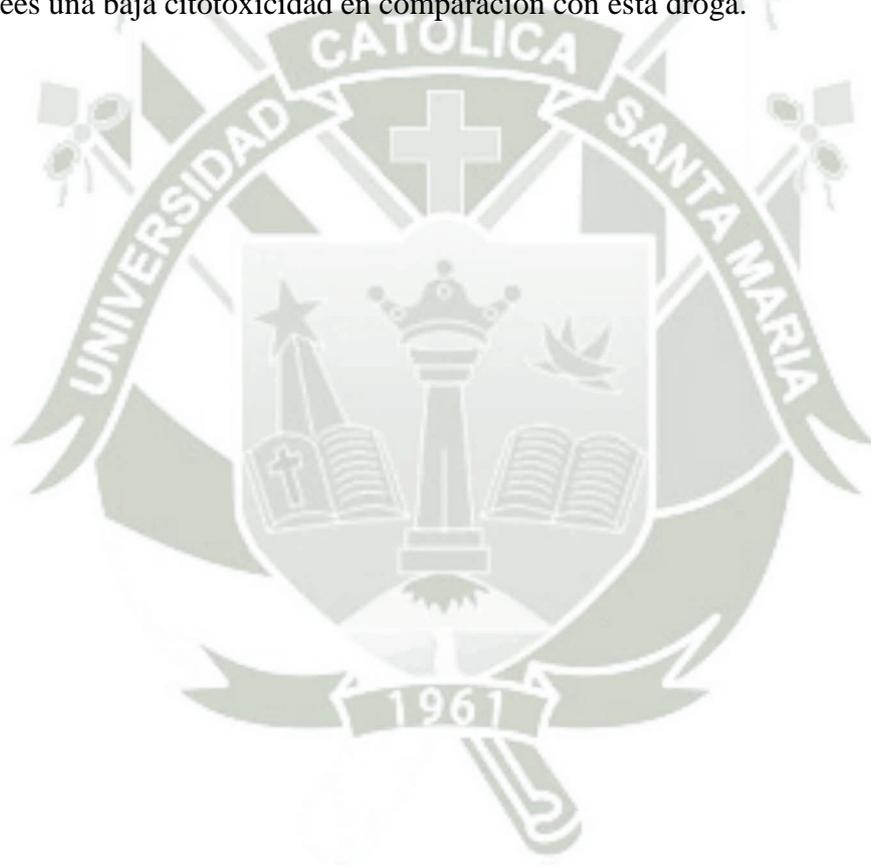
*Fuente: Elaboración Propia*

Las investigaciones realizadas por Legrand et. al., en 1992, indica que existen algunos factores que influyen en la medición de LDH intracelular de manera cuantitativa, esto sobre diversas líneas celulares, entre estas se encuentran la cantidad de oxigenación de las células, los componentes del medio celular, etc.; es muy útil como indicador de la muerte celular en el proceso de cultivo así como el acondicionamiento de estas líneas celulares de estudio. <sup>(89)</sup>

Zoheil et. al., 2014, en su investigación sobre la citotoxicidad producida por la detención del ciclo celular en la fase G1 y una apoptosis mediada por el mitocondrias utilizando el extracto de *Annona muricata*, en dos líneas celulares pertenecientes al colón, demostró que este extracto produce la liberación de la enzima LDH lo cual causa la disminución de la viabilidad celular; y como

consecuencia la posterior fragmentación del ADN.<sup>(90)</sup> Varios agentes producen un comportamiento distinto , causando esto un daño a nivel de la membrana celular y generando así la liberación del LDH al medio exterior y posteriormente daño irreparable en la célula.

En estudios previos como el realizado por Chen et. al., 2008, en el cual se realizaron estudios muy similares al presente proyecto dado que se determinó la citotoxicidad de un extracto metanólico de hojas de *Annona muricata* Linn. sobre líneas celulares de cáncer de páncreas y se le comparo con un fármaco utilizado para el tratamiento del cáncer como es el 5-fluorouracilo , demostrando que posee una baja citotoxicidad en comparación con esta droga.



## CAPITULO IV

### CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS

#### CONCLUSIONES

PRIMERA: El tipo de solvente utilizado para la extracción de hojas de *Annona muricata L.*, desempeña un rol muy importante en la aparición de la actividad antiproliferativa del extracto.

SEGUNDA: El extracto Diclorometano (EDCM) de hojas de *Annona muricata L.*, podría producir un efecto citotóxico superior sobre las líneas celulares ASPC-1 y PC-3; sin embargo, la respuesta de cada tipo de célula frente al EDCM no es igual.

TERCERA: El EDCM produce un mayor efecto citotóxico a la concentración de 30ug/ml sobre ambas líneas celulares (ASPC-1 y PC-3); asimismo; los tiempos óptimos de exposición al tratamiento son de 48 horas para la línea celular ASPC-1 y 24horas para la línea celular PC-3 para obtener el efecto citotóxico deseado.

CUARTA: El EDCM produce la inducción de la activación de las caspasas 3 y 7; para la línea celular ASPC-1 se observa un nivel significativo a las 12 horas y para la línea celular PC-3 a las 6 horas de exposición al tratamiento con EDCM a una concentración de 30 $\mu$ g/mL, produciendo una diferencia significativa comparada con el grupo control. El EDCM podría inducir apoptosis en las células del cáncer de páncreas (ASPC-1) y cáncer de próstata (PC-3); luego de la exposición por 48 horas las células ASPC-1 no evidencian la liberación de LDH, para el caso de las células PC-3 luego de su exposición por 24 horas se evidencia la liberación de LDH de manera significativa; es por ellos que se indica que el EDCM de hojas de *Annona muricata L.* produce daño en la membrana celular de algunos tipos de células.

QUINTA: El EDCM produce efecto citotóxico en las dos líneas celulares ASPC-1 y PC-3; el efecto es mayor sobre la línea celular PC-3 en comparación con la línea celular ASPC-1; es decir, la intensidad del efecto antiproliferativo se ve medido por el tipo de línea celular.

## SUGERENCIAS

1. Realizar una extracción utilizando como solvente único el Diclorometano y realizar estudios con este extracto.
2. Extender los estudios realizados en esta tesis y analizar si el EDCM a la concentración de  $30\mu\text{g/mL}$  podría causar daño en líneas celulares sanas (sin cáncer).
3. Analizar con mayor amplitud y detenimiento las posibles vías alternas que podría utilizar el EDCM de hojas de *Annona muricata L.* como mecanismo de acción.
4. Ampliar los estudios realizados a otros tipos de líneas celulares de cáncer.
5. Realizar estudios de viabilidad celular utilizando en EDCM de hojas de *Annona muricata L.* *in vivo*, haciendo uso del extracto y sus diferentes concentraciones.

**BIBLIOGRAFIA**

1. BRUNETON J.; “Farmacognosia Fitoquímica Plantas Medicinales”; 2ª Edición. 2001, pág.: 306-349.
2. RICO G.; “*Annona muricata L.*”; Species Plantarum, 1ª Edición, 1997, pág.: 536-537.
3. PERALTA L., KATISSA C.; “Efecto antimicrobiano *in vitro* de la *Annona muricata L.* Guanábana sobre *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*”; Tesis del Programa Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Católica de Santa María – Arequipa 2005.
4. KUKLLINSKI C.; “Farmacognosia, Estudio de las Drogas y Sustancias Medicamentosas de Origen Natural”; 1ª Edición, 2000, pág.: 33-109.
5. MOGHADAMTOUSI S., FADAEINASAB M., NIKZAD S., MOHAN G., MOHD ALI H., KADIR H.; “*Annona muricata* (Annonaceae): A Review of Its Tradicional Uses, Isolated Acetogenins and Biological Activities”; International Journal of Molecular Sciences, 2015, Vol.16.
6. CROAT T., ESCOBAR T., GARCIA J., GONZALEZ R., HOWARD A., IGLESIAS A., KITAJIMA E., MARTÍNEZ M., MIRANDA F., NIEMBRO A.; “*Annona muricata L.*”, Species Plantarum, 1995, 3ª Edición, pág.: 536-537.
7. MENDEZ J.L., GUTIERREZ R., et al.; “Usos Terapeuticos de la Guanábana”; XII Encuentro Participación de las Mujeres en la Ciencia, 2015.
8. ADEWOLE S., CAXTON-MARTINS E.; “Morphological Changes and Hypoglycemic Effects of *Annona muricata Linn.* (Annonaceae) leaf Aqueous Extract on Pancreatic B-cells of Streptozotocin-treated diabetic Rats”; Journal Biomed Res., 2006, Vol.9, pág.: 173-187.
9. MORON F., MORON D., NODARSE M.; “Valoración de la Evidencia Científica para Recomendar *Annona muricata L.* (guanábana) como Tratamiento o Prevención del Cáncer”; Revista Cubana de Plantas Medicinales, 2010; 15(3), pág.: 169-181.
10. MISHRA S., AHMAD S., KUMAR N., SHARMA B.; “*Annona muricata* (the Cancer Killer): A Review”; Global Journal Pharm-Res, 2013, Vol.2, pág.: 1613-161.
11. ROSLIDA A., TAY C., ZURAINI A., CHAN P.; “Anti-inflammatory and Anti-nociceptive Activities of the Ethanolic Extract of *Annona muricata* Leaf”; Journal Nature Rem, 2010, Vol.10, pág.: 95-110.
12. MOGHADAMTOUSI S., FADAEINASAB M., NIKZAD S., MOHAN G., MOHD ALI H., KADIR H.; “*Annona muricata* (Annonaceae): A Review of Its Tradicional Uses, Isolated Acetogenins and Biological Activities”; International Journal of Molecular Sciences, 2015, Vol.16 .
13. WANG L., et al.; “Acetogeninas Anonáceas de las Hojas de *Annona montana*”; Química Medicinal Biorgánica, 3ª Edición, 2002, pág.: 561-565.
14. CARTAYA O., REINALDO I.; “Acetogeninas: Características químicas y sus aplicaciones”; Cultivos Tropicales, 2001, Vol.2, pág.:5-15.
15. GARCIA K.; “Aislamiento y Caracterización Estructural de Acetogeninas Obtenidas de Semillas de *Annona cherimolio* y *Annona muricata*. Evaluación Genotóxica y Potencial Quimioterapéutico”, Revista de Investigaciones Tecnológicas, 2014, 30(5).

16. CHAMPY P., MELOT A., GUERINEAU ENQ V.; “Cuantificación de Acetogeninas en *Annona muricata* Utilizada en el Parkinson Atípico en Guadalupe”, *Movimiento DisorderP*, 2005, Vol.20, pág.: 1629-1631.
17. HUANG GR., JIANG S., WU YL., JIN Y., YAO ZJ., WU JR.; “Induction of Cell Death of Gastric Cancer Cells by a Modified Compound of the Annonaceous Acetogenin Family”, *ChemBioChem*, 4ª Edición, 2003, pág.: 1216-1221.
18. FLOREZ Y., MARTINEZ E.; “Obtención y Evaluación de Extractos Bioactivos Presentes en Semillas de *Annona muricata* de la Región Cafetera”, Universidad Tecnológica de Pereira, 2010.
19. FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD INTERREGIONAL; “Acetogeninas -Organica Allingercava”; *Revista Española de la Salud*, 2ª Edición, 2015, pág.: 1061-1065.
20. BERMEJO A., FIGADERE B., ZAFRA-POLO M., BARRACHINA I., ESTORNELL E., CORTES D.; “Acetogeninas de la Annonaceae: Progresos Recientes en Obtención, Síntesis y Mecanismo de Acción”; *Revista Productos Naturales*, 2005, Vol. 3, pág.: 269-303.
21. KENMOCHI A., ICHIMARU N., HAMADA T., NISHIOKA T., MIYOSHI T.; “Essential Structural Features of Acetogenins: Role of Hydroxyl Groups Adjacent to the Bis-THF Rings”; *Bioorganic Medicine Chemistry*, 2013, Vol.14, pág.: 779-782.
22. GARCIA K.; “Aislamiento y Caracterización Estructural de Acetogeninas Obtenidas de Semillas de *Annona cherimolium* y *Annona muricata*. Evaluación Genotóxica y Potencial Quimioterapéutico”; *Revista de Investigaciones Tecnológicas*, 2014, 30(5).
23. CHANG R., et al.; “Nueva citotoxicidad de las Acetogeninas annonáceas de la *Annona muricata*”; *Journal Natural Products*, 2001,64(7), pág.:925-931.
24. CORDOVA A.; “Fisiología Dinámica”; Editorial Masson, 2003, 4ª Edición.
25. AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER; “Prostate: Cancer Staging Manual”, *AJCC*, 2010, 7ª Edición, pág.:456-464.
26. FUNDACIÓN CONTRA EL CÁNCER; “Cáncer de Próstata: Una Guía para Pacientes”; *Guía de práctica clínica de la European Society for Medical Oncology –ESMO*; 2014, Vol.1.
27. MIURA F., TAKADA T., AMANO H., YOSHIDA M., FURUI S., TAKESHITA K.; “Diagnosis of Pancreatic Cancer”, *HPB*, 2006.
28. DONOVAN J., HAMDY F., NEAL D., PETERS T., OLVER S., BRINDLE L., JEWELL D., POWELL P., GILLAT D., DEDMAN D., MILLS N., NOBLE S., LANE A.; “Protect Study Group: Pancreas Testing of Cancer and Treatment (Protect) Feasibility Study”; *Health Technol Asses*, 2003, Vol.7, pág.:10-95
29. RAMZAN Z., LE P., KAPUR P., HUERTA S.; “Current Concepts in Pancreatic Cancer”, 2015.
30. ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD; “Programas Mundiales de Lucha Contra el Cáncer, Directrices sobre Política y Gestión”, OMS-Ginebra, 2002.
31. MANZUR J., et al.; “Manual de Enfermería Oncológica”, Instituto Nacional del Cáncer de Argentina, 2014, Vol.5, pág.: 15-43.

32. AMERICAN CANCER SOCIETY ; “ Cáncer Facts and Figures”, Atlanta, 2013, Disponible en: <http://www.cancer.org/docroot/CRI/content/>
33. NATIONAL CANCER INSTITUTE; “Common Terminology Criteria for Adverse Events”, NCI, 2003.
34. AMERICAN CANCER SOCIETY , “ Cancer Diagnostic and Figures”; New York , 2014, Disponible en: <http://www.cancer.org/docroot/CRDF/content/>
35. SAUSVILLE E., et al.; “Principles of Cancer Treatment”; Harrison’s Principles of Internal Medicine- New York, 2005, 16<sup>a</sup> Edición, pág.: 465-487. Disponible en: <http://ctep.cancer.gov/forms/CTCAEv3.pdf>
36. MINISTERIO DE SALUD DEL PERÚ; “Perfil Epidemiológico”; Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN), Disponible en: <http://www.inen.sld.pe/portal/estadisticas/datos-epidemiologicosprostata.html>
37. STEER M., WAXMAN I.; “Chronic Pancreatitis”; The New England Journal of Medicine, 1995, 22<sup>a</sup> Edición, pág.: 325-332.
38. COMITÉ DE EDUCACIÓN MEDICA CONTINUA; “Programa de Actualización Continua y a Distancia en Urología”; Sociedad Argentina de Urología, Disponible en: <http://sau-net.org/comites/educacion/fasciculos/imagenes.pdf>
39. PROSTATE CANCER FOUNDATION; “Cáncer de Próstata”; American Cancer Society , 2015.
40. FUNDACIÓN CONTRA EL CÁNCER; “Cáncer de Próstata: Una Guía para Pacientes”; European Society for Medical Oncology, Disponible en: <http://www.esmo.org/content/download/6628/115197/file/ES-Cancer-de-Prostata-Guia-para-Pacientes.pdf>
41. HELDENRLECH A., BOLLA M., JONLAU S., MASON M., MATVEEV N., MOTTET H., SCHIMD P., VAN DER KWAST T., WIEGEL T., ZATTONI F.; “Guía Clínica Sobre el Cáncer de Próstata”; European Association of Urology, 2010.
42. YANG C., GUNDALA S., MUKKAVILLI R., VANGALA S., REID M., ANEJA R.; “Synergistic Interactions Among Flavonoids and Acetogenins in Graviola (Annona muricata) leaves confer protection against prostate cancer “ ; Carcinogenesis, 2015, Disponible en: <http://doi:10.1093/carcin/bgv1046>
43. MINISTERIO DE SALUD DEL PERÚ; “Perfil Epidemiológico”; Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN), Disponible en: <http://www.inen.sld.pe/portal/estadisticas/datos-epidemiologicospancreas.html>
44. AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER; “Exocrine and Endocrine Pancreas”; Cancer Staging Manual, 2010, 7<sup>a</sup> Edición, pág.: 240-247.
45. PANCREATIC CANCER ACTION NETWORK; “Cancer de Pancreas”; American Cancer Society 2014.
46. SERRANO A.; “Factores de Riesgo y Diagnóstico Temprano del Cáncer de Páncreas”; Gastroenterología y Hepatología, 2010, 5ta Edición, pág.: 380-390.
47. DE LA CRUZ M., YOUNG A., RUFFIN M.; “Diagnosis and Management of Pancreatic Cancer”, Am Fam Physician, 2014.
48. REBER H., “Pancreatic Cancer: Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment”, Springer Science & Business media, 2012.
49. CANCER.NET; “Cáncer de Páncreas: Estadios”, 2015, Disponible en: <http://www.cancer.net/es/tipos-de-cancer/Ancer/CEAincancer-de-p%C3%A1ncreas/estadios>

50. FUNDACIÓN CONTRA EL CÁNCER; “Cáncer de Páncreas: Una Guía para Pacientes”; European Society for Medical Oncology, Disponible en: <https://www.esmo.org/content/download/6623/115163/file/ESMO-ACF-Cancer-de-Pancreas-Guia-para-Pacientes.pdf>
51. National Cancer Institute Physician Data Query (PDQ); “Pancreatic Cancer: Treatment”, 2014, Disponible en: [www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/pancreatic/helthprofessional](http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/pancreatic/helthprofessional)
52. IRACHETA M.; “El Suicidio y la Muerte Celular”; Revista Academy Science Exact First Nature, 2007, Vol.2.
53. ROJAS M., SALMEN S., BERRUESTA L.; “Muerte Celular Programada: Activación y Mecanismos de Regulación”; Revista Médica de la Extensión Portuguesa-ULA, 2009, vol.3, pág.: 95-105.
54. DESAGHER S., MARTINOU JC.; “Mitochondria as The Central Control Point of apoptosis”; Trends Cell Biology, 2000, Disponible en: <http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10932094>.
55. CHO S., CHOI J.; “Apoptotic Signaling Pathways: Caspases and Stress-Activated Protein Kinases”; Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2002.
56. HENGARTNER M.; “The Biochemistry of Apoptosis”; Nature Journal, 2000, 6ª Edición, pág.:207-219.
57. SHI Y.; “Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition During Apoptosis”; Mollecular Cell, 2002, Vol. 9, pág.: 459-475.
58. FRIEDLANDER R.; “Apoptosis and Caspases in Neurodegenerative Diseases”; Review New England Journal Medicine, 2003, Disponible en: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra022366>
59. CREGAN S., DAWSON V., SLACK R.; “Role of AIF in Caspase-Dependent and Caspase-Independent Dell Death”; Oncogene, 2004, 23ª Edicion, pág.: 785-806.
60. CHO S., CHOI J.; “Apoptotic Signaling Pathways: Caspases and Stress-Activated”, Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2001.
61. JARAMILLO, M., ARANGO, G., GONZALES, M., ROBLEDO, S., VÉLEZ, I.D.; “Cytotoxicity and Antileishmanial activity of *Annona muricata* pericarp”; Fitoterapia 71, 2000, pág.: 183-186.
62. LOCK O., ROJAS R.; “Química y Farmacología de *Annona muricata* Linn”; Revista de química, 2003, Vol.9, pag.: 24-30.
63. FLORES Y., MARTÍNEZ E.; “Obtención y Evaluación de Extractos Bioactivos Presentes en Semillas de *Annona muricata* de la Región Cafetera”; Universidad Tecnológica de Pereira, Disponible en: <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/11059/1828/1/63441F634.pdf>
64. MASTAÑO M.; “Cultivos Celulares”; Biogenesis, 2012, pág.: 30-50.
65. NPTEL; “Cell culture: National Programme on Technology Enhanced Learning”, 2013. Disponible en: <http://nptel.ac.in/courses/102103012/pdf/mod6.pdf>
66. QUISPE A., ZAVALA D., POSSO M., ROJAS J., VAISBERG A.; “Efecto Citotóxico de *Annona muricata* (guanábana) en Cultivo de Líneas Celulares de Adenocarcinoma gástrico pulmonar”, CIMEL, 2007, Vol.12.
67. PHE – ECACC; “General Cell Collection: ASPC-1”, Public Health England, 2016.Disponible en:

- <http://www.pheculturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=96020930&collection.gc>.
68. PHE – ECAC; “General Cell Collection: PC-3”, Public Health Massachussets, 2016. Disponible en: <http://www.pheculturecollections.org.us/products/cellline/generalcell/detail.jsp?refId=956784&collection.cell>
  69. ABCAM; “MTS Cell Proliferation Assay Kit (Colorimetric)”; ABCAM, 2016. Disponible en: <http://abcam.com/mts-cell-proliferation-assay-kit-colorimetric-ab197010>.
  70. GEORGE, V., KUMAR, D., RAJKUMAR, V., SURESH, P., ASHOK, R.; “Quantitative Assessment of *Annona muricata* Linn. in Normal and Immortalized Human Cell Lines”; Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2012, 13<sup>va</sup> Edición, pág.: 699-704.
  71. MARTÍNEZ A.; “Estudio del Mecanismo de Acción de una Acetogenina de *A. muricata*”; Universidad veracruzana, Disponible en: <http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/29381/1/MartinezNavarro.pdf>
  72. ARROYO A. MAHABIR G., YELKAIRA B., LI E., TOMAS C.; “Actividad Citotóxica *in vitro* de la Mezcla de *Annona muricata* y *Kameria lappacea* Sobre Células Cancerosas de Glándula Mamaria, Pulmón y Sistema Nervioso Central”, Revista de Medicina Experimental y Salud Pública, 2005, 4<sup>a</sup> Edición.
  73. HOOP D., ZENG L., GU Z., KAZLOSKI J., McLAUGHLIN J.; “Novel Mono-tetrahydrofuran Ring Acetogenins, from the Bark of *Annona squamosa*, Showing Cytotoxic Selectivities for the Human Pancreatic Carcinoma Cell Line, PACA-2”; Nat Prod, 2016, Vol. 6.
  74. KIM G., ALALI L., WU F., SASTRODIHARDJO S., McLAUGHLIN J.; “Muricoreacin and Murihexocin C. Mono-THF Acetogenins Activated Apoptosis from Leaves of *Annona muricata*”, Phytochemistry, 2010, Vol.2, pág.: 560-570.
  75. HOOP D., ZENG L., GU Z.; “Novel Mono-tetrahydrofuran Ring Acetogenins, from the Bark of *Annona muricata*, Showing Cytotoxic Selectivities for the Human Pancreatic Carcinoma Cell Line, ASPC-1”; Nat Prod, 2016, Vol. 6.
  76. Schilie M., Gonzalez A., Luna L.; “Las acetogeninas de Annonaceae: efecto antiproliferativo en líneas celulares neoplásicas”, Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 2009, 8<sup>a</sup> Edición, pág.: 245-257.
  77. QUISPE A., ZAVALA D., ROJAS J., POSSO M., VAISBERG A.; “Efecto Citotóxico Selectivo *in vitro* de Muricin H (Actogenina de *Annona muricata*) en Cultivos Celulares de Cáncer de Pulmón”, Revista Perú Med Exp Salud Publica 23 (2006) 4.
  78. PROMEGA;”Caspase-Glo® 3/7 Assay Systems”, Promega,2017. Disponible en: [http://worldwide.promega.com/products/cell-health-and-metabolism/apoptosis-assays/luminescent-caspase-assays/caspase\\_glo-3-7assay-systems](http://worldwide.promega.com/products/cell-health-and-metabolism/apoptosis-assays/luminescent-caspase-assays/caspase_glo-3-7assay-systems).
  79. ARANDA E.; “Interpretación de la Deshidrogenasa Láctica”; Educación Medica Continua, 2010.

80. KOH J., CHOI D.; “Quantitative Determination of Glutamate Mediated Cortical Injury in Cell Culture by LDH Efflux Assay”; Journal of Neuroscience Methods, 1997, Vol.1, pág.: 70-85.
81. SCIENTIFIC TF.; “Pierce Ldh Cytotoxicity Assay Kit”; Thermo Fisher, 2014. Disponible en: [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011851\\_Pierce\\_LDH\\_Cytotoxicity\\_Asy\\_UG-pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011851_Pierce_LDH_Cytotoxicity_Asy_UG-pdf).
82. GEORGE V., SURESH P.; “Quantitative Assesment of the Relative Antineoplastic Potencial of the Methanolic Leaf Extract of *Annona muricata* Linn. In Normal and Immortalized Human Cell Lines”; Asian Pacific Journal Cancer Prevention, 2012, 13<sup>va</sup> Edicion, pág.: 699-704.
83. KUMAR D., RAJKUMAR V., KUMAR R.; “Quantitative Assesment of the Relative Antineoplastic Potencial of the Ethanol Leaf Extract of *Annona muricata* Linn. In Cancer Human Cell Lines”; Asian Pacific Journal Cancer Prevention, 2011, 9<sup>na</sup> Edición, pág.: 550-580.
84. ASARE G., AFRIYIE D., NGALA R., ABUTIATE H., DOKU D., MAHMOOD S., RAHMAN H.; “Antiproliferative Activity of Aqueous Leaf Extract of *Annona muricata* L. on the Prostate, BPH-1 Cells and Some Target Genes”; Integral Cancer Ther, 2015, 14<sup>va</sup> Edición, pág.: 65-74.
85. ZAVALA D., QUISPE A., ROJAS J., POSSO M., VAISBERG A.; “Efecto Citotoxico Selectivo *in vitro* de Muricin H (Acetogenina de *Annona muricata*) en Cultivos Celulares de Cáncer de Pulmón”, Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica, 2013, 23(4).
86. SYED N., ROMLI M., HAMID M., ALITHEEN N., NIK ABD N.; “Anti-cancer Effect of *Annona muricata* Linn Leaves Crude Extract (AMCE) on Breast Cancer Cell Line”, BCM Complement Alternative Medicine, 2016.
87. DE GROENE E., KLAFFKE W.; “Compairson of *in vitro* Assays of Cellular Toxicity in the Human Hepatic Cell Line HepG-4”; Journal of Biomolecular Screening, 2008, 4a Edición, pág.:174-183.
88. YANG J., HUANG J., YUAN Y., et. al.; “MicroRNA-101, Down-regulated in Pulmonar Carcinoma, Promotes Apoptosis and Supresses Tumorigenicity Cancer”, 2009.
89. LEGRAND C., BOUR J., JACOB C., CAPIAUMONT J., MATIAL A., MARK A., “Lactate Dehydrogenase (LDH) Activity of the Number of Dead Cells in the Medium of Cultured Eukaryotic Cells as Maker”; Journal of Biotechnology, 1992, 3a Edición, pag.:230-245.
90. SOHEIL Z., HAMED K., ELHAM R., MOHAMMADJAVAD P., MEHRAM F., HABSAH A., “*Annona muricata* Leaves Induce G<sub>1</sub> Cell Cycle Arrest and Apoptosis Through Mitochondria-mediated Pathway in Human HCT-116 and HT-29 Colon Cáncer Cells”, Revista Journal of Ethnopharmacology, 2014, pág.: 277-289.
91. Chen A., Li M., Yao Q.; “*Annona muricata* Linn. Extract Acetogenins Inhibits Cell Proliferation and Induces Apoptosis in Pancreatic Cancer Cells”; Journal of Surgical Research, 2008, 18<sup>va</sup> Edición, pág.:17-23.



## ANEXO 1

### LECTURA DE ABSORVANCIAS DE LA LINEA CELULAR ASPC-1

	DMSO (Control)	MeOH	DCM	Et Ac	N-BUT	AGUA
<b>PRIMER GRUPO</b>	0.201	0.665	0.812	1.198	1.987	2.173
<b>SEGUNDO GRUPO</b>	0.260	0.586	0.786	1.067	1.765	2.546
<b>TERCER GRUPO</b>	0.175	0.653	0.754	1.182	1.887	3.061

*Fuente: Elaboración Propia*

	DMSO (Control)	MeOH	DCM	Et Ac	N- BUT	AGUA
<b>PROMEDIO</b>	1%	3%	4%	6%	11%	16%
<b>SD</b>	1%	0%	0%	0%	1%	3%
<b>SEM</b>	0%	0%	0%	0%	0%	1%

*Fuente: Elaboración Propia*

### ANALISIS DE VARIANZA DE UNA VIA EMITIDO POR SIGMA PLOT 12.5

#### One Way Analysis of Variance

**Data source:** Data 1 in Notebook1

**Normality Test (Shapiro-Wilk) Failed ( $P < 0.050$ )**

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1	4	0	0.344	0.157	0.0785
Col 2	4	0	0.533	0.205	0.103
Col 3	4	0	0.638	0.293	0.147

Col 4	4	0	0.927	0.448	0.224
Col 5	4	0	1.464	0.837	0.418
Col 6	4	0	1.989	1.263	0.631

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	5	7.902	1.580	3.580	0.020
Residual	18	7.946	0.441		
Total		2315.848			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ( $P = 0.020$ ).

Power of performed test with  $\alpha = 0.050$ : 0.656

Multiple Comparisons versus Control Group (Dunnett's Method):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	q'	P	P<0.050
Col 1 vs. Col 6	1.645	3.501	0.011	Yes
Col 1 vs. Col 5	1.120	2.383	0.104	No
Col 1 vs. Col 4	0.583	1.240	0.615	Do Not Test
Col 1 vs. Col 3	0.294	0.625	0.954	Do Not Test
Col 1 vs. Col 2	0.190	0.403	0.993	Do Not Test

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between two means that enclose that comparison. For example, if you had four means sorted in order, and found no difference between means 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1). Note that not testing the enclosed means is a

procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the means, even though one may appear to exist.



### LECTURA DE ABSORVANCIAS DE LA LINEA CELULAR PC-3

	DMSO (Control)	MeOH	DCM	Et Ac	N-BUT	AGUA
<b>PRIMER GRUPO</b>	0.297	0.363	0.552	0.842	1.634	2.168
<b>SEGUNDO GRUPO</b>	0.287	0.358	0.546	0.904	1.923	1.854
<b>TERCER GRUPO</b>	0.313	0.355	0.449	0.775	1.928	1.955

*Fuente: Elaboración Propia*

	DMSO (Control)	MeOH	DCM	Et Ac	N-BUT	AGUA
<b>PROMEDIO</b>	1%	2%	3%	9%	25%	27%
<b>SD</b>	0%	0%	4%	1%	3%	2%
<b>SEM</b>	0%	0%	1%	0%	1%	1%

*Fuente: Elaboración Propia*

### ANALISIS DE VARIANZA DE UNA VIA EMITIDO POR SIGMA PLOT 12.5

#### One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0.245)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.670)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1	3	0	0.0650	0.0131	0.00757
Col 2	3	0	0.125	0.00404	0.00233
Col 3	3	0	0.182	0.231	0.133

Col 4	3	0	0.606	0.0645	0.0372
Col 5	3	0	1.593	0.171	0.0985
Col 6	3	0	1.758	0.160	0.0925

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups		58.779	1.756	93.645	<0.001
Residual		120.225	0.0188		
Total		179.004			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ( $P = <0.001$ ).

Power of performed test with  $\alpha = 0.050$ : 1.000

Multiple Comparisons versus Control Group (Dunnett's Method) :

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	q'	P	P<0.050
Col 1 vs. Col 6	15.693	15.146	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 5	13.528	13.667	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 4	4.541	4.842	0.002	Yes
Col 1 vs. Col 3	3.117	1.043	0.748	No
Col 1 vs. Col 2	2.0597	0.534	0.974	Do Not Test

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between two means that enclose that comparison. For example, if you had four means sorted in order, and found no difference between means 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1). Note that not testing the enclosed means is a

procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the means, even though one may appear to exist.



## ANEXO 2

### LECTURA DE ABSORVANCIAS DE LA LINEA CELULAR ASPC-1 A LAS 24 HORAS

	DMSO (Control)	1µg	3µg	10µg	30µg	100µg
<b>PRIMER GRUPO</b>	1.585	1.453	1.109	0.596	0.385	0.259
<b>SEGUNDO GRUPO</b>	1.413	1.429	1.005	0.793	0.383	0.250
<b>TERCER GRUPO</b>	1.788	1.456	1.003	0.527	0.392	0.262

*Fuente: Elaboración Propia*

	DMSO (Control)	1µg	3µg	10µg	30µg	100µg
<b>PROMEDIO</b>	100%	91%	76%	48%	42%	26%
<b>SD</b>	0%	1%	1%	0%	1%	1%
<b>SEM</b>	0%	0%	0%	0%	0%	0%

*Fuente: Elaboración Propia*

### ANALISIS DE VARIANZA DE UNA VIA EMITIDO POR SIGMA PLOT 12.5

#### One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test (Shapiro-Wilk) Failed (P < 0.050)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.652)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
------------	---	---------	------	---------	-----

Col 1	4	0	1.232	0.743	0.372
Col 2	4	0	1.120	0.652	0.326
Col 3	4	0	0.818	0.445	0.223
Col 4	4	0	0.519	0.264	0.132
Col 5	4	0	0.335	0.104	0.0520
Col 6	4	0	0.242	0.0299	0.0150

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups		53.392	0.678	3.240	0.029
Residual		183.770	0.209		
Total		237.162			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ( $P = 0.029$ ).

Power of performed test with  $\alpha = 0.050$ : 0.584

Multiple Comparisons versus Control Group (Dunnett's Method):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	q'	P	P<0.050
Col 1 vs. Col 6	0.989	3.058	0.027	Yes
Col 1 vs. Col 5	0.897	2.772	0.049	Yes
Col 1 vs. Col 4	0.712	2.202	0.146	No
Col 1 vs. Col 3	0.414	1.279	0.589	Do Not Test
Col 1 vs. Col 2	0.111	0.345	0.996	Do Not Test

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between two means that enclose that comparison. For example, if you had four means sorted in order, and found no difference between means 4 vs. 2, then you

would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1). Note that not testing the enclosed means is a procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the means, even though one may appear to exist.



**LECTURA DE ABSORVANCIAS DE LA LINEA CELULAR PC-3 A LAS 24  
HORAS**

	<b>DMSO (Control)</b>	<b>1µg</b>	<b>3µg</b>	<b>10µg</b>	<b>30µg</b>	<b>100µg</b>
<b>PRIMER GRUPO</b>	1.879	1.485	1.353	0.596	0.385	0.339
<b>SEGUNDO GRUPO</b>	1.805	1.413	1.329	0.593	0.383	0.333
<b>TERCER GRUPO</b>	1.851	1.488	1.256	0.527	0.392	0.342

*Fuente: Elaboración Propia*

	<b>DMSO (Control)</b>	<b>1µg</b>	<b>3µg</b>	<b>10µg</b>	<b>30µg</b>	<b>100µg</b>
<b>PROMEDIO</b>	100%	80%	71%	24%	13%	5%
<b>SD</b>	7%	2%	3%	2%	0%	0%
<b>SEM</b>	3%	1%	1%	1%	0%	0%

*Fuente: Elaboración Propia*

**ANALISIS DE VARIANZA DE UNA VIA EMITIDO POR SIGMA PLOT 12.5**

**One Way Analysis of Variance**

**Data source:** Data 1 in Notebook1

**Normality Test (Shapiro-Wilk)** Failed (P < 0.050)

**Equal Variance Test:** Passed (P = 0.762)

<b>Group Name</b>	<b>N</b>	<b>Missing</b>	<b>Mean</b>	<b>Std Dev</b>	<b>SEM</b>
Col 1	4	0	1.423	0.844	0.422
Col 2	4	0	1.137	0.651	0.325

Col 3	4	0	1.024	0.579	0.289
Col 4	4	0	0.471	0.204	0.102
Col 5	4	0	0.335	0.103	0.0517
Col 6	4	0	0.316	0.0452	0.0226

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	54.440	0.888	3.492	0.022	
Residual	184.577	0.254			
Total	239.017				

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ( $P = 0.022$ ).

Power of performed test with  $\alpha = 0.050$ : 0.638

Multiple Comparisons versus Control Group (Dunnett's Method):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	q'	P	$P < 0.050$
Col 1 vs. Col 6	1.108	3.107	0.025	Yes
Col 1 vs. Col 5	1.088	3.052	0.028	Yes
Col 1 vs. Col 4	0.952	2.671	0.060	No
Col 1 vs. Col 3	0.399	1.120	0.696	Do Not Test
Col 1 vs. Col 2	0.286	0.803	0.885	Do Not Test

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between two means that enclose that comparison. For example, if you had four means sorted in order, and found no difference between means 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1). Note that not testing the enclosed means is a procedural

rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the means, even though one may appear to exist.



## LECTURA DE ABSORVANCIAS DE LA LINEA CELULAR ASPC-1 A LAS 48 HORAS

	DMSO (Control)	1µg	3µg	10µg	30µg	100µg
<b>PRIMER GRUPO</b>	1.481	1.384	1.176	0.505	0.352	0.206
<b>SEGUNDO GRUPO</b>	1.525	1.277	1.191	0.499	0.384	0.205
<b>TERCER GRUPO</b>	1.604	1.387	1.111	0.475	0.332	0.221

*Fuente: Elaboración Propia*

	DMSO (Control)	1µg	3µg	10µg	30µg	100µg
<b>PROMEDIO</b>	100%	88%	76%	51%	27%	5%
<b>SD</b>	0%	2%	4%	2%	2%	1%
<b>SEM</b>	0%	1%	2%	1%	1%	1%

*Fuente: Elaboración Propia*

### ANALISIS DE VARIANZA DE UNA VIA EMITIDO POR SIGMA PLOT 12.5

#### One Way Analysis of Variance

**Data source:** Data 1 in Notebook1

**Normality Test (Shapiro-Wilk)** Failed (P < 0.050)

**Equal Variance Test:** Passed (P = 0.722)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1	4	0	1.202	0.672	0.336
Col 2	4	0	1.061	0.578	0.289

Col 3	4	0	0.927	0.466	0.233
Col 4	4	0	0.430	0.126	0.0628
Col 5	4	0	0.366	0.0290	0.0145
Col 6	4	0	0.276	0.131	0.0657

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	53.187	0.637	3.684	0.018	
Residual	183.114	0.173			
Total	236.301				

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ( $P = 0.018$ ).

Power of performed test with  $\alpha = 0.050$ : 0.677

Multiple Comparisons versus Control Group (Dunnett's Method):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	q'	P	P<0.050
Col 1 vs. Col 6	0.925	3.146	0.023	Yes
Col 1 vs. Col 5	0.836	2.842	0.043	Yes
Col 1 vs. Col 4	0.771	2.621	0.066	No
Col 1 vs. Col 3	0.275	0.934	0.815	Do Not Test
Col 1 vs. Col 2	0.140	0.477	0.985	Do Not Test

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between two means that enclose that comparison. For example, if you had four means sorted in order, and found no difference between means 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1). Note that not testing the enclosed means is a procedural

rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the means, even though one may appear to exist.



**LECTURA DE ABSORVANCIAS DE LA LINEA CELULAR PC-3 A LAS 48  
HORAS**

	<b>DMSO (Control)</b>	<b>1µg</b>	<b>3µg</b>	<b>10µg</b>	<b>30µg</b>	<b>100µg</b>
<b>PRIMER GRUPO</b>	1.561	1.354	1.136	0.495	0.362	0.216
<b>SEGUNDO GRUPO</b>	1.545	1.267	1.131	0.499	0.324	0.205
<b>TERCER GRUPO</b>	1.564	1.397	1.141	0.465	0.332	0.221

*Fuente: Elaboración Propia*

	<b>DMSO (Control)</b>	<b>1µg</b>	<b>3µg</b>	<b>10µg</b>	<b>30µg</b>	<b>100µg</b>
<b>PROMEDIO</b>	100%	84%	69%	21%	10%	1%
<b>SD</b>	1%	5%	0%	1%	1%	1%
<b>SEM</b>	0%	2%	0%	1%	1%	0%

*Fuente: Elaboración Propia*

**ANALISIS DE VARIANZA DE UNA VIA EMITIDO POR SIGMA PLOT 12.5**

**One Way Analysis of Variance**

**Data source:** Data 1 in Notebook1

**Normality Test (Shapiro-Wilk)** Failed ( $P < 0.050$ )

**Equal Variance Test:** Passed ( $P = 0.765$ )

<b>Group Name</b>	<b>N</b>	<b>Missing</b>	<b>Mean</b>	<b>Std Dev</b>	<b>SEM</b>
Col 1	4	0	1.217	0.680	0.340
Col 2	4	0	1.053	0.575	0.287

Col 3	4	0	0.900	0.471	0.236
Col 4	4	0	0.413	0.146	0.0732
Col 5	4	0	0.309	0.0633	0.0317
Col 6	4	0	0.238	0.0490	0.0245

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	53.518	0.704	4.051	0.012	
Residual	183.127	0.174			
Total	236.645				

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0.012).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.742

Multiple Comparisons versus Control Group (Dunnett's Method):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	q'	P	P<0.050
Col 1 vs. Col 60.979	3.320	0.016	Yes	
Col 1 vs. Col 50.908	3.081	0.026	Yes	
Col 1 vs. Col 40.803	2.726	0.054	No	
Col 1 vs. Col 30.316	1.073	0.727	Do Not Test	
Col 1 vs. Col 20.163	0.555	0.971	Do Not Test	

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between two means that enclose that comparison. For example, if you had four means sorted in order, and found no difference between means 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2

are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1). Note that not testing the enclosed means is a procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the means, even though one may appear to exist.



### ANEXO 3

#### LECTURA DEL NIVEL DE ACTIVIDAD DE CASPASAS (RLU) DE LA LINEA CELULAR ASPC-1 TRAS 3 HORAS DE TRATAMIENTO

Nivel de Actividad de Caspasas-3/7 (RLU)		
	Control Negativo	30µg/mL
	4.0342	4.344
	4.0338	4.346
<b>Promedio</b>	4.0340	4.345
<b>SD</b>	0%	0%
<b>SEM</b>	0%	0%

*Fuente: Elaboración Propia*

#### ANALISIS DE VARIANZA DE UNA VIA EMITIDO POR SIGMA PLOT 12.5

##### One Way Analysis of Variance

**Data source:** Data 1 in Notebook1

**Normality Test (Shapiro-Wilk)** Passed (P = 0.207)

**Equal Variance Test:** Failed (P < 0.050)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1	2	0	0.4400.00002830.0000200		
Col 2	2	0	0.5550.00002120.0000150		

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	10.0131	0.0131	21000222.760	<0.0	
Residual	20.00000000	1250.000000000625			
Total	30.0131				

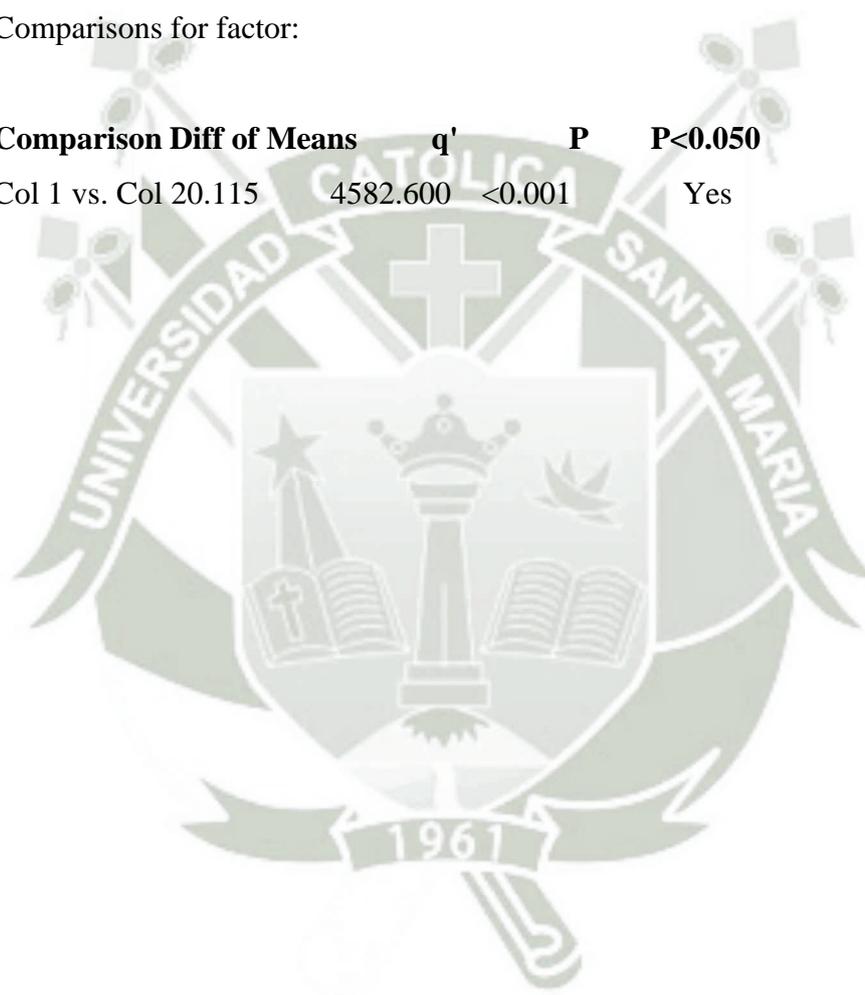
The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ( $P = <0.001$ ).

Power of performed test with  $\alpha = 0.050$ : 1.000

Multiple Comparisons versus Control Group (Dunnett's Method):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	q'	P	P<0.050
Col 1 vs. Col 20.115	4582.600	<0.001	Yes	



**LECTURA DEL NIVEL DE ACTIVIDAD DE CASPASAS (RLU) DE LA  
LINEA CELULAR ASPC-1 TRAS 6 HORAS DE TRATAMIENTO**

Nivel de Actividad de Caspasas-3/7 (RLU)		
	Control Negativo	30µg/mL
	4.0338	5.5457
	4.0315	5.5460
<b>Promedio</b>	4.0340	5.5459
<b>SD</b>	0%	0%
<b>SEM</b>	0%	0%

*Fuente: Elaboración Propia*

**ANALISIS DE VARIANZA DE UNA VIA EMITIDO POR SIGMA  
PLOT 12.5**

**One Way Analysis of Variance**

**Data source:** Data 1 in Notebook1

**Normality Test (Shapiro-Wilk)** Passed (P = 0.683)

**Equal Variance Test:** Failed (P < 0.050)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1	2	0	0.4030	0.00001410	0.0000100
Col 2	2	0	0.434	0.000	0.000

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	10.000	960	96.000	9603801.000	<0.001
Residual	20.000	0.000	0.000		
Total	30.000	960			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0.001).

Power of performed test with  $\alpha = 0.050$ : 1.000

Multiple Comparisons versus Control Group (Dunnett's Method):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	q'	P	P<0.050
Col 1 vs. Col 2	0.0310	3099.000	<0.001	Yes



**LECTURA DEL NIVEL DE ACTIVIDAD DE CASPASAS (RLU) DE LA  
LINEA CELULAR ASPC-1 TRAS 12 HORAS DE TRATAMIENTO**

Nivel de Actividad de Caspasas-3/7 (RLU)		
	Control Negativo	30µg/mL
	4.0340	5.9496
	4.0328	5.9399
<b>Promedio</b>	4.0340	5.9448
<b>SD</b>	0%	1%
<b>SEM</b>	0%	0%

*Fuente: Elaboración Propia*

**ANALISIS DE VARIANZA DE UNA VIA EMITIDO POR SIGMA  
PLOT 12.5**

**One Way Analysis of Variance**

**Data source:** Data 1 in Notebook1

**Normality Test (Shapiro-Wilk)** Failed ( $P < 0.050$ )

**Equal Variance Test:** Passed ( $P = 1.000$ )

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1	2	0 0.461	0.000	0.000	
Col 2	2	0 0.595	0.000	0.000	

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	10.0179	0.0179		>1e40	<0.001
Residual	2	0.000	0.000		
Total	30.0179				

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ( $P = <0.001$ ).

Power of performed test with  $\alpha = 0.050$ : 1.000

Multiple Comparisons versus Control Group (Dunnett's Method):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	q'	P	P<0.050
Col 1 vs. Col 20.134		(+inf)	<0.001	Yes



**LECTURA DEL NIVEL DE ACTIVIDAD DE CASPASAS (RLU) DE LA  
LINEA CELULAR PC-3 TRAS 3 HORAS DE TRATAMIENTO**

Nivel de Actividad de Caspasas-3/7 (RLU)		
	Control Negativo	30µg/mL
	4.1542	1.0053
	4.1498	1.0050
<b>Promedio</b>	4.1520	1.0051
<b>SD</b>	0%	0%
<b>SEM</b>	0%	0%

*Fuente: Elaboración Propia*

**ANALISIS DE VARIANZA DE UNA VIA EMITIDO POR SIGMA  
PLOT 12.5**

**One Way Analysis of Variance**

**Data source:** Data 1 in Notebook1

**Normality Test (Shapiro-Wilk)** Failed ( $P < 0.050$ )

**Equal Variance Test:** Passed ( $P = 1.000$ )

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1	2	0	4.154	0.000	0.000
Col 2	2	0	3.575	0.000	0.000

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	0.335	0.335	>1e40	<0.001
Residual	2	0.000	0.000		
Total	3	0.335			

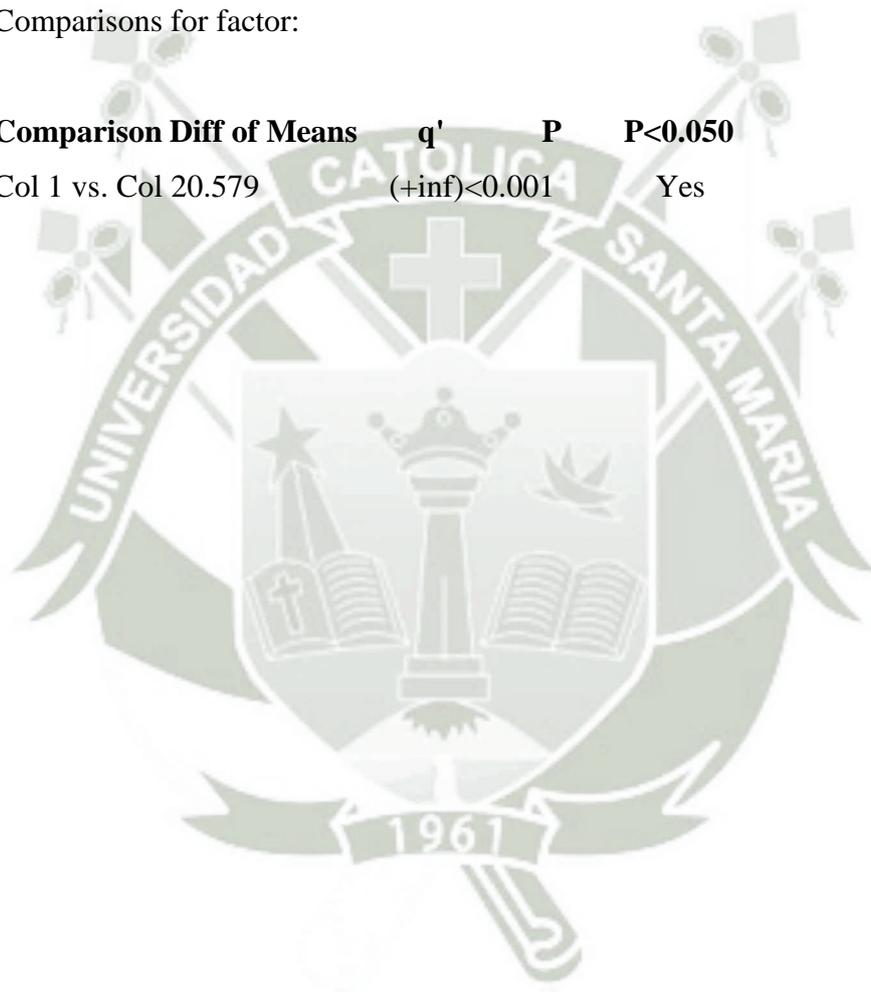
The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ( $P = <0.001$ ).

Power of performed test with  $\alpha = 0.050$ : 1.000

Multiple Comparisons versus Control Group (Dunnett's Method):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	q'	P	P<0.050
Col 1 vs. Col 20	579	(+inf)	<0.001	Yes



**LECTURA DEL NIVEL DE ACTIVIDAD DE CASPASAS (RLU) DE LA  
LINEA CELULAR PC-3 TRAS 6 HORAS DE TRATAMIENTO**

Nivel de Actividad de Caspasas-3/7 (RLU)		
	Control Negativo	30µg/mL
	4.1541	3.5751
	4.1538	3.5753
<b>Promedio</b>	4.1540	3.5752
<b>SD</b>	0%	0%
<b>SEM</b>	0%	0%

*Fuente: Elaboración Propia*

**ANALISIS DE VARIANZA DE UNA VIA EMITIDO POR SIGMA  
PLOT 12.5**

**One Way Analysis of Variance**

**Data source:** Data 1 in Notebook1

**Normality Test (Shapiro-Wilk)** Passed (P = 0.207)

**Equal Variance Test:** Failed (P < 0.050)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1	2	0	2.3850.00002830.0000200		
Col 2	2	0	1.0050.00002120.0000150		

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	1.904	1.904	3046885441.966	<0.00
Residual		20.000000001250.000000000625			
Total	3	1.904			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0.001).

Power of performed test with  $\alpha = 0.050$ : 1.000

Multiple Comparisons versus Control Group (Dunnett's Method):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	q'	P	P<0.050
Col 1 vs. Col 2	21.380	55198.600	<0.001	Yes



**LECTURA DEL NIVEL DE ACTIVIDAD DE CASPASAS (RLU) DE LA  
LINEA CELULAR PC-3 TRAS 12 HORAS DE TRATAMIENTO**

Nivel de Actividad de Caspasas-3/7 (RLU)		
	Control Negativo	30µg/mL
	4.1543	1.7177
	4.1541	1.7119
<b>Promedio</b>	4.1542	1.7148
<b>SD</b>	0%	0%
<b>SEM</b>	0%	0%

*Fuente: Elaboración Propia*

**ANALISIS DE VARIANZA DE UNA VIA EMITIDO POR SIGMA  
PLOT 12.5**

**One Way Analysis of Variance**

**Data source:** Data 1 in Notebook1

**Normality Test (Shapiro-Wilk)** Passed (P = 0.348)

**Equal Variance Test:** Failed (P < 0.050)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1	2	0	0.5740.00002120.0000150		
Col 2	2	0	1.7180.00001410.0000100		

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	1.307	1.307	4022833017.279	<0.0
Residual		20.0000000006500.000000000325			
Total	3	1.307			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0.001).

Power of performed test with  $\alpha = 0.050$ : 1.000

Multiple Comparisons versus Control Group (Dunnett's Method):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	q'	P	P<0.050
Col 1 vs. Col 2	1.143	63425.807	<0.001	Yes



## ANEXO 4

### LECTURA DE ABSORBANCIAS DE LACTATO DESHIDROGENASA DE LA LINEA CELULAR ASPC-1 TRAS 24 HORAS DE TRATAMIENTO

Blanco	Control Negativo	Control Positivo	30 $\mu$ g	$\lambda$
0.389	0.609	3.469	0.487	490nm
0.041	0.048	0.124	0.048	680nm
0.403	0.546	3.551	0.593	490nm
0.042	0.045	0.118	0.048	680nm
0.418	0.582	3.609	0.591	490nm
0.044	0.046	0.144	0.051	680nm

*Fuente: Elaboración Propia*

Nivel de Citotoxicidad LDH (A490nm-680nm)			
	Control Negativo	Control Positivo	30 $\mu$ g
	0.200	2.984	0.078
	0.140	3.072	0.184
	0.175	3.104	0.179
<b>PROMEDIO</b>	0.172	3.053	0.147
<b>SD</b>	3%	6%	6%
<b>SEM</b>	2%	4%	3%

*Fuente: Elaboración Propia*

### ANALISIS DE VARIANZA DE UNA VIA EMITIDO POR SIGMA PLOT 12.5

#### One Way Analysis of Variance

**Data source:** Data 1 in Notebook1

**Normality Test (Shapiro-Wilk)** Passed (P = 0.366)

**Equal Variance Test:** Passed (P = 0.161)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1	3	0	0.172	0.0301	0.0174
Col 2	3	0	2.953	0.168	0.0971
Col 3	3	0	0.147	0.0598	0.0345

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	2	15.614	7.807	715.208	<0.001
Residual	6	0.0655	0.0109		
Total	8	15.679			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ( $P = <0.001$ ).

Power of performed test with  $\alpha = 0.050$ : 1.000

Multiple Comparisons versus Control Group (Dunnett's Method):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	q'	P	P<0.050
Col 1 vs. Col 2	22.782	32.608	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 3	30.0247	0.289	0.941	No

**LECTURA DE ABSORBANCIAS DE LACTATO DESHIDROGENASA  
DE LA LINEA CELULAR PC-3 TRAS 24 HORAS DE TRATAMIENTO**

Blanco	Control Negativo	Control Positivo	30 $\mu$ g	$\lambda$
0.451	1.165	3.371	3.229	490nm
0.042	0.075	0.137	0.053	680nm
0.469	1.169	3.469	3.196	490nm
0.042	0.068	0.135	0.031	680nm
0.488	1.167	3.476	3.228	490nm
0.069	0.069	0.134	0.083	680nm

*Fuente: Elaboración Propia*

Nivel de Citotoxicidad LDH (A490nm-680nm)			
	Control Negativo	Control Positivo	30 $\mu$ g
	0.672	2.816	2.758
	0.683	2.916	2.747
	0.678	2.924	2.727
<b>PROMEDIO</b>	0.678	2.885	2.744
<b>SD</b>	1%	6%	2%
<b>SEM</b>	0%	3%	1%

*Fuente: Elaboración Propia*

**ANALISIS DE VARIANZA DE UNA VIA EMITIDO POR SIGMA  
PLOT 12.5**

**One Way Analysis of Variance**

**Data source:** Data 1 in Notebook1

**Normality Test (Shapiro-Wilk)** Passed (P = 0.065)

**Equal Variance Test:** Passed (P = 0.502)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1	3	0	0.4180	0.00902	0.00521
Col 2	3	0	1.0960	0.00569	0.00328
Col 3	3	0	3.303	0.0602	0.0347

Col 4            3            0 3.162 0.0157 0.00907

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	3	319.101	6.367	6395.886	<0.001
Residual	80	0.007960	0.000996		
Total	83	1119.109			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ( $P = <0.001$ ).

Power of performed test with  $\alpha = 0.050$ : 1.000

Multiple Comparisons versus Control Group (Dunnett's Method) :

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	q'	P	P<0.050
Col 1 vs. Col 3	2.885	111.988	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 4	2.744	106.502	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 2	0.678	26.318	<0.001	Yes