

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS BIOQUÍMICAS Y
BIOTECNOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIPROLIFERATIVO Y APOPTÓTICO
DEL EXTRACTO EN ACETATO DE ETILO DE LAS HOJAS DE *Annona
muricata* (Guanábana) SOBRE CÉLULAS CANCERÍGENAS (PC-3) Y
CÉLULAS EPITELIALES SANAS DE PRÓSTATA HUMANA (HPrEC),
BOSTON, MA 2016”**

Tesis presentada por:

Bach. CONDORI QUISPE, María Elena

Bach. OVIEDO ALVAREZ, Marian Dayana

Para optar el Título Profesional de:

QUÍMICO FARMACÉUTICO

Asesor: Dra. Karin J. Vera López

Arequipa - Perú

2017

RESUMEN

El cáncer de próstata es la causa más común de muerte en pacientes varones, mayores de 75 años de edad, según el INEN se reportaron 5528 casos nuevos de cáncer de próstata en el periodo 2006-2015; esta neoplasia es considerada un problema de salud pública, no solo por ser el más frecuente en varones sino también por los costos elevados que requiere su tratamiento.

Los principales tipos de tratamiento para el cáncer de próstata son: cirugía, radioterapia, quimioterapia y la terapia hormonal; sin embargo la mayoría de los pacientes que padecen esta enfermedad reciben más de un tipo de tratamiento, además los medicamentos que reciben producen efectos secundarios no deseados, por lo que la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento son altamente requeridas.

El uso de la medicina natural está al alcance de la población social y económicamente menos favorecida, por lo que hacen uso de las plantas medicinales (hojas, flores, semillas cortezas, raíces, etc.) con propiedades curativas, y en nuestro país la *Annona muricata* (Guanábana) es una de estas plantas ya que en los últimos años, el extracto de ésta ha llegado a ser aclamado por tener propiedades altamente potentes para combatir el cáncer.

En el presente estudio se determinó el efecto del extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana) mediante el ensayo de viabilidad celular (MTS) tanto en células de cáncer de próstata (PC-3) y en células epiteliales sanas de

próstata humana (HPrEC), a las 24, 48 y 72 horas, luego de ser expuestas al tratamiento en las siguientes concentraciones: 1, 3, 10, 30 y 50 $\mu\text{g/mL}$, encontrándose que este extracto posee un efecto apoptótico y antiproliferativo en ambas líneas celulares, siendo la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ la de mayor efectividad; dicho efecto fue reflejado en la disminución de la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2, el aumento de la expresión de la proteína pro-apoptótica Bax y un efecto nulo sobre la proteína p53, esto se realizó mediante la técnica de Western Blot, aplicando a las PC-3 el tratamiento con la concentración de mayor efectividad (10 $\mu\text{g/mL}$).

Se determinó el efecto del extracto sobre la actividad de la caspasa-3, encontrándose un incremento significativo en la actividad de esta. Concluyéndose así que el extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana) induce a la muerte celular en las PC-3 y las HPrEC.

Palabras clave: *Annona muricata*, cáncer, próstata, apoptosis.



ABSTRACT

Prostate cancer is the most common cause of death in male patients over 75 years of age, according to the INEN reported 5528 new cases of prostate cancer in the period 2006-2015; This neoplasm is considered a public health problem, not only because it is the most frequent in men but also because of the high costs that its treatment requires.

The main types of treatment for prostate cancer are: surgery, radiation therapy, chemotherapy and hormone therapy; However most patients suffering from this disease receive more than one type of treatment, in addition the drugs they receive produce unwanted side effects, so the search for new treatment alternatives are highly required.

The use of natural medicine is within the reach of the socially and economically less favored population, so they make use of medicinal plants (leaves, flowers, seeds, barks, roots, etc.) with healing properties, and in our country the *Annona Muricata* (Guanabana) is one of these plants since in the last years the extract of this one has come to be hailed for having highly potent properties to combat cancer.

In the present study, the effect of the ethyl acetate extract of the leaves of *Annona muricata* (Guanabana) was determined by the cell viability assay (MTS) in both prostate cancer cells (PC-3) and healthy epithelial cells of Human prostate (HPrEC),

at 24, 48 and 72 hours, after being exposed to the treatment at the following concentrations: 1, 3, 10, 30 and 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$, being found that this extract has an apoptotic and antiproliferative effect in Both cell lines, with the concentration of 10 $\mu\text{g} / \text{mL}$ being the most effective; This effect was reflected in the decreased expression of the anti-apoptotic Bcl-2 protein, increased expression of the pro-apoptotic Bax protein and a null effect on the p53 protein, this was done using the Western Blot technique , Applying the treatment with the most effective concentration (10 $\mu\text{g} / \text{mL}$) to PC-3.

The effect of the extract on caspase-3 activity was determined, with a significant increase in caspase-3 activity. In conclusion, the ethyl acetate extract of the leaves of *Annona muricata* (Guanabana) induces cell death in PC-3 and HPrEC.

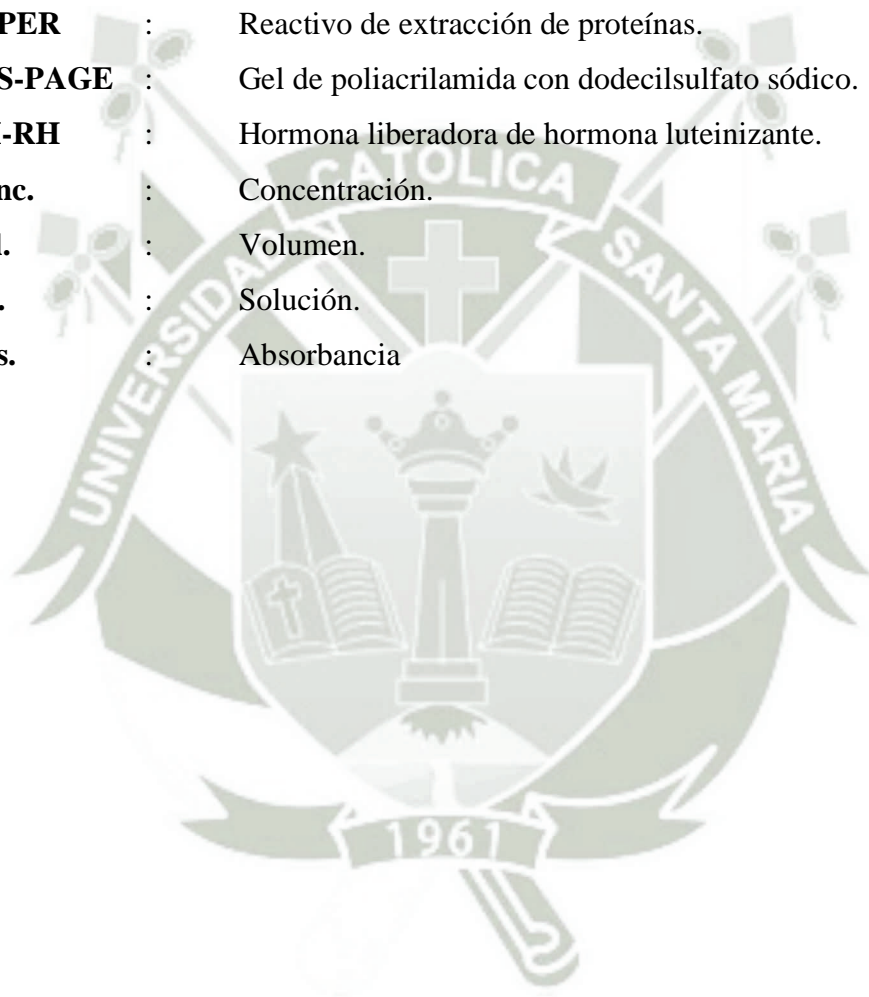
Keywords: *Annona muricata*, cancer, prostate, apoptosis.



LISTA DE ABREVIATURAS

PC-3	:	Células cancerígenas de próstata humana.
HPrEC	:	Células epiteliales sanas de próstata humana.
EAEAM	:	Extracto en acetato de etilo de las hojas de <i>Annona muricata</i>
MTS	:	[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio].
Bcl-2	:	Proteína anti-apoptótica.
Bax	:	Proteína pro-apoptótica.
p53	:	Proteína codificada por el gen supresor de tumor p53.
INEN	:	Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas.
INC	:	Instituto Nacional del Cáncer.
PSA	:	Antígeno prostático específico.
ADN	:	Ácido desoxirribonucleico.
TNM	:	Sistema de estadificación del cáncer.
CaP	:	Cáncer de próstata.
PR	:	Prostatectomía radical.
PAKA-2	:	Carcinoma pancreático.
A-549	:	Carcinoma pulmonar.
HT-29	:	Adenocarcinoma de colon.
HCT-116	:	Adenocarcinoma de colon.
MCF-7	:	Carcinoma de mama.
KB	:	Carcinoma epidermoide.
NADH	:	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido.
AA	:	Acetogeninas anonáceas.
ATP	:	Adenosín trifosfato.
TNF	:	Factor de necrosis tumoral.
Fas	:	Proteína transmembrana.
FADD	:	Dominio de muerte asociado a Fas.
MME	:	Membrana mitocondrial externa.
RE	:	Retículo endoplasmático.
kDa	:	kilo Dalton.

DISC	:	Complejo de iniciación de señalización de muerte.
PT	:	Transición de poro.
BCA	:	Ácido bicinconánico
F-12K	:	Medio de Ham F12 modificado por Kaighn.
EDTA	:	Ácido etilendiaminotetraacético.
FBS	:	Suero bobino fetal.
PBS	:	Buffer fosfato salino.
PBS	:	Buffer fosfato salino de Dulbecco.
M-PER	:	Reactivo de extracción de proteínas.
SDS-PAGE	:	Gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.
LH-RH	:	Hormona liberadora de hormona luteinizante.
Conc.	:	Concentración.
Vol.	:	Volumen.
Sol.	:	Solución.
Abs.	:	Absorbancia



DEDICATORIA

Esta tesis se la dedicamos a nuestro **Dios**, quién supo guiarnos por el buen camino, darnos fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándonos a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento. A nuestra **madre María** por interceder por nosotras y permitirnos dar este gran paso en nuestra vida.

De manera especial, también dedicamos este trabajo de investigación a nuestros amados padres, **Néstor y Celia, Hernán y Nury**, por su comprensión, sus consejos, su amor y apoyo en los momentos difíciles, y por ayudarnos con los recursos necesarios para estudiar. Nos han dado todo lo que somos como persona, nuestros valores, nuestros principios, nuestro carácter, nuestro empeño, nuestra perseverancia, nuestro coraje para conseguir nuestros objetivos. A nuestros hermanos **Eloy, Fernando, José Luis y Rodrigo** por recordarnos siempre que podemos contar con ellos, y siempre darnos ánimos para concluir satisfactoriamente todo lo que nos hemos propuesto.

María Elena y Marian.

AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento a nuestra asesora Dra. Karin Vera López por su enseñanza, el apoyo y tiempo incondicional brindado durante la redacción de este trabajo de investigación.

De manera especial, agradecemos a Dr. Alejandro Pino Figueroa por la oportunidad, conocimientos y la confianza brindada en la ejecución de esta investigación.

A nuestros padres quienes a lo largo de toda nuestra vida han apoyado y motivado nuestra formación académica, creyendo en nosotras en todo momento y no dudaron de nuestras habilidades.

Nuestro agradecimiento a Akshay Vora, por su paciencia, amistad, orientación y conocimientos aportados en esta investigación

A nuestros amigos Alejandro Rondón, Emille Flores y Kuljeet Singh por su apoyo y colaboración en el proceso de este trabajo.

Finalmente un eterno agradecimiento a la Universidad Católica de Santa María y a nuestros profesores de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica. Muchas gracias.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	iv
LISTADO DE ABREVIATURAS	vi
DEDICATORIA	vii
AGRADECIMIENTOS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiv
ÍNDICE DE TABLAS	xviii
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS.....	3
OBJETIVOS	4
OBJETIVO GENERAL.....	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
CAPITULO I.....	5
MARCO TEÓRICO.....	6
1. Cáncer de Próstata.....	6
1.1 Definición.....	6
1.2 Etiología	6
1.3 Epidemiología	7
1.4 Factores de Riesgo	7
1.5 Estadios del Cáncer de Próstata	8
1.6 Sintomatología	9
1.7 Diagnóstico.....	9
1.7.1 Tacto rectal.....	9
1.7.2 Concentración sérica del Antígeno prostático específico (PSA)	10
1.7.3 Biopsia.....	10
1.8 Tratamientos.....	11
1.8.1 Prostatectomía.....	11
1.8.2 Radioterapia	11

1.8.3	Terapia hormonal	12
1.8.4	Quimioterapia.....	12
2.	<i>Annona muricata</i>	13
2.1.	Origen.....	13
2.2.	Taxonomía.....	14
2.3.	Descripción botánica	14
2.4.	Acetogeninas	15
2.5.	Actividad anticancerígena de <i>Annona muricata</i>	17
3.	Apoptosis	19
3.1.	Vía Extrínseca	20
3.2.	Vía Intrínseca	21
4.	Familia Bcl-2	22
4.1.	Proteína Anti-apoptótica (Bcl-2).....	23
4.2.	Proteína Pro-apoptótica (Bax).....	24
4.3.	Proteínas tipo BH3.....	25
5.	Proteína p53.	25
6.	Caspasas.....	27
7.	Células cancerígenas de próstata (PC-3).....	29
8.	Células epiteliales sanas de próstata humana (HPrEC).	29
9.	ENSAYOS EN LÍNEAS CELULARES.....	30
9.1.	Viabilidad celular.....	30
9.2.	Western blot.....	31
9.3.	Ensayo colorimétrico de la caspasa-3.....	31
CAPITULO II		33
1.	MATERIALES	34
1.1.	MATERIAL BIOLÓGICO	34
1.1.1.	Líneas celulares.....	34
1.2.	MATERIAL DE LABORATORIO	34
1.2.1.	Equipos	34
1.2.2.	Reactivos.....	35
1.2.3.	Material de vidrio y otros.....	36
1.3.	LUGAR DE REALIZACIÓN.....	36

2. MÉTODOS	36
2.1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO.....	36
2.2. CULTIVO CELULAR.....	37
2.2.1.DESCONGELACIÓN Y SIEMBRA DEL CULTIVO CELULAR PRIMARIO DE PC-3 Y HPrEC	37
2.2.2.SUBCULTIVO DE LAS LÍNEAS CELULARES	38
2.2.3.CONTEO DE CÉLULAS	40
2.3. PREPARACIÓN Y ADMINISTRACIÓN DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO DE ANNONA MURICATA (EAEAM) SOBRE AMBAS CÉLULAS.	41
2.3.1.PREPARACIÓN DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO DE ANNONA MURICATA (EAEAM, TRATAMIENTO).....	41
2.3.2.ADMINISTRACIÓN DEL TRATAMIENTO SOBRE LAS CÉLULAS PC-3 Y HPrEC.	44
2.4. ENSAYO DE VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS FRENTE AL TRATAMIENTO	45
2.4.1.PORCENTAJE DE CÉLULAS VIABLES	45
2.5. DETECCIÓN DE Bcl-2, Bax Y p53 EN CÉLULAS PC-3 CON TRATAMIENTO (EAEAM)	46
2.5.1.LISADO CELULAR	46
2.5.2.CUANTIFICACIÓN PROTÉICA	47
2.5.3.WESTERN BLOT	48
2.6. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA CASPASA-3 EN CÉLULAS PC-3 FRENTE AL TRATAMIENTO (EAEAM)	50
2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	51
CAPITULO III.....	52
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
1. CULTIVO CELULAR.....	53
2. VIABILIDAD CELULAR.....	56
3. DETECCIÓN DE Bcl-2, Bax Y p53.....	67
4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA CASPASA 3.	76

CAPITULO IV	79
CONCLUSIONES	80
SUGERENCIAS	81
REFERENCIAS	82
ANEXOS.....	96



ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.Nº 1: Guanábana (<i>Annona muricata</i>).....	14
Fig.Nº 2: Estructura de la Annonacina.....	17
Fig.Nº 3: Representación esquemática del ciclo celular	18
Fig.Nº 4: Traslocación 14, 18 del gen de la proteína Bcl-2 presente en el linfoma folicular de los linfocitos B según lo propuesto por Tsujimoto y colaboradores, 1987	22
Fig.Nº 5: Las capas se sintetizan como procaspasas y constan de un dominio N-terminal (PRO) y dos subunidades, una grande P20 y otro menor p10. Se indica la posición de los ácidos espárticos (D) de escisión de la procaspasa para activarse a caspasa	28
Fig.Nº 6: Reacción del ensayo de MTS	31
Fig.Nº 7: Nuevo pase de la línea celular PC-3 (células cancerígenas de próstata humana).	39
Fig.Nº 8: Nuevo pase de la línea celular HPrEC (células epiteliales sanas de próstata humana).	40
Fig.Nº 9: Contador automático de células (Nexcelom Bioscience® Auto T4)	41
Fig.Nº 10: Microplaca transparente de 96 pozos con soluciones estándar de albúmina y lisado celular.....	48
Fig.Nº 11: Equipo para realizar la electroforesis	49
Fig.Nº 12: Imagen al microscopio del cultivo de células cancerígenas de próstata humana (PC-3) al primer día del pase.	53
Fig.Nº 13: Imagen al microscopio del cultivo de células cancerígenas de próstata humana (PC-3) al tercer día del pase.....	54
Fig.Nº 14: Imagen al microscopio del cultivo de células epiteliales sanas de próstata humana (HPrEC) al primer día del pase.....	55
Fig.Nº 15: Imagen al microscopio del cultivo de células epiteliales sanas de próstata humana (HPrEC) al quinto día del pase.	55

Fig.Nº 16: Efecto del extracto en acetato de etilo de las hojas de <i>Annona muricata</i> (EAEAM) sobre la viabilidad celular durante 24 horas de aplicación en células cancerígenas de próstata humana (PC-3).	57
Fig.Nº 17: Efecto del extracto en acetato de etilo de las hojas de <i>Annona muricata</i> (EAEAM) sobre la viabilidad celular durante 48 horas de aplicación en células cancerígenas de próstata humana (PC-3).	58
Fig.Nº 18: Efecto del extracto en acetato de etilo de las hojas de <i>Annona muricata</i> (EAEAM) sobre la viabilidad celular durante 72 horas de aplicación en células cancerígenas de próstata humana (PC-3).	59
Fig.Nº 19: Viabilidad porcentual de células cancerígenas de próstata humana (PC-3) expuestas a distintas concentraciones de extracto en acetato de etilo de las hojas de <i>Annona muricata</i> (EAEAM) durante 24, 48 y 72 horas.	59
Fig.Nº 20: Efecto del extracto en acetato de etilo de las hojas de <i>Annona muricata</i> (EAEAM) sobre la viabilidad celular durante 24 horas de aplicación en células epiteliales sanas de próstata humana (HPrEC).	61
Fig.Nº 21: Efecto del extracto en acetato de etilo de las hojas de <i>Annona muricata</i> (EAEAM) sobre la viabilidad celular durante 48 horas de aplicación en células epiteliales sanas de próstata humana (HPrEC).	62
Fig.Nº 22: Efecto del extracto en acetato de etilo de las hojas de <i>Annona muricata</i> (EAEAM) sobre la viabilidad celular durante 72 horas de aplicación en células epiteliales sanas de próstata humana (HPrEC).	63
Fig.Nº 23: Viabilidad porcentual de células epiteliales sanas de próstata humana (HPrEC) expuestas a distintas concentraciones de extracto en acetato de etilo de las hojas de <i>Annona muricata</i> (EAEAM) durante 24, 48 y 72 horas.	64
Fig.Nº 24: Efecto del extracto en acetato de etilo de las hojas de <i>Annona muricata</i> (EAEAM) sobre la viabilidad celular durante 24 horas	

de aplicación en células cancerígenas (PC-3) y en células epiteliales sanas de próstata humana (HPrEC).....	65
Fig.Nº 25: Efecto del extracto en acetato de etilo de las hojas de <i>Annona muricata</i> (EAEAM) sobre la viabilidad celular durante 48 horas de aplicación en células cancerígenas (PC-3) y en células epiteliales sanas de próstata humana (HPrEC).....	65
Fig.Nº 26: Efecto del extracto en acetato de etilo de las hojas de <i>Annona muricata</i> (EAEAM) sobre la viabilidad celular durante 72 horas de aplicación en células cancerígenas (PC-3) y en células epiteliales sanas de próstata humana (HPrEC).....	66
Fig.Nº 27: Curva de calibración para determinación de concentración proteica (562 nm).	68
Fig.Nº 28: Bandas de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 (26 kDa) detectadas mediante el análisis de Western Blot utilizando lisados celulares de PC-3 tratados con extracto en acetato de etilo de las hojas de <i>Annona muricata</i> (EAEAM) de 10 µg/mL.	70
Fig.Nº 29: Expresión de Bcl-2 en células cancerígenas (PC-3).tratadas con extracto en acetato de etilo de las hojas de <i>Annona muricata</i> (EAEAM) de 10 µg/mL.	71
Fig.Nº 30: Bandas de la proteína pro-apoptótica Bax (21 kDa) detectadas mediante el análisis de Western Blot utilizando lisados celulares de PC-3 tratados con extracto en acetato de etilo de las hojas de <i>Annona muricata</i> (EAEAM) de 10 µg/mL	72
Fig.Nº 31: Expresión de Bax en células cancerígenas (PC-3).tratadas con extracto en acetato de etilo de las hojas de <i>Annona muricata</i> (EAEAM) de 10 µg/mL.	72
Fig.Nº 32: Bandas de la proteína p53 (53 kDa) detectadas mediante el análisis de Western Blot utilizando lisados celulares de PC-3 tratados con extracto en acetato de etilo de las hojas de <i>Annona muricata</i> (EAEAM) de 10 µg/mL.	73

Fig.Nº 33: Actividad de la caspasa-3 en PC-3 frente al tratamiento de 10 $\mu\text{g/mL}$ del extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata*. 77



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Estadios del cáncer de próstata	8
Tabla 2: Taxonomía de <i>Annona muricata</i> “Guanábana”	15
Tabla 3: Preparación de soluciones a partir de solución madre o stock (20000 ug/mL).....	42
Tabla 4: Preparación de diferentes concentraciones de extracto en acetato de etilo de las hojas de <i>Annona muricata</i>	43
Tabla 5: Tabla del tratamiento aplicado a células PC-3 y HPrEC.	44
Tabla 6: Promedio del porcentaje de viabilidad celular frente a las distintas concentraciones del extracto en acetato de etilo de las hojas de <i>Annona muricata</i> (EAEAM) en células de cáncer de próstata (PC- 3).....	60
Tabla 7: Promedio del porcentaje de viabilidad celular frente a las distintas concentraciones del extracto en acetato de etilo de las hojas de <i>Annona muricata</i> (EAEAM) en células epiteliales sanas de próstata humana (HPrEC).	64
Tabla 8: Absorbancias obtenidas de la albúmina (estándares) y las muestras en el ensayo de BCA	68
Tabla 9: Valores obtenidos a partir de la curva de calibración de albúmina.	69

INTRODUCCIÓN

El cáncer es la multiplicación rápida de células anormales, pueden invadir partes adyacentes del cuerpo y propagarse a otros órganos, este proceso se denomina «metástasis». Las metástasis son la causa principal de muerte por cáncer.¹

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo. En 2012 se registraron alrededor de 14 millones de nuevos casos y en 2015, ocasionó 8,8 millones de defunciones.² En el Perú, el Registro de Cáncer de Lima Metropolitana evidenció que las tasas de incidencia para todos los cánceres en hombres y mujeres han aumentado entre los periodos 1968-1970 y 2004-2005 de 152,2 a 174,0 por 100 000 hombres y de 166,8 a 187,0 por 100 000 mujeres.

El cáncer de próstata es la causa más común de muerte en pacientes varones, mayores de 75 años de edad, durante el año 2012 se estimaron 1.111.689 nuevos casos y de 307.471 muertes, a nivel mundial.³

Según el proyecto GLOBOCAN para el año 2012, se reportaron 4142 casos nuevos de cáncer de próstata en el Perú; y según el INEN se reportaron 5528 casos nuevos de cáncer de próstata en el periodo 2006-2015; esta neoplasia es considerada un problema de salud pública no solo por ser el más frecuente en varones mayores de 50 años sino también por los costos elevados que requiere su tratamiento.

Según el Instituto Nacional del Cáncer los principales tipos de tratamiento para el cáncer de próstata son: cirugía, radioterapia, quimioterapia y la terapia hormonal; sin embargo la mayoría de los pacientes que padecen esta enfermedad reciben más de un tipo de tratamiento.

Se usa la quimioterapia cuando el tratamiento hormonal no funciona, para esta terapia se usan medicamentos como la dexametasona, estramustina, vinblastina, docetaxel, carboplatino; a veces se requiere la administración de dos o más drogas en conjunto para mejorar la efectividad del tratamiento, por tal motivo los costos de tratamiento para el cáncer de próstata se elevan mucho, además éstos medicamentos producen efectos secundarios no deseados, por lo que la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento son altamente requeridas.

El uso de la medicina natural está al alcance de la población social y económicamente menos favorecida. En la actualidad grandes sectores de la población peruana y específicamente en las zonas rurales, vienen utilizando, a través de muchas generaciones las plantas medicinales; hojas, flores, semillas cortezas, raíces, etc. con propiedades curativas en forma de infusión, cocimiento, baños, emplastos, frotaciones y otros.⁴

En la medicina natural las plantas medicinales juegan un papel muy importante y en nuestro país la *Annona muricata* (Guanábana) es una de estas plantas ya que en los últimos años, el extracto de ésta ha llegado a ser ampliamente aclamado por tener propiedades altamente potentes para combatir el cáncer.⁵

En busca de nuevas alternativas terapéuticas de menor costo y que no produzcan efectos secundarios, es que en la presente investigación se propuso evaluar el efecto apoptótico y antiproliferativo del extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana) en las células cancerígenas (PC-3) y células epiteliales sanas de próstata humana (HPrEC).



HIPÓTESIS

Dado que se ha demostrado que el extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana) tiene efecto anticancerígeno en diferentes tipos de cáncer, es probable que el extracto de dicha especie vegetal posea un efecto antiproliferativo y apoptótico sobre las células cancerígenas (PC-3) y células epiteliales sanas de próstata humana (HPrEC) “*in vitro*”.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana) en las células cancerígenas (PC-3) y células epiteliales sanas de próstata humana (HPrEC).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener una confluencia celular óptima de los cultivos celulares de células cancerígenas (PC-3) y células epiteliales sanas de próstata humana (HPrEC).
2. Evaluar la viabilidad en células cancerígenas (PC-3) y células epiteliales sanas de próstata humana (HPrEC) tratadas con el extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana) a diferentes concentraciones, y determinar la concentración del extracto de mejor efecto antiproliferativo y apoptótico.
3. Determinar el efecto “*in vitro*” del extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana) sobre las proteínas que intervienen en la apoptosis: Bax, Bcl-2 y p53, mediante Western blot.
4. Determinar el efecto del extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana) sobre la enzima cisteín-proteasa caspasa-3, mediante colorimetría.



I. MARCO TEÓRICO

1. Cáncer de Próstata

1.1 Definición

La próstata es una glándula que sólo tienen los hombres. Esta glándula produce parte del líquido que conforma el semen. El cáncer de próstata es una neoplasia maligna que se presenta principalmente en varones de edad avanzada (65 años), se origina cuando las células de la próstata comienzan a crecer sin control.⁶

1.2 Etiología

El cáncer de próstata es una enfermedad multifactorial, en la que participan principalmente factores hormonales, además de los relacionados con la raza, la dieta y una historia familiar de cáncer prostático. La unidad funcional de la próstata es el acino, compuesto por elementos epiteliales y estromales, separados por una membrana basal. En el acino prostático predominan las células glandulares y son el sitio donde se produce y secreta el Antígeno Prostático Específico (PSA) y la fosfatasa ácida, los cuales son excretados con el líquido de la eyaculación. El crecimiento de estas células depende de la acción androgénica.⁷

El crecimiento y la maduración del epitelio prostático dependen de los niveles periféricos de testosterona y de la conversión de la misma a dihidrotestosterona, por acción de la enzima 5-alfa reductasa, a nivel celular, dentro de la glándula.⁸

Dentro de la célula prostática, la dihidrotestosterona se liga al receptor de andrógeno y forma un complejo (dihidrotestosterona-receptor androgénico) que interactúa con secuencias específicas de ADN,

alterando la regulación celular. El cáncer prostático se origina por el crecimiento clonal de una célula epitelial alterada en su genoma.⁹

1.3 Epidemiología

El cáncer de próstata es la causa más común de muerte en pacientes varones, mayores de 75 años de edad, durante el año 2012 se estimaron 1.111.689 nuevos casos y de 307.471 muertes, a nivel mundial.³ En los Estados Unidos es la neoplasia no cutánea más frecuente, durante el 2011 se estimaron, 240.890 casos nuevos diagnosticados y 33.730 hombres fallecieron por esta enfermedad.¹⁰

Según el proyecto GLOBOCAN para el año 2012, se reportaron 4142 casos nuevos de cáncer de próstata en el Perú; esta neoplasia es considerada un problema de salud pública no solo por ser el más frecuente en varones mayores de 50 años sino también por los costos elevados que requiere su tratamiento.

1.4 Factores de Riesgo

Un factor de riesgo es todo aquello que afecta la probabilidad de que la persona padezca una enfermedad como, por ejemplo, el cáncer.¹¹

El hecho de presentar alguno de estos factores de riesgo no implica que una persona vaya a desarrollar necesariamente un cáncer de próstata a lo largo de su vida. Muchas personas con uno o más factores de riesgo nunca padecen cáncer, mientras que otras que padecen la enfermedad puede que hayan tenido pocos factores de riesgo conocidos o ninguno de éstos.¹¹

Los investigadores han descubierto varios factores de riesgo que pueden afectar el riesgo de que un hombre padezca cáncer de próstata: ^(11, 12)

- Edad.
- Raza.
- Antecedentes familiares.

- Cambios genéticos.
- Alimentación.
- Obesidad.
- Tabaquismo.
- Exposición a sustancias químicas.

1.5 Estadíos del Cáncer de Próstata

Los médicos utilizan la estadificación para evaluar la extensión del cáncer y el pronóstico del paciente. Suele utilizarse el sistema de estadificación TNM, que tiene en cuenta la combinación de T (tamaño del tumor e invasión de los tejidos cercanos), N (implicación de los ganglios linfáticos) y M (metástasis* o difusión del cáncer a otros órganos del cuerpo) para clasificar el cáncer en uno de los estadios que se indican a continuación.¹²

En la Tabla 1 se muestra los diferentes estadios del cáncer de próstata:

Tabla 1: Estadios del cáncer de próstata¹⁴

Estadio	Definición
Estadio I	El tumor únicamente afecta aun lóbulo de la próstata. Puede encontrarse en forma incidental por una biopsia posterior a la determinación de una alta concentración de PSA. El cáncer no se ha diseminado a los ganglios linfáticos ni a ninguna otra parte del cuerpo.
Estadio II	El tumor se ha expandido al otro lóbulo y puede afectar a toda la próstata sin salir de la cápsula que la rodea. El cáncer no se ha diseminado a los ganglios linfáticos ni a ninguna otra parte del cuerpo.
Estadio III	El tumor se ha extendido fuera de la próstata hasta las vesículas seminales, un par de glándulas situadas por encima de la próstata que secretan una importante proporción del líquido que contiene el semen. El cáncer no se ha diseminado a los ganglios linfáticos ni a ninguna otra parte del cuerpo, a excepción de las vesículas seminales.

Estadio IV	El tumor ha invadido las estructuras adyacentes, además de las vesículas seminales, por ejemplo: el recto, los músculos o la pared de la pelvis o, independientemente de la invasión de las estructuras adyacentes, se ha extendido a otras partes del cuerpo, incluyendo ganglios linfáticos y huesos.
------------	---

1.6 Sintomatología

A pesar de que la mayoría de cáncer de próstata no producirá signo ni síntoma alguno, cuando éstos aparecen son similares a los del aumento de tamaño de la próstata. ^(14,15)

- Problemas al orinar, incluyendo un flujo urinario lento o debilitado o necesidad de orinar con más frecuencia, especialmente de noche.
- Sangre en la orina o el semen.
- Disfunción eréctil.
- Dolor en las caderas, la espalda, el tórax u otras áreas debido a que el cáncer se ha propagado a los huesos.
- Debilidad o adormecimiento de las piernas o los pies, o incluso pérdida del control de la vejiga o los intestinos debido a que el cáncer comprime la médula espinal.

1.7 Diagnóstico

Los principales instrumentos diagnósticos para obtener indicios de cáncer prostático son:

1.7.1 Tacto rectal

El tacto rectal es un examen clínico para conocer el tamaño, la consistencia, la sensibilidad y los bordes de la próstata. Puesto

que esta glándula está situada por delante del recto, el médico puede palparla insertando un dedo con un guante lubricado en el recto.¹³

La mayor parte de los cánceres prostáticos se localizan en la zona periférica de la próstata y pueden detectarse mediante el tacto rectal cuando el volumen es de unos 0,2 ml o mayor.¹⁶

1.7.2 Concentración sérica del Antígeno prostático específico (PSA)

Es una proteína producida exclusivamente por la próstata. El análisis de PSA mide la concentración o el nivel de dicha sustancia en la sangre. Normalmente el PSA suele estar presente en la sangre, pero un aumento en su concentración podría indicar cáncer de próstata.¹³

La concentración de PSA es un parámetro continuo: cuanto mayor es el valor, más probabilidades hay de que exista un cáncer de próstata. Esto significa que no hay un valor umbral o límite superior aceptado de forma universal. El hallazgo de que muchos varones pueden tener un cáncer de próstata, a pesar de presentar concentraciones bajas de PSA, ha sido subrayado por los resultados recientes de un estudio de prevención estadounidense.¹⁷

1.7.3 Biopsia

En este procedimiento, se toman las muestras de tejido prostático de la glándula para analizar las células. Las muestras pueden obtenerse insertando una aguja a través del recto, el perineo o la uretra. Habitualmente se toman diferentes muestras de biopsia de diferentes partes de la próstata a la vez. Esto

permite al médico determinar dónde se encuentran las células, además de la extensión del cáncer. La decisión de realizar una biopsia o no se la debe hacer tomando en cuenta los hallazgos en el tacto rectal, el tamaño de la próstata, el origen étnico, edad, otras enfermedades que el paciente pueda tener, familiares con cáncer, el pudor del paciente, antecedente de otra biopsia de próstata.¹³

1.8 Tratamientos

1.8.1 Prostatectomía

El tratamiento quirúrgico del cáncer de próstata (CaP) consiste en una prostatectomía radical (PR), que supone la extirpación de toda la próstata entre la uretra y la vejiga, así como la resección de ambas vesículas seminales junto con tejido adyacente suficiente para obtener un borde negativo. El objetivo de una PR por cualquier abordaje ha de ser la erradicación de la enfermedad, al tiempo que se mantiene la continencia y, siempre que sea posible, la potencia sexual.¹⁸

No existe un umbral de edad para la PR y no debe descartarse este procedimiento basándose únicamente en la edad.¹⁸

Actualmente, los mejores candidatos para prostatectomía radical son pacientes con una expectativa de vida de 10 años o más, con tumor no palpable, de grado bajo o intermedio en la escala de Gleason, confinado a la próstata.¹⁹

1.8.2 Radioterapia

Los mejores candidatos son aquellos pacientes con tumores T1, T2a, bien o moderadamente diferenciados (Gleason < 7), sin metástasis ganglionares y con nivel sérico de PSA menor de 15 ng/mL. Para pacientes mayores de 65 años, constituye la mejor opción terapéutica. En pacientes con tumores localmente avanzados se prefiere la radioterapia conformacional o la radioterapia externa con dosis mayores a las convencionales, combinada con bloqueo androgénico total. Finalmente, la braquiterapia ofrece una atractiva alternativa en enfermedad temprana, ya que se puede administrar en una sola sesión en paciente ambulatorio, con riesgo de morbilidad menor que con radioterapia externa y/o conformacional y es aconsejable para pacientes que no sean candidatos a prostatectomía radical.²⁰

1.8.3 Terapia hormonal

El objetivo principal es suprimir los estímulos sobre la próstata por medio de supresión de la liberación de la hormona luteinizante hipofisaria. Para ello, se pueden utilizar estrógenos como el dietilbestrol (aunque su uso queda limitado, de momento, debido a su modesta duración en la acción, que no excede de 5-8 meses, y a las posibles complicaciones cardiovasculares), progestágenos como la medrosiprogesterona y antagonistas de la LH-RH como leuprolide, buserelina, goserelina, triptorelina (estos últimos bien sea solos o en combinación con otros procedimientos) y que estarían indicados en caso de cáncer de próstata andrógeno-dependiente avanzado con metástasis.²¹

1.8.4 Quimioterapia

En pacientes con cáncer de próstata avanzado, durante algún momento de su evolución la enfermedad llega a ser resistente a la

terapia hormonal. Es entonces cuando surge la necesidad de otra alternativa terapéutica eficaz. Durante muchos años se intentó mejorar la supervivencia y calidad de vida de estos pacientes utilizando quimioterapia paliativa. Fue hasta 1996 en que se demostró un beneficio con esta modalidad terapéutica, utilizando la combinación de mitoxantrona-prednisona. Desde entonces ésta fue considerada como la primera línea de quimioterapia para cáncer de próstata avanzado refractario a terapia hormonal. Recientemente, se han mejorado los resultados utilizando docetaxel combinado con prednisona o con fosfato de estramustina y se ha propuesto como primera línea una combinación que contenga docetaxel.²²

2. *Annona muricata*

2.1. Origen

La guanábana (Figura 1) es oriunda del Perú y se cultiva en la mayor parte de América tropical, en Colombia cuenta con pocas áreas sembradas, siendo muy escasos los cultivos tecnificados. Sin embargo, se puede mencionar cultivos en el Valle del Cauca, Santander, Huila y en el Caribe colombiano. La *Annona muricata*, guanábana o graviola, es un árbol endémico del Caribe, México, Centro y Sudamérica, estrechamente relacionado con la chirimoya, en la selva peruana, se cultiva en los Departamentos de Loreto, San Martín y Ucayali. La zona de producción en el Perú es la Selva central de Chanchamayo.²³



Fig.Nº 1: Guanábana (*Annona muricata*)

Fuente: www.ecured.cu

La *Annona muricata* (Guanábana), es un árbol pequeño y ramificado, con hojas gruesas y siempre verdes, brillantes en la parte inferior, de amplia distribución²⁴, en la cual se han encontrado más de 50 acetogeninas con diferentes actividades biológicas presentes en frutos, corteza y hojas; identificándose 21 acetogeninas citotóxicas en las hojas.²⁵ Se ha evaluado la actividad citotóxica in vitro de los extractos de la *Annona muricata* contra diversas líneas celulares tumorales como el carcinoma pancreático línea PAKA-2²⁶, cáncer prostático línea PC-3²⁷, carcinoma pulmonar(A-549), adenocarcinoma de colon(HT- 29), carcinoma de mama(MCF-7), carcinoma epidermoide (KB), células HepG2 o células de hepatoma humano.²⁸ Su actividad citotóxica se podría explicar por la presencia de la uvaricina, que es una acetogenina que estaría inhibiendo la enzima NADH, ubiquinona oxidoreductasa o complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial.²⁹

2.2. Taxonomía

La guanábana se clasifica de la siguiente manera:

Tabla 2: Taxonomía de *Annona muricata* “Guanábana”

Reino:	Planta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Magnoliales
Familia:	Annonaceae
Género:	Annona
Especie:	<i>Annona muricata</i>

Fuente: www.ecured.cu

2.3. Descripción botánica

La guanábana es un arbusto, perteneciente a la familia de las Anonáceas, que alcanza entre cinco y nueve metros de altura, de madera y hojas suaves, perennes, de 6 a 20 cm de largo y de 2 a 7 cm de ancho, de forma oblonga o elíptica. Crece bien en alturas inferiores de los 1000 msnm., en zonas de clima cálido y seco con temperaturas medias de 25 a 28°C.³⁰

La guanábana posee hojas alternas y sin estípulas; lamina sub-coracea, obovada, sub-ovada u oblongo elíptica de 5-18 cm de largo y 2-7 cm de ancho, márgenes enteros, ápice cortamente acuminados, base sub-cuneada, aguda u obusta; haz verde oscuro, brillante y glabro, envés verde amarillento y opaco, pinnatinerve; peciolo hasta 0.8 cm de largo.³⁰

Las flores son bisexuales solitarias o en pares en tallitos cortos que brotan de las ramas viejas. Cáliz con 3 sépalos diminutos e inconspicuos de color verde. Corola con 6 pétalos amarillo pálido; 3 pétalos exteriores acorazonados, grandes, gruesos y 3 pétalos interiores más pequeños y más delgados. Estambres y ovarios numerosos.³⁰

El fruto es una baya colectiva o sin carpo, ampliamente ovoide o elipsoide, verde de 15-40 cm de largo en la base debido a la polinización deficiente, está recubierta por espinas suaves carnosas que miden de 0.3-

0,5 cm de largo y están volteadas hacia el ápice; la cascara es delgada y coriácea y la pulpa es blanca, cremosa, carnososa, jugosa y subácida.³⁰

Las semillas del guanábano son lisas, de color marrón o crema y de forma elipsoidal a ovoide; presentan un arilo rudimentario y un hilo circular y estrecho, el cual rodea externamente al micrópilo.³⁰

La raíz es pivotante con un anclaje ramificado y fuerte. El sistema radical es poco profundo y bastante fibroso. El mayor porcentaje de raíces, se encuentra en los primeros 30 cm de profundidad y están distribuidas alrededor del tronco tallo.³⁰

2.4. Acetogeninas

La familia Annonaceae se caracteriza por la presencia de numerosas sustancias bioactivas de diversa naturaleza química, en hojas, raíz, corteza de tallo, frutas y semillas. De esta familia se han caracterizado y reportado como vitamina C, alcaloides, flavonoides y acetogeninas.³¹

Las acetogeninas anonáceas (AA) son metabolitos secundarios, aislados de plantas de la familia Annonaceae.³² Estas han sido empleadas como fungicidas, bactericidas, antihelmínticos, antivirales e insecticidas contra diversos tipos de insectos. La acción de las acetogeninas está basada en el hecho de que son, hasta ahora, los inhibidores más potentes y específicos del complejo I de la respiración mitocondrial.³³ Además de su reconocido efecto antiparasitario y antitumoral, las acetogeninas son importantes por la baja tasa de resistencia que podrían generar los insectos frente a ellas.³⁴

Aunque su biosíntesis aún no ha sido descrita, las acetogeninas parecen derivar de la ruta de los policétidos derivados de ácidos grasos, que al unirse enzimáticamente a una unidad de tres carbonos forman estructuras lineales y no lineales según los demás constituyentes de la estructura.³⁵ Las acetogeninas de *annonaceae* pueden inhibir selectivamente el crecimiento de las células cancerígenas y también inhibir el crecimiento de células resistentes. Las acetogeninas son

potentes inhibidores de la NADH ubiquinona oxidoreductasa, que es una enzima esencial en el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial.³⁶

Las acetogeninas (ejemplo de acetogenina Figura 2) constituyen una familia de productos naturales de 35/37 átomos de carbono que tienen al parecer su origen en la vía de los policétidos a partir de acetil-CoA. Están constituidas por una larga cadena alquílica cuyo extremo terminal presenta habitualmente una γ -metil- γ -lactona α , β -insaturada. Sobre la cadena hidrocarbonada presentan generalmente unos, dos o raramente tres, anillos tetrahidrofuránicos, anillos epoxídicos o dobles enlaces.³⁷

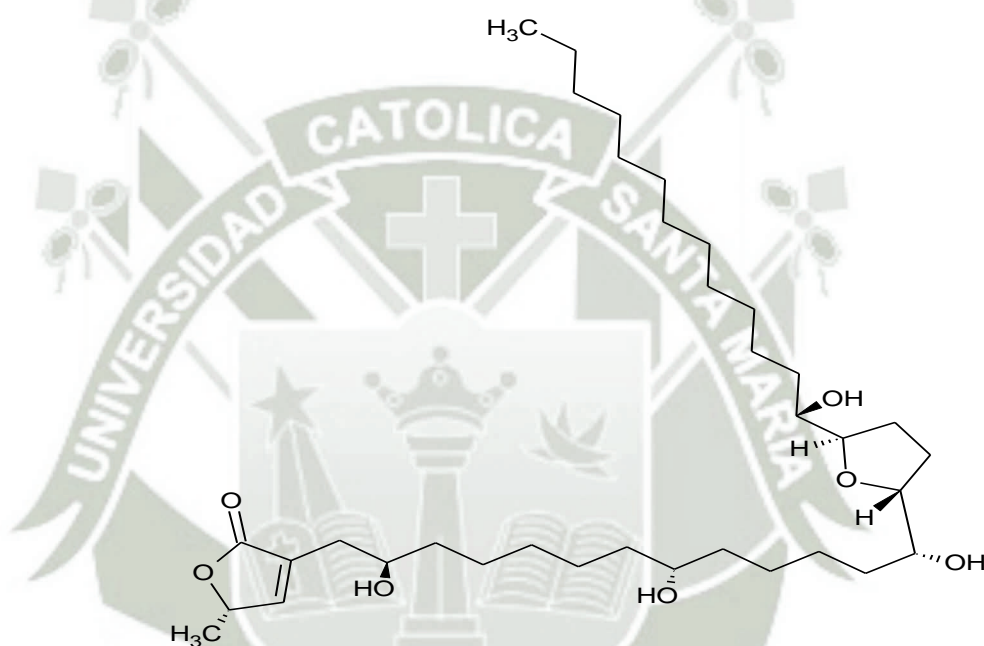


Fig.Nº 2: Estructura de la Annonacina

2.5. Actividad anticancerígena de *Annona muricata* (Guanábana)

Muchos estudios informan de los efectos antiproliferativos significativos de diferentes extractos de la planta hacia diversas líneas celulares de cáncer; sin embargo, pocos de estos estudios han ilustrado el mecanismo de acción subyacente.³⁸

Estudios in vitro demostraron el mecanismo de acción del extracto de Acetato de etilo de hojas de *Annona muricata* contra células de cáncer de colon (HT-29 y HCT-116) y células de cáncer de pulmón (A549). El

extracto de hoja fue capaz de inducir la apoptosis en células de cáncer de colon y pulmón a través de la vía mediada por la mitocondria. Este efecto antiproliferativo se asoció con la detención del ciclo celular en la fase G1. Además, la migración e invasión de células de cáncer de colon fueron inhibidas significativamente por el extracto de las hojas.⁽³⁹⁻⁴¹⁾

Estudios recientes sugieren la participación de un mecanismo adicional, que incluye la expresión de genes pro-apoptóticos. Durante el ciclo celular (Figura 3) se describen varios acontecimientos, los cuales se dividen en cuatro fases diferenciadas, la mitosis o fase M, que corresponde a la fase de división celular; la fase G1 ocupa la mayor parte del ciclo, y donde principalmente se lleva el proceso de expresión de genes apoptóticos; la fase S es donde se lleva a cabo la síntesis del DNA y el seguimiento del efecto en la fase G1, y finalmente la fase G2, donde se prepara la mitosis con una célula tetraploide y entra en la fase de la mitosis para dar comienzo a un nuevo ciclo celular o se da el proceso apoptótico.⁴²

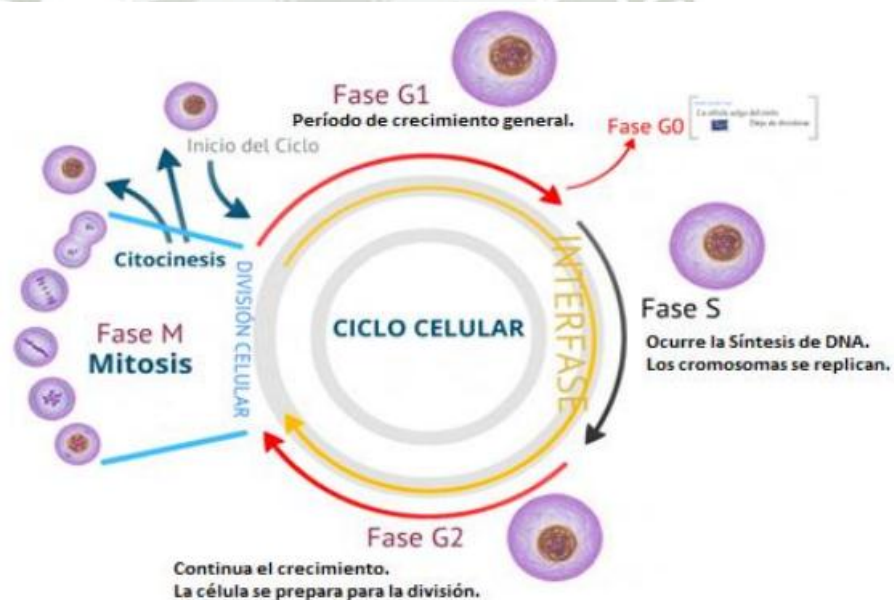


Fig.Nº 3: Representación esquemática del ciclo celular.

Fuente: Raven-Jonhson/www.acercaciencia.com

La hipótesis de acción de las acetogeninas a nivel de la cadena respiratoria se basa en su unión a la membrana, con el sistema de anillos con hidroxilos adyacentes, la parte más polar de la estructura, funcionando como el anclaje en la interfase membrana-medio acuoso. Por otra parte, la cadena lateral similar a un ácido graso se ubica maximizando las interacciones con los fosfolípidos constituyentes de la membrana.⁴³

En 1976, una investigación realizada por el Doctor Jerry Mc. Laughlin de la Universidad de Purdue y el Instituto Nacional del Cáncer comprobó la efectividad de las acetogeninas en el tratamiento de cáncer de colon y próstata. Mientras que la facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Católica de Corea del Sur realizó estudios comparativos con la adriamicina (quimioterapéutica) en tratamientos de cáncer de pulmón.⁴⁴

Estudios realizados por McLaughlin, Chih Hiw y Chui HF, 2000, han revelado que las acetogeninas son inhibidores del complejo I de la cadena de fosforilación oxidativa con lo cual bloquean la formación de ATP; energía que necesita la célula cancerosa para poner en funcionamiento su bomba mediada por P-glucoproteína, que le permite mantenerse activa. Las acetogeninas, también inhiben la ubiquinona-oxidasa, enzima dependiente del NADH que es peculiar en la membrana plasmática de la célula cancerosa.⁴⁵

3. Apoptosis

Es conocida como muerte celular programada. En este proceso las células se autodestruyen sin desencadenar reacciones de inflamación ni dejar cicatrices en los tejidos. La apoptosis es por tanto considerada como una muerte natural fisiológica, resultando en un mecanismo de eliminación de células no deseadas, dañadas o desconocidas y que desempeña un papel protector frente a posibles enfermedades.⁴⁶

La apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso celular genéticamente controlado por el que las células inducen su propia muerte

en respuesta a determinados estímulos. De ahí que frecuentemente se describa el proceso apoptótico como "suicidio celular" a la hora de definirlo conceptualmente.⁴⁷

La apoptosis es una forma de muerte celular, caracterizada por distintos cambios morfológicos, que incluyen condensación de la cromatina y fragmentación nuclear, pliegues en la membrana plasmática, desensamble del citoesqueleto y contracción celular. Eventualmente la célula se rompe en pequeños fragmentos rodeados de membrana (conocidos como cuerpos apoptóticos), los cuales son eliminados por fagocitosis, sin iniciar una respuesta inflamatoria.⁴⁸

Las evidencias indican que la apoptosis insuficiente se puede manifestar como cáncer o autoinmunidad, mientras que la muerte acelerada se aprecia en enfermedades degenerativas agudas y crónicas, inmunodeficiencias e infertilidad.⁴⁹

Dado que la apoptosis actúa como oponente a la mitosis, es muy importante su relación con el ciclo celular. En el ciclo celular hay cuatro fases: mitosis (M), fase de control celular G1, síntesis de ADN (S) y fase de control G2. La apoptosis puede iniciarse en el tercio final de G1 para impedir que una célula dañada ingrese a la fase de síntesis de manera que las mutaciones no se reproduzcan durante la replicación del ADN y en la fase G2 para impedir que las células que no hayan llegado a la madurez entren en mitosis.⁵⁰

La muerte celular puede activarse a través de la vía intrínseca o de la vía extrínseca, dependiendo del origen del estímulo de muerte.

3.1. Vía Extrínseca

La vía extrínseca del receptor de muerte, como su nombre lo indica, comienza cuando los ligandos de muerte se unen a un receptor de muerte.⁵¹ Dos familias de receptores se han identificado: la proteína transmembrana Fas y el factor de necrosis tumoral (TNF).

La proteína transmembrana Fas en su porción intracelular enlaza con un factor intermedio denominado FADD (factor associated death domain), nombre que sólo señala que está comprometido con la zona de la molécula Fas que participa en la muerte celular, activando las caspasas-8 y -10. Esta vía Fas permanece inactiva hasta que se produce en su parte externa el enlace con un cofactor llamado ligando Fas, proteína que actúa como detonador que enciende una vía en que sólo las caspasas están inactivas y el resto de la cadena está preparado para recibir el enlace exterior. Esta característica permite actuar con gran rapidez sin necesidad de sintetizar otros factores.⁵²

Algo similar sucede con el otro receptor de membrana TNF. Su porción intracelular conecta con complejos intermedios como el Tradd (TNF receptor associated death domain) y Raidd (receptor associated interleukine death domain) que activan caspasas "iniciadoras" de la apoptosis.⁵³

3.2. Vía Intrínseca

Es desencadenada en respuesta a una amplia variedad de estímulos que son generados dentro de la célula, tales como activación de oncogenes o daño del ADN. La inactivación de esta vía es generalmente llevada a cabo como un sello del cáncer.⁵⁴

Esta vía es mediada en la mitocondria, y en respuesta a estímulos apoptóticos diversas proteínas son liberadas del espacio intermembranal de la mitocondria hacia el citoplasma. Algunas de las proteínas bien caracterizadas incluyen: el citocromo c, SMAC/DIABLO, AIF (factor inductor de apoptosis), EndoG (endonucleasa G) y Omi/HTRA2 (proteína A2 requerida para las altas temperaturas).⁵⁵

La regulación de esta vía se da por los miembros proapoptóticos y antiapoptóticos de la familia de proteínas Bcl-2, los cuales inducen o reprimen la liberación de estos factores al citoplasma.⁵⁶

La activación de proteínas pro-apoptóticas de la familia de Bcl-2 produce un poro en la membrana externa de las mitocondrias que permite la liberación de numerosas proteínas del espacio intermembrana; entre ellas, el citocromo C.^(57,58)

El citocromo c, una vez en el citosol, activa un complejo proteico llamado "apoptosoma", que activa directamente a la caspasa-9. Una vez que la caspasa-9 está activada, ésta activa a las caspasas efectoras como la caspasa-3, lo que desencadena las últimas fases de la apoptosis.⁵⁹

4. Familia Bcl-2

El gen de Bcl-2 fue descubierto en células de un linfoma folicular que mostraba una translocación entre los cromosomas 14 y 18, t(14;18) (Figura 4); en esta aberración cromosómica, el gen Bcl-2 se fusionaba con el locus de la cadena pesada de inmunoglobulina (IgH), dejando al gen Bcl-2 yuxtapuesto bajo el control del promotor de IgH.⁶⁰ Debido a que la región codificante queda bajo el control del promotor de dicha inmunoglobulina, el resultado es una sobreexpresión excesiva de Bcl-2.⁶¹

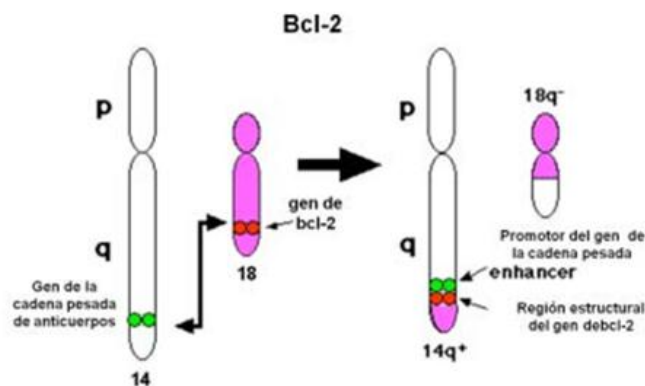


Fig.Nº 4: Translocación 14, 18 del gen de la proteína Bcl -2 presente en el linfoma folicular de los linfocitos B según lo propuesto por Tsujimoto y colaboradores, 1987.

Desde el descubrimiento de la proteína Bcl-2, se ha integrado una familia creciente de moléculas de acuerdo con su homología al compartir al menos uno de los cuatro dominios denominados BH (del inglés, Bcl-2 homology domain) y designados como BH1, BH2, BH3 y BH4⁶⁰; dicha familia incluye moléculas con actividad pro- y antiapoptótica. La mayor parte de los miembros antiapoptóticos mantienen conservación de la secuencia en sus cuatro dominios, mientras que aquéllas con actividad proapoptótica tienen menor conservación del primer segmento α -hélice BH4.⁶¹ La disposición espacial de estas proteínas, al parecer también se encuentra influenciada por su actividad pro- y antiapoptótica. Aquéllas con actividad antiapoptótica se encuentran como proteínas integrales de la membrana mitocondrial externa (MME), y también ha sido posible dilucidar su presencia en membrana del retículo endoplásmico (RE) y membrana nuclear,⁶² mientras que diversos miembros con actividad proapoptótica se encuentran en citosol o en asociación al citoesqueleto; una característica relevante de estas últimas es su capacidad para translocarse y asociarse como proteínas de membrana, regulando la vía apoptótica mitocondrial al controlar la permeabilización de la MME que libera al citocromo c y otros factores apoptóticos hacia el citosol. Al parecer, esta asociación a membrana es llevada a cabo al insertar sus dominios BH1 y BH2 del extremo carboxilo terminal en la MME.⁶³

Las proteínas de la familia Bcl-2 de forma clásica han sido clasificadas en tres grupos:

4.1. Proteína Anti-apoptótica (Bcl-2)

Bcl-2 es una proteína de 26 kDa que se encuentra anclada a las membranas externas de las cisternas nucleares, del retículo endoplásmico y a la externa mitocondrial. Sus funciones precisas en cada uno de estos sitios no han sido determinadas totalmente, pero su anclaje en la membrana mitocondrial es una característica que ha sido relacionada con su propiedad anti-apoptótica. Es bien conocido que la proteína Bcl-2 es una de los guardianes de la integridad de la membrana mitocondrial

durante periodos de estrés y estímulos que generan la apoptosis, como son la exposición a radiación ionizante, el tratamiento con agentes quimioterapéuticos, el daño por isquemia/reperfusión, el daño por ausencia de suero y factores de crecimiento, entre otros. La manera en que la proteína Bcl2 protege a la célula de la muerte no se conoce con exactitud, aunque parece que el sitio clave de acción está en la membrana externa mitocondrial en donde controla la permeabilidad membranal impidiendo la liberación del citocromo c (inicialmente denominado APAF-2) y del factor inductor de la apoptosis (AIF) a través del canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC). Lo anterior evita que se forme el apoptosoma y se desencadene la cascada de caspasas, que son proteasas de cisteína efectoras de la apoptosis.⁶⁴

El caso de Bcl-2 es especial porque desde hace varios años se ha demostrado que su sobreexpresión no induce proliferación celular, sino que por el contrario, la retarda, puesto que prolonga la fase G1 del ciclo celular⁶⁵ e incluso puede promover que el ciclo se detenga permanentemente fomentando lo que se conoce como senescencia replicativa.^(66,67) No obstante, es cierto que Bcl-2 es una proteína de supervivencia celular. Esto significa que cuando hay altos niveles de dicha proteína, la célula hará todo lo posible por mantenerse viva, inducirá todo tipo de sistemas de defensa y detendrá el programa de muerte apoptótico, aun y cuando la célula se encuentre dañada genéticamente. Aquí es donde está el truco: la sobreexpresión de Bcl-2 es un arma de doble filo, ya que no es deseable para un organismo mantener sus células vivas a toda costa cuando contienen mutaciones que podrían ser perjudiciales.⁶⁸

4.2. Proteína Pro-apoptótica (Bax)

El Bax es un supresor de tumores, se identificó por primera vez como un heterodímero con Bcl-2 en 1993.⁶⁹ Es una proteína 21 kDa de 192 aminoácidos que poseen nueve alfa-hélices y su estructura tridimensional

se determinó mediante resonancia magnética nuclear (RMN) en el año 2000. Al igual que otras estructuras tridimensionales de las proteínas de la familia Bcl-2, Bax exhibe una estructura terciaria similar.⁷⁰

Bax es un punto de entrada único para la señalización apoptótica intrínseca. La vía intrínseca se inicia mediante diversos estímulos, incluyendo daño en el ADN, la privación de citocinas, y el estrés citotóxico.⁷¹ La función de Bax está estrechamente regulada por una serie de cambios, incluyendo conmutación conformacional (inactivo a conformación activa), el tráfico (de citosol a las mitocondrias), y los cambios de estado de agregación (de monómero a dímero y multímero).^(72,73) Oligomerizado Bax facilita la permeabilización de la membrana mitocondrial y promueve la formación de poros que permite la liberación de citocromo C y Smac/DIABLO de espacio intermembrana en citosol.⁷⁴ Junto con la proteasa apoptótica factor activador 1 (Apaf-1), dATP, y procaspasa-9, el citocromo C forma un complejo "apoptosoma", que activa la caspasa 9 seguido por la activación de la cascada de caspasas verdugo y finalmente resulta en la muerte celular.⁷⁵

4.3. Proteínas tipo BH3

Una tercera clase son aquellas que comparten únicamente el motivo BH3 (del inglés, only-HB3) debido a que sólo mantienen homología de este dominio de los cuatro diferentes motivos BH.⁷⁶ Dicho motivo es una región de 10-20 aminoácidos con gran conservación entre los diferentes miembros de la familia y la designación en número fue de acuerdo con el orden de su descubrimiento. Al menos ocho miembros se conocen (Bid, Bad, Bik, Bim, BMF, HRK, NOXA y PUMA), con un tamaño que oscila entre los 100-200 aminoácidos. Este motivo BH3, es indispensable para llevar a cabo la actividad proapoptótica, la cual es dada por el uso de uno o ambos posibles mecanismos: 1) activación directa mediante la unión a Bax y Bak (tBID, Bim y PUMA), ó 2) indirectamente al insertar su dominio BH dentro del surco hidrofóbico de proteínas Bcl-2 con

actividad antiapoptótica. Por ejemplo, tras un estímulo apoptótico, Bax y Bak se translocan del citosol hacia la MME; una vez ahí, cambian su conformación insertándose dentro de la membrana, oligomerizan e inducen la liberación del citocromo c. Bajo condiciones basales, este grupo de proteínas son inactivas o se encuentran en bajos niveles en la célula.^(77,78)

5.- Proteína p53

La proteína codificada por el gen supresor de tumor p53, es una fosfoproteína que se localiza en el núcleo celular. Esta proteína fue descubierta a finales de la década de los 70 e identificada como una fosfoproteína celular de 53 kDa.^(79,80)

El gen codifica un ARN mensajero de 2.2 a 2.5 kilobases, que se expresa en casi todas las células del organismo y tiene las mayores concentraciones a nivel del timo, el bazo, el testículo y el ovario. Da lugar a la síntesis de la fosfoproteína nuclear p53.⁸¹

La proteína p53 interactúa directamente con el ADN. También interactúa con otras proteínas que dirigen acciones celulares. Cuando el ADN se daña o algún otro malfuncionamiento es detectado, el p53 tiene el poder de accionar la muerte celular o apoptosis.⁸²

Si el material genético de la célula resulta dañado o si algún sistema de control se desajusta, esta lo detecta e intenta restaurarlo. Si la lesión no es grave, la p53 detiene la división celular y activa los genes reparadores del ADN.⁸³ Si la p53 estima que el daño es irreparable entonces ordena que se pongan en marcha los mecanismos genéticos para que la célula entre en apoptosis. Si este gen (p53) sufre alguna mutación, no permite que la célula sea eliminada mediante la muerte programada, tampoco se ocupa de reparar los daños en el ADN y da lugar al inicio del proceso tumoral. Este gen es el más frecuentemente mutado en los cánceres humanos, más de un 50% de los tumores tienen genes p53 anormales, produciéndose una proteína alterada.^(84,85)

La proteína p53 toma un rol integral dentro de la célula y se encuentra normalmente en todos los tipos de célula. La proteína está localizada en el núcleo donde funciona como factor de transcripción. La proteína p53 se encuentra en el centro de una larga red de proteínas que "perciben" la salud de la célula y del ADN celular. La proteína p53 es la conductora de un sistema bien coordinado que detecta y controla cualquier daño celular. Cuando se percibe algún daño, la actividad de la proteína p53 asiste a la decisión entre reparación y la iniciación de la muerte celular (apoptosis).⁸⁶

Como factor de transcripción, la p53 estimula la transcripción de un grupo de genes blanco. Entre ellos, el más importante es el p21. El producto del gen p21 es un regulador negativo de quinasas dependientes de ciclina, enzimas críticas para el avance del ciclo celular y la división de la célula.⁸⁷ Si se estimula la transcripción del gen p21, la p53 impide la proliferación celular. Este alto le da la oportunidad a la célula de crear reparaciones, si es posible. Si ha ocurrido daño sustancial de ADN, la proteína p53 puede ayudar a provocar la muerte celular. La muerte de una célula que ha incurrido un daño sustancial en el ADN es beneficioso para el organismo porque evita que las células con mutaciones nocivas se proliferen.⁸⁸

6.- Caspasas

Las caspasas son una familia de proteínas que son uno de los principales ejecutores del proceso apoptótico. Pertenecen a un grupo de enzimas conocidas como cisteína proteasas y existen dentro de la célula como proformas inactivas o zimógenos.⁸⁹

Las procaspasas son una familia de cisteín-proteasas que se encuentran como moléculas precursoras inactivas que al recibir la señal apoptogénica sufren un rompimiento proteolítico y dan lugar a dos subunidades que constituyen la enzima activa o caspasa.^(90,91) Las procaspasas constan de un prodominio N-terminal y dos subunidades, una grande p20 y otra pequeña p10. A la fecha las caspasas más estudiadas son la -1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9 y -10. Tomando en cuenta la estructura primaria, se pueden agrupar en dos clases: pertenecen a la clase I las procaspasas que tienen un prodominio N-

terminal grande, como las procaspasas-1, -2, -8, -9 y -10 (Figura 5). En las procaspasas de clase II el prodominio N-terminal es pequeño o carecen de él, pertenecen a esta clase las procaspasas-3, -6, -7 (Figura 5).⁹² Los prodominios de las procaspasas de clase I contienen dominios de interacción proteína-proteína que propician la formación de complejos homodiméricos. Estos complejos están compuestos por tetrámeros de dos subunidades grandes y dos pequeñas que favorecen su rompimiento autoproteolítico en sitios específicos de residuos de ácido aspártico (D).⁹³

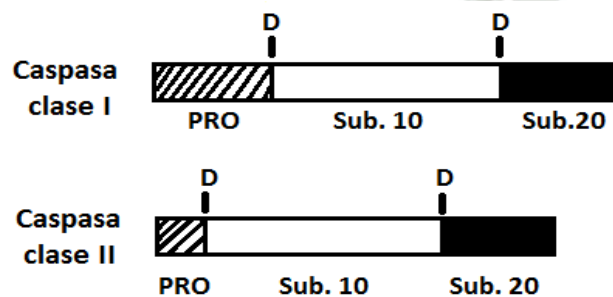


Fig.Nº 5: Las caspasas se sintetizan como pro-caspasas y constan de un dominio N-terminal (PRO) y dos subunidades, una grande P20 y otro menor p10. Se indica la posición de los ácidos espárticos (D) de escisión de la pro-caspasa para activarse a caspasa.

La autoactivación de las caspasas de clase I las dirige al citoplasma para activar a las procaspasas de clase II, que no tienen la capacidad de autoproteolizarse y durante su activación forman complejos heterodiméricos que favorecen su rompimiento proteolítico.⁹⁴ En estas condiciones las caspasas activas inician los mecanismos apoptóticos hidrolizando a las diversas proteínas, del citoesqueleto, nucleares, proteínas que intervienen en la división celular, en el control del ciclo celular, reparación, replicación y transcripción del ADN.⁽⁹⁵⁻⁹⁷⁾

Existen dos cascadas principales para la ejecución de la apoptosis. La primera de ellas, que sucede en la membrana celular, depende de la acción de los denominados factores de muerte que actúan a través de receptores y desencadenan la formación de un DISC (complejo de iniciación de

señalización de muerte).⁹⁸ Este DISC genera una señal que recluta caspasas iniciadoras en la membrana de la célula. Una variación de esta cascada es la privación de los factores de crecimiento, que también genera señales a partir de la membrana hacia la mitocondria. La segunda cascada involucra a la mitocondria, organelo que es clave para la integración de señales intra y extracelulares que inician la apoptosis. El uso de cada una de estas cascadas depende de diversos factores, de los cuales los dos principales son el tipo de estímulo y el tipo celular.^(99,100) La vía que no involucra a la mitocondria se presenta en células con alta concentración de caspasa-8 que activa a caspasa-3, iniciando la cascada apoptótica.^(101,102) En células con pequeña cantidad de caspasa-8, esta caspasa fragmenta a BID, un miembro proapoptótico de la familia Bcl-2, generando un fragmento C-terminal de 15 kDa que se transloca a la membrana mitocondrial,¹⁰³ esto provoca la liberación del citocromo c por apertura de los megaporos mitocondriales llamados PT (transición de poro) regulados por la familia Bcl-2.¹⁰⁴ En este caso el citocromo c junto con dATP activa a Apaf-1 (factor 1 que activa a proteasas) para unirse y activar a la caspasa-9.^(105,106)

7. Células cancerígenas de próstata (PC-3).

Las líneas celulares PC3 se establecieron en 1979 a partir de metástasis ósea de grado IV de cáncer de próstata en un varón caucásico de 62 años.¹⁰⁷ Estas células no responden a andrógenos, glucocorticoides o factores de crecimiento de fibroblastos, pero los resultados sugieren que las células están influenciadas por factores de crecimiento epidérmico.¹⁰⁸

La línea es casi triploide con un número modal de 62 cromosomas. Hay cerca de 20 cromosomas marcadores comúnmente encontrados en cada célula; y no se encuentran N2, N3, N4, N5, N12 y N15 normales. Ningún cromosoma Y normal se pudo detectar mediante análisis de banda Q.¹⁰⁹

Las PC-3 tienen baja actividad de la testosterona-5-alfa reductasa y la fosfatasa ácida, no expresan PSA (antígeno específico de la próstata), y son PSMA-negativo (antígeno de membrana específico de la próstata).¹⁰⁹

8. Células epiteliales sanas de próstata humana (HPrEC).

Células epiteliales sanas de próstata humana (HPrEC), son usadas comúnmente para estudios de la regulación hormonal de la próstata, la regulación y el control de la función secretora de las células de la próstata y como un control para el estudio del cáncer de próstata. Las HPrEC son criopreservados como células secundarias para asegurar la mayor viabilidad.¹¹⁰

La American Type Culture Collection (ATCC®) recomienda que se utilicen procedimientos de seguridad apropiados cuando se manipulen todas las células y líneas celulares primarias, especialmente aquellas derivadas de material humano o de otro primate.¹¹¹

Todos los tejidos utilizados para el aislamiento se obtienen bajo el consentimiento informado y se ajustan a las normas HIPAA para proteger la privacidad de la información personal de salud del donante. Es mejor tener precaución al manipular cualquier célula humana. Se recomienda que se conceda a todas las células humanas el mismo nivel de consideración de bioseguridad que las células que se sabe que transportan el VIH.¹¹¹

9. Ensayos en líneas celulares

9.1. Viabilidad celular

La inhibición del crecimiento de las células se determina mediante el ensayo colorimétrico CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay utilizado para determinar el número de células viables en ensayos de proliferación. El ensayo se fundamenta en su compuesto [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolio] (MTS). El MTS es reducido por las células formando el producto formazán que es soluble en medio de cultivo tisular. La absorbancia del producto formazán puede ser cuantificada en una longitud de onda comprendida entre 490-500 nm.¹¹²

La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.¹¹⁴

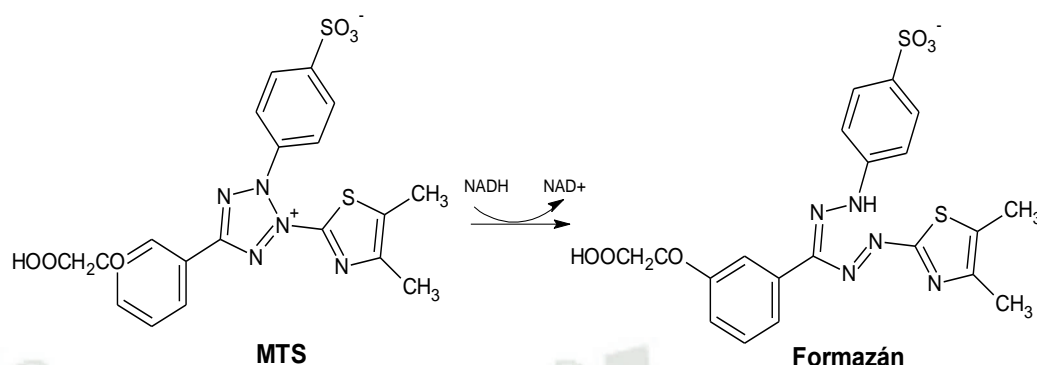


Fig.N° 6: Reacción del ensayo de MTS

9.2. Western blot

Western Blot es una técnica analítica, ampliamente utilizada, para el estudio de proteínas. Mediante una electroforesis en gel se separan las proteínas atendiendo al criterio que se desee: peso molecular, estructura, hidrofobicidad, etc. Luego son transferidas a una membrana adsorbente (típicamente de nitrocelulosa o de PVDF) para poder buscar la proteína de interés con anticuerpos específicos contra ella.¹¹⁴ Este método, descrito por primera vez por Towbin (1979), permite la detección de una sola proteína dentro de una muestra biológica. La especificidad de Western Blot se logra mediante la utilización de un anticuerpo que reconoce y se une a un epítipo único de la proteína de interés. Con la técnica de Western Blot se puede estimar el tamaño de una proteína, confirmar la presencia de modificaciones post-traduccionales como la fosforilación, y ser utilizado para comparar cuantitativamente los niveles de proteína entre muestras.¹¹⁵

9.3. Ensayo colorimétrico de la caspasa-3.

La caspasa-3 es un miembro de la familia de las caspasas que juega un importante papel como mediador de la apoptosis, o muerte celular programada. Cuando se activa, la caspasa-3 corta una gran variedad de proteínas celulares, causando cambios morfológicos y funcionales en las células que llevan a cabo la apoptosis.

El ensayo colorimétrico de la caspasa-3 permite una cuantificación rápida y eficaz de la actividad de esta enzima. El ensayo colorimétrico se basa en la detección espectrofotométrica del cromóforo p-nitroanilide (pNA) después del corte del sustrato marcado acetyl-Asp-glu-Val-Asp p-nitroanilide (Ac-DEVD-pNA). La concentración de pNA se mide por absorbancia a 405 nm. La actividad caspasa-3 se calcula en μmol de pNA liberado por minuto y mililitro del lisado celular.¹¹⁶





II. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. MATERIAL BIOLÓGICO

1.1.1. Líneas celulares

Ambas líneas celulares utilizadas en este trabajo de investigación fueron adquiridas de American Type Culture Collection (ATCC[®], Virginia, EEUU).¹¹⁷

1.1.1.1. PC-3

Línea celular de cáncer de próstata humana, grado IV, derivada a partir de metástasis ósea (varón caucásico, 62 años), son células con morfología epitelial, se reproducen rápidamente y crecen de forma adherente.

1.1.1.2. HPrEC

Células epiteliales de próstata humana normal o sana, éstas presentan una morfología epitelial, se reproducen lentamente y tienen la propiedad adherente de crecimiento.

1.2. MATERIAL DE LABORATORIO

1.2.1. Equipos

Para la realización de este trabajo de investigación se utilizaron los siguientes equipos de laboratorio: una cabina de seguridad biológica con flujo laminar clase 2, tipo A2 (ESCO®), cámara de gas nitrógeno, equipo de incubación (VWR® Symphony), contador de células (Nexcelom Bioscience® Auto T4), microscopio óptico (VWR®), espectrofotómetro con lector de 96 celdas (microplacas) (Synergy HT - BioTek®), centrifugadora (DYNAC® III, Clay Adams), microcentrifugadora (VWR®), sonicador (VWR®), vortex (Genie 2 VWR®), cámara de electroforesis (Bio-Rad), escáner para Western Blot (C-DiGit® LI-COR), equipo de transferencia (Trans-Blot® Turbo Bio-Rad), balanza analítica (Modelo A-160 Denver Instrument Company), baño María (Cimatec), equipo de refrigeración (Philips).

1.2.2. Reactivos

Los anticuerpos policlonales anti-Bax y anti-Bcl-2 fueron Thermo Scientific™. Medio de Ham F12 modificado por Kaighn (F-12K), que contiene 2 mM L-glutamina y 1500 mg/L bicarbonato de sodio, medio basal y kit de crecimiento para células epiteliales prostáticas, suero fetal de bovino (FBS), tripsina/EDTA (T/E), tampón fosfato salino de Dulbecco (D-PBS), penicilina/estreptomicina (P/S) fueron obtenidos de ATCC®. Dimetil sulfóxido (DMSO) y etanol fueron de Sigma Aldrich Co®. El tampón de electroforesis Tris/Glicina/SDS 10x, tampón de carga, tampón de bloqueo TBS-TWEEN, buffer de lisis M-PER (reactivo de extracción de proteínas de mamíferos) y el kit de reactivos para ensayo del ácido bicinconínico (BCA) fueron de Thermo Fisher Scientific™. El kit de ensayo colorimétrico para caspasa-3 fue de BioVision.

El extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana) fue proporcionado por Dr. Alejandro Pino Figueroa en el

Laboratorio de Investigación Oncológica de Massachusetts College of Pharmacy and Health Sciences University, Boston, Estados Unidos.

1.2.3. Material de vidrio y otros

Gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico para electroforesis (SDS-PAGE 10%), papel (o membrana) de nitrocelulosa, almohadillas de soporte, frasco de cultivo celular (25, 75 mL), tubos cónicos de centrifugación, tubos de microcentrifugación, microplacas transparentes de 96 pozos, pipetas, multipipetas, matraz Erlenmeyer (100, 250 mL), pipetas (5, 10, 25 mL), probetas (50, 100 mL), vasos de precipitación (50, 100, 250 mL), frascos de vidrio (20 mL), gradillas y pisetas.

1.3. LUGAR DE REALIZACIÓN

La parte experimental del presente trabajo de investigación se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Investigación Oncológica de Massachusetts College of Pharmacy and Health Sciences University, Boston, Estados Unidos.

2. MÉTODOS

2.1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO

El extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana) (EAEAM) fue proporcionada por el Laboratorio de Investigación Oncológica de Massachusetts College of Pharmacy and Health Sciences University, Boston, Estados Unidos.¹¹⁸

Este extracto fue obtenido de la siguiente manera: se trituraron 20 g de hojas secas de *Annona muricata* y fue macerada con 500 mL de

metanol al 95%, grado analítico (VWR, West Chester, PA, EE.UU) por 24 horas a temperatura ambiente (25°C), obteniéndose un extracto que fue filtrado al vacío. Se hizo una segunda y posteriormente una tercera extracción con metanol.

El extracto metanólico filtrado fue evaporado en un evaporador rotatorio (Buchi Instruments, Gaithersburg, MD, US) a 37°C y se obtuvo 3.95 g de extracto de metanol, luego se hizo una re-extracción con 500 mL de una solución de agua-Acetato de etilo (1:1), se dejó reposar por 24 horas y se separó. Este procedimiento se repitió tres veces. La fracción de acetato de etilo fue evaporado nuevamente en un evaporador rotatorio a 37°C obteniéndose 1.2 g de residuo sólido verde y viscoso, el cual fue almacenado a temperatura ambiente (25°C) y protegido de la luz.

2.2. CULTIVO CELULAR

Se adquirieron dos líneas celulares PC-3 y HPrEC, ambas procedentes de la compañía ATCC[®], las cuales se encontraban criopreservadas en un vial. El procedimiento de cultivo celular se llevo a cabo bajo condiciones asépticas (alcohol 70%) y en una campana de flujo laminar.

2.2.1. DESCONGELACIÓN Y SIEMBRA DEL CULTIVO CELULAR PRIMARIO DE PC-3 Y HPrEC

Los cultivos celulares primarios se encontraban criopreservados en viales dentro de una cámara de nitrógeno líquido a una temperatura de -200°C en el laboratorio de cultivo celular de Massachusetts College of Pharmacy and Health Sciences University, Boston, Estados Unidos.

Estos fueron descongelados a temperatura ambiente (25°C) y condiciones estériles en la cabina de flujo laminar. Seguidamente las células PC-3 fueron extraídas del vial, se

traspasaron a un frasco de cultivo (75 mL) con medio completo F-12K (conteniendo suero fetal de bovino (FBS) 10 % y penicilina/estreptomicina (P/S) 5 %) y llevadas a incubación por tres días a 37°C y CO₂ al 5 %.

De igual forma las células HPrEC, fueron extraídas del vial, traspasadas en frasco de cultivo con medio completo (conteniendo el kit de crecimiento: L-glutamina 6 mM, extracto P 0.4 %, epinefrina 1.0 mM, hemisuccinato de hidrocortisona 100 ng/mL, insulina 5 mg/mL, apo-transferrina 5 mg/mL, penicilina-estreptomicina-anfotericina B 5 %, TGF- α y rojo fenol 33 μ M) y llevadas a incubación por cinco días a 37°C y CO₂ al 5 %.

Cuando las células ocupan toda la superficie disponible se dice que han alcanzado la confluencia. En esta etapa, las células establecen contacto entre ellas que inhibe su proliferación y el crecimiento se detiene. Por eso, cuando se observó esto, se procedió a realizar un subcultivo o pase.

2.2.2. SUBCULTIVO DE LAS LÍNEAS CELULARES

Una vez evidenciada a través del microscopio óptico, la confluencia celular mayor al 90% en la base del frasco de cultivo se procede a la preparación de un nuevo pase o subcultivo. Para la preparación de éste, se comenzó a desprender las células PC-3 de la base del frasco, se desechó el medio residual, luego se le agregó 5 mL de tripsina-EDTA y con una agitación mesurada se dejó incubar a 37°C y CO₂ al 5 % por cinco minutos, pasado este tiempo se volvió a agitar nuevamente y se agregó al frasco de cultivo 15 mL de medio completo de F-12K, posteriormente se trasladó este volumen a un tubo cónico de centrifugación (50 mL) y se procedió a centrifugar (1000 rpm por cinco minutos). El sobrenadante fue eliminado, se resuspendió el precipitado (*pellet* obtenido), con

medio completo F-12K y de ésta suspensión se procedió a realizar un nuevo pase o subcultivo (Figura 7).

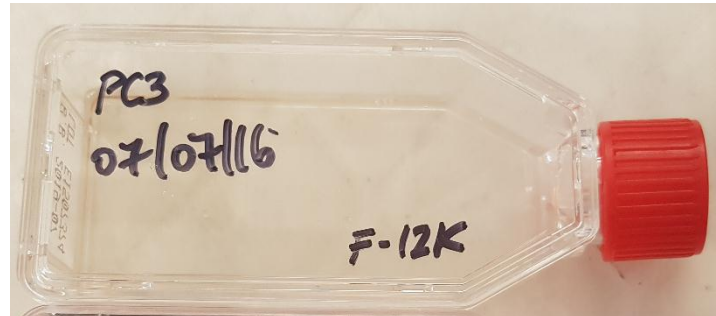


Fig.Nº 7: Nuevo pase de la línea celular PC-3 (células cancerígenas de próstata humana).

Fuente: Registro de la Investigación

Del mismo modo, con el objetivo de desprender las células HPrEC de la base del frasco de cultivo, se lavó el frasco con D-PBS para eliminar el medio residual, luego se agregó 5 mL de tripsina-EDTA con agitación medida y se dejó incubar a 37°C y CO₂ al 5 % por cinco minutos, al culminar este tiempo se volvió agitar y se agregó al frasco de cultivo 5 mL de tripsina neutralizante, después se trasladó este volumen a un tubo de centrifuga 50 mL y se agregó al frasco de cultivo 10 mL de D-PBS para extraer lo que quedaban de células; este volumen se añadió al tubo cónico de centrifuga (50 mL), se utilizó el equipo de centrifugación (1000 rpm por cinco minutos). También se eliminó el sobrenadante y el precipitado (*pellet* obtenido) se resuspendió con medio completo de células HPrEC; de ésta suspensión se procedió a crear un nuevo pase o subcultivo (Figura 8).

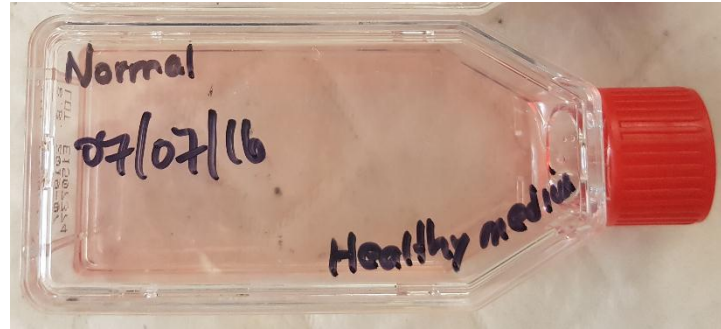


Fig.Nº 8: *Nuevo pase de la línea celular HPrEC (células epiteliales sanas de próstata humana).*

Fuente: Registro de la Investigación

Para el óptimo crecimiento de ambas líneas celulares se realizó el cambio del medio residual (frasco de cultivo después de estar incubado) por medio completo cada dos días, con el fin de evitar la disminución de nutrientes y acumulación de productos de desecho, característica que se manifestó con el cambio de coloración del medio.

2.2.3. CONTEO DE CÉLULAS

Para la preparación de un pase celular es necesario contar con el 95% de células viables como mínimo, para ello se requiere determinar en número de células, se procedió extrayendo las células del frasco de cultivo, se trasladó a un tubo cónico (50 mL), se centrifugó (1000 rpm por cinco minutos), se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado (*pellet* obtenido) con medio completo correspondiente a cada línea celular.

De la suspensión obtenida se tomaron 20 μ L y se colocaron en una lámina de recuento. Esta lámina fue leída por el contador automático de células (Nexcelom Bioscience® Auto T4) (Figura 9) previamente programado. El equipo finalmente

dió como resultado la cantidad de células vivas y el porcentaje de viabilidad.

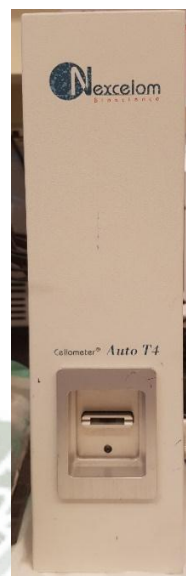


Fig.Nº 9: Contador automático de células (Nexcelom Bioscience® Auto T4).

Fuente: Registro de la Investigación

2.3. PREPARACIÓN Y ADMINISTRACIÓN DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EXTRACTO EN ACETATO DE ETILO DE LAS HOJAS DE *Annona muricata* (EAEAM) SOBRE AMBAS CÉLULAS.

2.3.1. PREPARACIÓN DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE TRATAMIENTO: EXTRACTO EN ACETATO DE ETILO DE LAS HOJAS DE *Annona muricata* (EAEAM).

El extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana) se encuentra almacenado en los laboratorios de MCPHS. Se disolvió 20 mg del extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata* en un mL de

DMSO (100%) para obtener una solución madre o stock de 20000 µg/mL.

A partir de la solución stock de 20000 µg/mL se preparó soluciones cuyas concentraciones fueron 200, 600, 2000 y 6000 µg/mL. La ecuación N°1 esquematiza la dilución a partir de la solución madre o stock.

$$Conc.1 \times Vol.1 = Conc.2 \times Vol.2$$

$$20000 \mu g \times X \mu L = Conc. deseada (\mu g) \times 1000 \mu L$$

Ecuación N°1: Ecuación de dilución para preparar las soluciones deseadas.

Los volúmenes que se tomaron de la solución stock se muestran en la Tabla 3. El volumen final de cada solución (200, 600, 2000 y 6000 µg/mL) fue de 1 mL, enrasando hasta el volumen final con DMSO (100%).

Tabla 3: Preparación de soluciones a partir de solución madre o stock (20000ug/mL)

Conc. deseada de EAEAM (µg/mL)	µL Sol Stock (20000 µg/mL)	µL de DMSO (100%)
200	10	990
600	30	970
2000	100	900
6000	300	700

Fuente: Elaboración propia

Finalmente, a partir de las soluciones 200, 600, 2000, 6000 y 20000 µg/mL que se preparó anteriormente se prepararon las concentraciones deseadas del extracto en acetato de etilo de las

hojas de *Annona muricata* que fueron de un rango de 1 a 50 $\mu\text{g/mL}$. La ecuación N°1 esquematiza la dilución a partir de las soluciones previamente preparadas.

Se utilizó un volumen de 2.5 μL de la solución stock (20000 $\mu\text{g/mL}$) para obtener una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ y 5 μL de cada una de las diluciones preparadas anteriormente para obtener las concentraciones de 1, 3, 10 y 30 $\mu\text{g/mL}$.

Se debe considerar la proporción de DMSO que es de 0.2%; por lo que se agregó cantidad suficiente de medio incompleto para las células PC-3 y medio basal completo para las células HPrEC para alcanzar este requisito. En la Tabla 4 se muestran los volúmenes de medio incompleto o medio basal completo (según la línea celular) requeridos para 1 mL de tratamiento en las diferentes concentraciones.

Tabla 4: Preparación de diferentes concentraciones de extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata*.

Sol. del EAEAM ($\mu\text{g/mL}$)	Volumen tomado (μL)	μL de Medio para PC-3 y HPrEC	Conc. deseada del EAEAM ($\mu\text{g/mL}$)
200	5	995	1
600	5	995	3
2000	5	995	10
6000	5	995	30
20000	2.5	997.5	50

Fuente: Elaboración propia

2.3.2. ADMINISTRACIÓN DEL TRATAMIENTO SOBRE LAS CÉLULAS PC-3 Y HPrEC.

Para la administración del tratamiento se sembró una cantidad determinada de la suspensión de células de PC-3 y HPrEC en placas transparentes de 96 pozos (2×10^4 células/pozo) y fueron incubados por tres días a 37°C y CO_2 al 5%. Al culminar el tiempo se retiró el medio de cada pozo y se administró 200 μL de tratamiento (EAEAM) a diferentes concentraciones de menor a mayor (1, 3, 10, 30 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), se dejó incubando por otras 24, 48 y 72 horas a 37°C y 5% de CO_2 . Se realizaron nueve repeticiones para cada concentración, con su grupo control donde se administró células con vehículo (DMSO 0.2%) y blanco donde se administró células con medio, como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5: Tabla del tratamiento aplicado a células PC-3 y HPrEC.

<i>F</i>	Blanco	+ Medio
<i>u</i>	Grupo Control	+ Vehículo (DMSO)
<i>e</i>		+ 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$
<i>n</i>	Tratamiento	+ 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$
<i>t</i>	(EAEAM)	+ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$
<i>e</i>		+ 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$
:		+ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Células

Elaboración propia

2.4. ENSAYO DE VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS FRENTE AL TRATAMIENTO (EAEAM).

Se trabajó con tres grupos de estudio:

Grupo 1: Células tratadas con extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata* (EAEAM) en concentraciones de 1, 3, 10, 30 y 50 $\mu\text{g/mL}$ incubadas por 24 horas.

Grupo 2: Células tratadas con extracto de extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata* (EAEAM) en concentraciones de 1, 3, 10, 30 y 50 $\mu\text{g/mL}$ incubadas por 48 horas.

Grupo 3: Células tratadas con extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata* (EAEAM) en concentraciones de 1, 3, 10, 30 y 50 $\mu\text{g/mL}$ incubadas por 72 horas.

Una vez identificado los grupos de estudio, se aplicó el ensayo de MTS para determinar la viabilidad de las células PC-3 y HPrEC de la siguiente manera: para el Grupo 1, se extrajo de la incubadora las microplacas pertenecientes al grupo, se les añadió a cada pozo 10 μL del reactivo MTS y se dejó incubar por tres horas a 37°C y CO₂ al 5%. Pasado este periodo de incubación se tomó lectura de las absorbancias a 490 nm en el espectrofotómetro (Synergy HT - BioTek®). Las absorbancias son proporcionales al número de células vivas en el pozo. De igual manera se procedió con el Grupo 2 y el Grupo 3.

2.4.1. PORCENTAJE DE CÉLULAS VIABLES

Este porcentaje se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Células Viables} = \frac{(\text{Abs pozo} - \text{Abs blanco})}{(\text{Abs control} - \text{Abs blanco})} \times 100$$

Donde:

- Abs pozo: representa la absorbancia de los pozos con tratamiento
- Abs control: representa la absorbancia del pozo que contiene el control.
- Abs blanco: representa la absorbancia del pozo que contiene el blanco

Se reemplazaron los valores en la ecuación anterior, para así poder obtener el porcentaje de células viables, correspondientes a las concentraciones empleadas.

2.5. DETECCIÓN DE Bcl-2, Bax Y p53 EN CÉLULAS PC-3 CON TRATAMIENTO (EAEAM).

2.5.1. LISADO CELULAR

Se trabajó células tratadas con la concentración de mejor efecto del EAEAM por 24 horas; para lo cual se sembró las células en frascos de cultivo de 25 mL, se dejó incubar por tres días hasta observar una confluencia celular mayor al 90%, se añadió el tratamiento (concentración de EAEAM igual a 10 µg/mL), se creó un blanco y se dejó incubando. Pasado el tiempo de incubación se desechó el medio contenido en el frasco de cultivo, se enjuagó tres veces con 5 mL de PBS. Luego se añadió 400 µL del reactivo de lisis M-PER (inhibidor de proteasas) y se empezó con el proceso de *scrapping* en hielo. Posteriormente se transfirió el contenido

de los frascos a un tubo de microcentrifugación, se homogenizó con el agitador Vortex por un minuto y se centrifugó (14000 rpm por 10 minutos) a 4°C. Se recolectó el sobrenadante, el cual fue almacenado a -80°C para ensayos posteriores de cuantificación proteica y se desechó el precipitado.

2.5.2. CUANTIFICACIÓN PROTÉICA

Se utilizó el kit de ensayo colorimétrico del ácido bicinonínico (BCA), cuyo fundamento se basa en la reducción de los enlaces peptídicos de la proteína de iones cúpricos a iones cuprosos, donde dos moléculas de ácido bicinonínico reaccionan con un ión cuproso formando un complejo de color púrpura. La cantidad de cobre reducido es proporcional a la cantidad de proteína presente en la solución.

A partir de la solución patrón de albúmina sérica bovina (2 mg/mL), adjunto en el kit, se preparó cinco soluciones estándar para crear una curva de calibración. Las concentraciones de las soluciones estándar de albúmina fueron de 125, 250, 500, 1000, y 2000 µg/mL con su blanco, conteniendo el diluyente PBS.

Luego se preparó el reactivo de trabajo en un tubo de centrifugación, a partir del reactivo A y el reactivo B del kit en una proporción de 50:1.

Se agregó 20 µL en una microplaca de 96 pozos, los cuales corresponden a cada estándar de albúmina preparado y el lisado celular obtenido en el punto 2.5.1 Se adicionó 200 µL del reactivo de trabajo y se dejó incubar a 37°C con agitación constante por 30 minutos.(Figura 10).



Fig.Nº 10: Microplaca transparente de 96 pozos con soluciones estándar de albúmina y lisado celular.

Fuente: Registro de la Investigación

Terminada la agitación, se llevó la microplaca al espectrofotómetro (Synergy HT - BioTek®) donde se dio lectura de las absorbancias a 562 nm.

2.5.3. WESTERN BLOT

Se inició este procedimiento realizando los cálculos correspondientes a la concentración de proteínas obtenidas en el apartado 2.5.2. Dicha concentración de proteínas sirvió para hallar la cantidad de proteínas que se requerían para la preparación de la mezcla: lisado celular, buffer reductor y PBS, los cuales hacen un total de 100 μ L en el tubo de microcentrifugación; se incubó los tubos a 95°C por cinco minutos.

Pasado este tiempo se procedió a realizar la electroforesis en gel SDS-PAGE (gel de poliacrilamida), para lo cual se colocó el gel en el compartimiento que contenía el buffer de corrida y luego se procedió a colocar en los carriles del gel el volumen de proteínas correspondiente a la concentración de 40

y 50 μg /celda. Se utilizó también 5 μL del marcador de peso molecular (*ladder*). Se dejó correr las muestras durante 50 minutos a 121 voltios (Figura 11).

Se dejó reposar las membranas de nitrocelulosa en el buffer de transferencia.

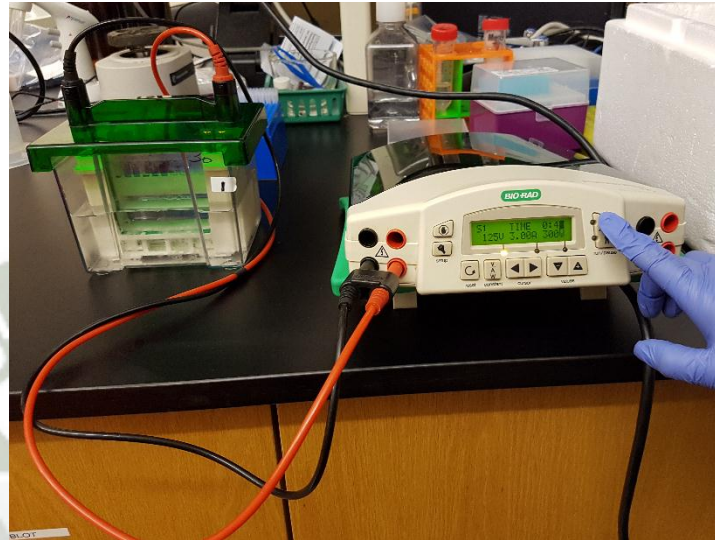


Fig.N° 11: Equipo para realizar la electroforesis.

Fuente: Registro de la Investigación

Una vez terminada la corrida electroforética, se procedió a remover los geles de la cámara de electroforesis. Para la transferencia de proteínas del gel SDS-PAGE a la membrana de nitrocelulosa se preparó un sándwich (soporte / gel / membrana / soporte), el cual se llevó al equipo de transferencia por 40 minutos a 15 V. Pasado este tiempo se removieron las membranas y se colocaron en *cassettes* que contenían 25 mL de buffer de bloqueo con agitación por una hora a temperatura ambiente. Al término de este tiempo se enjuagaron las membranas tres veces por cinco minutos con el buffer de lavado. Se adicionó 5 mL de los anticuerpos primarios anti-Bcl-2, anti-Bax, anti-p53 en la proporción de

1:250, 1:5000, 1:1000 respectivamente en cada *cassette*, y se dejó incubar a 4°C por 12 horas con agitación constante.

Transcurridas las 12 horas se lavaron las membranas tres veces con el buffer de lavado por cinco minutos y se les agregó 5 µL del anticuerpo secundario conjugado en la proporción 1:2000, y se dejó incubar a temperatura ambiente nuevamente por una hora. Pasado este tiempo se volvió a lavar las membranas por tres veces con el buffer de lavado por cinco minutos, se agregó 6 mL del sustrato quimioluminiscente y se dejó incubar por cinco minutos a temperatura ambiente en agitación constante. Finalmente se llevaron las membranas al escáner para Western Blot (C-DiGit® LI-COR).

2.6. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA CASPASA-3 EN CÉLULAS PC-3 FRENTE AL TRATAMIENTO (EAEAM).

Para cuantificar la actividad de caspasa-3 se utilizó el kit de ensayo colorimétrico para caspasa-3 (BioVision Caspase-3/ CPP32, Massachusetts, EEUU). El kit de ensayo colorimétrico proporciona un medio simple y conveniente para determinar la actividad de caspasas que reconocen la secuencia DEVD.

La reacción se basa en la detección espectrofotométrica del cromóforo p-nitroanilina (pNA) a 405 nm después de la hidrólisis del sustrato peptídico Ac-DEVD-pNA por la caspasa-3.

Se trabajaron con células PC-3 agrupadas en dos grupos de estudio (A y B) a diferentes tiempos de exposición al tratamiento (concentración de mejor efecto del EAEAM).

Grupo A: el tiempo de exposición al tratamiento de EAEAM fue de 3 horas y se procedió de la siguiente forma: con el objetivo de cuantificar las proteínas totales se añadió 50 µL del buffer de lisis (adjunto en este kit) durante 10 minutos en hielo, y se procedió con el

lisado celular mencionado en el apartado 2.5.1, seguidamente se realizó el ensayo de BCA que se describe en el apartado 2.5.2.

Una vez obtenida la cantidad total de proteínas, se colocó 200 µg de proteína en una microplaca de 96 pozos, y a cada pozo se añadió 50 µl de tampón de reacción 2X (que contiene DTT) y 5 µl del sustrato peptídico Ac-DEVD-pNA 4 mM. Finalmente se incubó durante dos horas a 37°C. Pasado este periodo de incubación se tomó lectura de las absorbancias a 405 nm en el espectrofotómetro (Synergy HT - BioTek®).

Grupo B: el tiempo de exposición al tratamiento de EAEAM fue de 6 horas y se procedió de igual forma que con el grupo A.

Se realizaron 3 repeticiones para cada grupo, con su grupo control.

2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron expresados como media \pm SEM (error estándar de la media), seguido de las pruebas de significancia como son el análisis de varianza de una vía (ANOVA) y el test de Dunnet para comparaciones múltiples, a una $p < 0.05$, para estos se utilizó el software GraphPad Prism 6XML.



CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. CULTIVO CELULAR

La línea celular PC-3 presentó un desarrollo óptimo frente al medio F-12K, dado que este medio les brindó las condiciones adecuadas para que proliferen correctamente. Estas células fueron cultivadas en frascos que contenían el medio completo F-12K (conteniendo suero fetal bovino 10 % y penicilina-estreptomicina 5 %), luego de esto se llevaron los frascos con el subcultivo a incubar a una temperatura de 37°C y CO₂ al 5% y fueron observadas a diario para comprobar su crecimiento.

En la Figura 12 se puede apreciar la imagen de las células PC-3 por medio del microscopio óptico invertido con un objetivo de 10X. Esta imagen corresponde al primer día de haber realizado un pase celular.

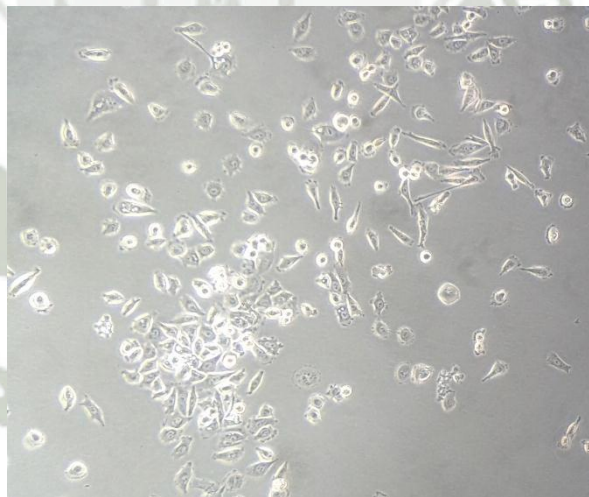


Fig.Nº 12: Imagen al microscopio del cultivo de células cancerígenas de próstata humana (PC-3) al primer día del pase.

Fuente: Registro de la Investigación

En la Figura 13 se puede apreciar la imagen de las células PC-3 por medio del microscopio óptico invertido con un objetivo de 10X. La imagen corresponde al

tercer día de haber realizado el pase y donde se observa una confluencia celular (adherencia de las células a la superficie del frasco de cultivo) del 90%.

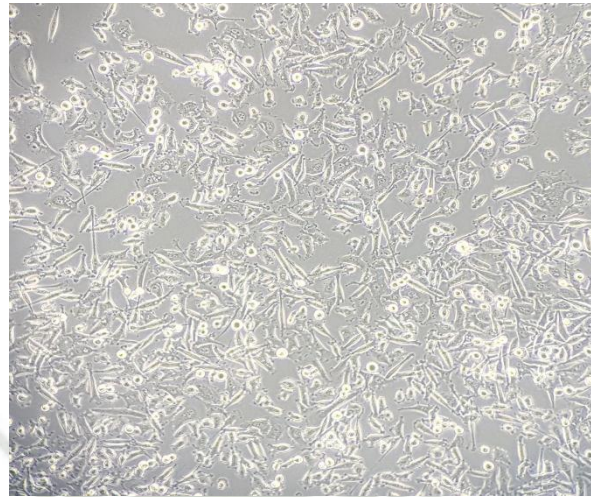


Fig.N° 13: Imagen al microscopio del cultivo de células cancerígenas de próstata humana (PC-3) al tercer día del pase.

Fuente: Registro de la Investigación

La línea celular HPrEC presentó un desarrollo óptimo frente al medio basal completo (conteniendo L-glutamina 6 mM, extracto P 0.4 %, epinefrina 1.0 mM, hemisuccinato de hidrocortisona 100 ng/mL, insulina 5 mg/mL, apo-transferrina 5 mg/mL, penicilina-estreptomocina-anfotericina B 5 %, TGF- α y rojo fenol 33 μ M), dado que este medio les brindó las condiciones adecuadas para que proliferen correctamente. Estas células fueron cultivadas en frascos que contenían el medio basal completo y luego de esto los frascos fueron llevados a incubar a una temperatura de 37°C y CO₂ al 5% siendo observadas a diario para comprobar su crecimiento.

En la Figura 14 se puede apreciar la imagen de las células HPrEC por medio del microscopio óptico invertido con un objetivo de 10X. Esta imagen corresponde al primer día de haber realizado un pase celular.

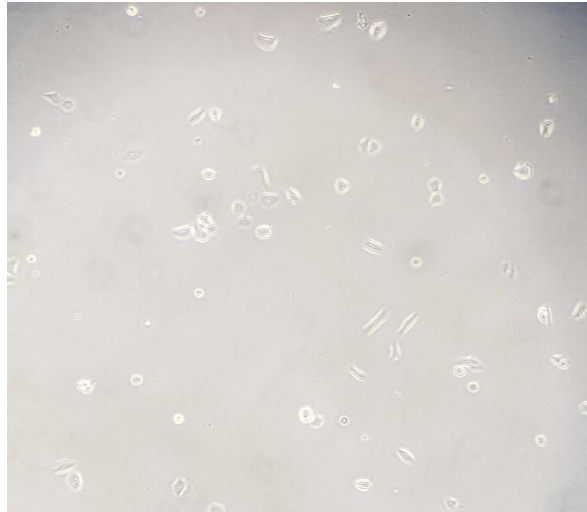


Fig.Nº 14: Imagen al microscopio del cultivo de células epiteliales sanas de próstata humana (HPrEC) al primer día del pase.

Fuente: Registro de la Investigación

En la Figura 15 se puede apreciar la imagen de las células HPrEC por medio del microscopio óptico invertido con un objetivo de 10X. Esta imagen corresponde al quinto día de haber realizado el pase y donde se observa una confluencia celular (adherencia de las células a la superficie del frasco de cultivo) del 90%.

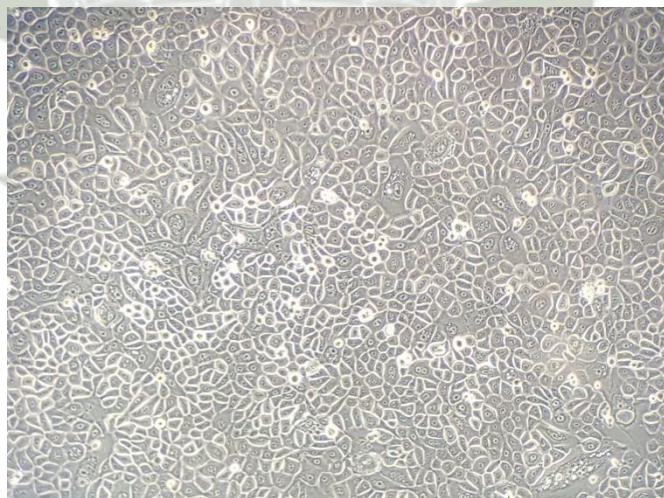


Fig.Nº 15: Imagen al microscopio del cultivo de células epiteliales sanas de próstata humana (HPrEC) al quinto día del pase.

Fuente: Registro de la Investigación

Cada tipo de célula creció correctamente dado que tenían su propio medio de crecimiento y éste les brindó los nutrientes necesarios para que puedan proliferar como se observa en las Figuras 13 y 15.

También se observó que las células HPrEC demoran más tiempo en crecer y reproducirse (cinco días) en comparación con las células PC-3 (tres días).

2. VIABILIDAD CELULAR

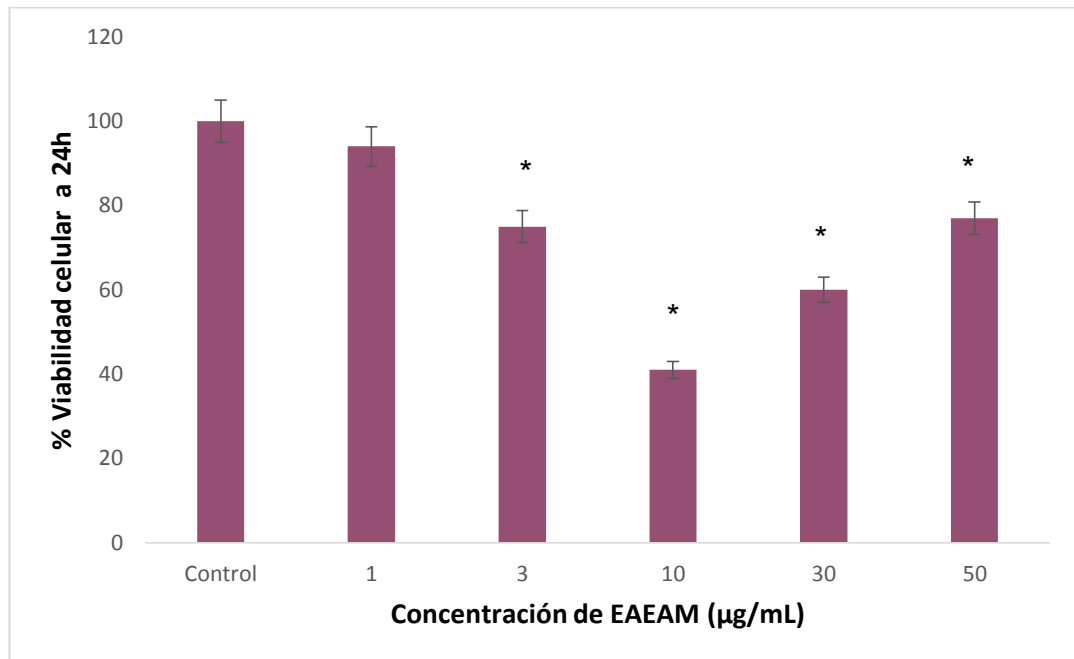
Se determinó el porcentaje de células viables mediante el ensayo de MTS luego de obtener una confluencia mayor al 90% en ambos tipos de células en la base del frasco de cultivo, HPrEC y PC-3 fueron contabilizadas en un contador automático de células, obteniendo siempre un porcentaje de células viables mayor al 95%. Una cantidad determinada de células (2×10^4 células/pozo) se sometieron a tratamiento con extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata* (1, 3, 10, 30 y 50 $\mu\text{g/mL}$) por 24, 48 y 72 horas.

En la Figura 16, 17 y 18 se puede observar la variación de la viabilidad celular de las células PC-3 tratadas con el extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata* (EAEAM) en relación al control (DMSO 0.2%)

La viabilidad celular de los grupos tratados con el extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata* (24, 48 y 72 horas) fueron expresados como porcentajes con respecto al grupo control, el cual tiene el 100% de células viables, utilizando la ecuación mencionada en el apartado 2.4.1.

En la Figura 16 se muestran los resultados obtenidos con el ensayo colorimétrico de MTS. Se puede notar que al comienzo (1 $\mu\text{g/mL}$ de EAEAM) no existe diferencia significativa. Conforme aumentó la concentración del EAEAM (3 y 10 $\mu\text{g/mL}$), el porcentaje de viabilidad celular disminuyó hasta llegar a los valores de 75% y 41 % respectivamente, una vez que se llegó a la concentración de EAEAM de 30 $\mu\text{g/mL}$, el porcentaje comenzó a incrementar e incluso a partir de 50 $\mu\text{g/mL}$, dicho porcentaje alcanzó valores de 77%.

Los datos muestran que existe una diferencia significativa ($*p<0.05$) en las concentraciones de 3, 10, 30 y 50 $\mu\text{g/mL}$ con respecto al grupo control.



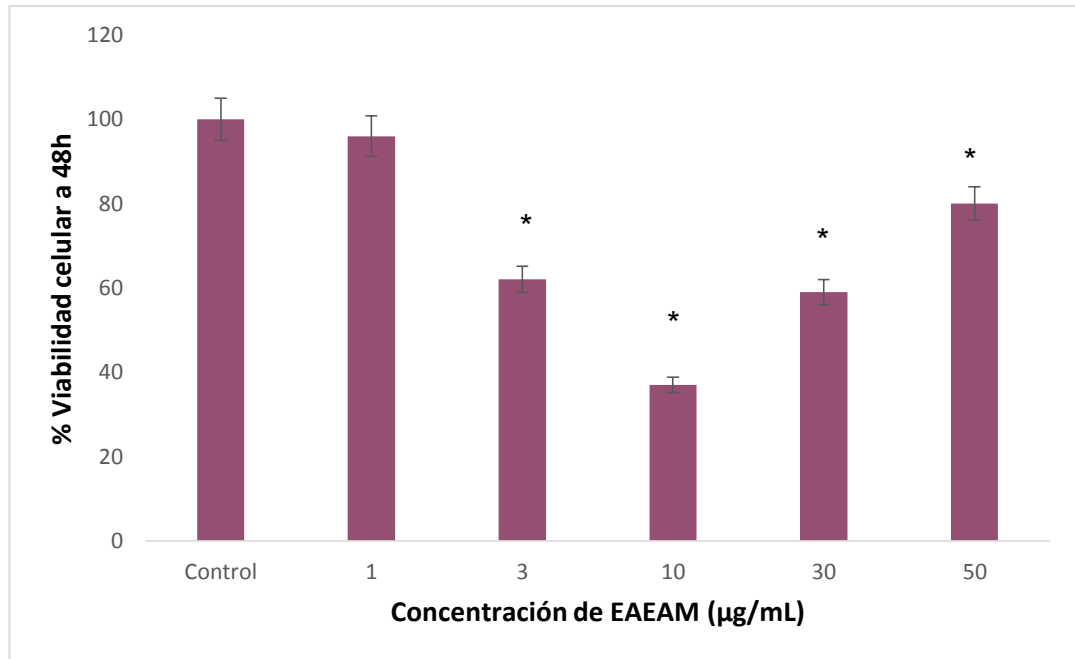
* $p<0.05$ vs Control; n=9

Fig.Nº 16: Efecto del extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata* (EAEAM) sobre la viabilidad celular durante 24 horas de aplicación en células cancerígenas de próstata humana (PC-3).

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 17 se muestran los resultados obtenidos con el ensayo colorimétrico de MTS. Se puede notar que al comienzo (1 $\mu\text{g/mL}$ de EAEAM) no existe diferencia significativa. Conforme aumentó la concentración del EAEAM (3 y 10 $\mu\text{g/mL}$), el porcentaje de viabilidad celular disminuyó hasta llegar a los valores de 62% y 37 % respectivamente, una vez que se llegó a la concentración de EAEAM de 30 $\mu\text{g/mL}$, el porcentaje comenzó a incrementar e incluso a partir de 50 $\mu\text{g/mL}$, dicho porcentaje alcanzó valores de 80%.

Los datos muestran que existe una diferencia significativa ($*p<0.05$) en las concentraciones de 3, 10, 30 y 50 $\mu\text{g/mL}$ con respecto al grupo control.



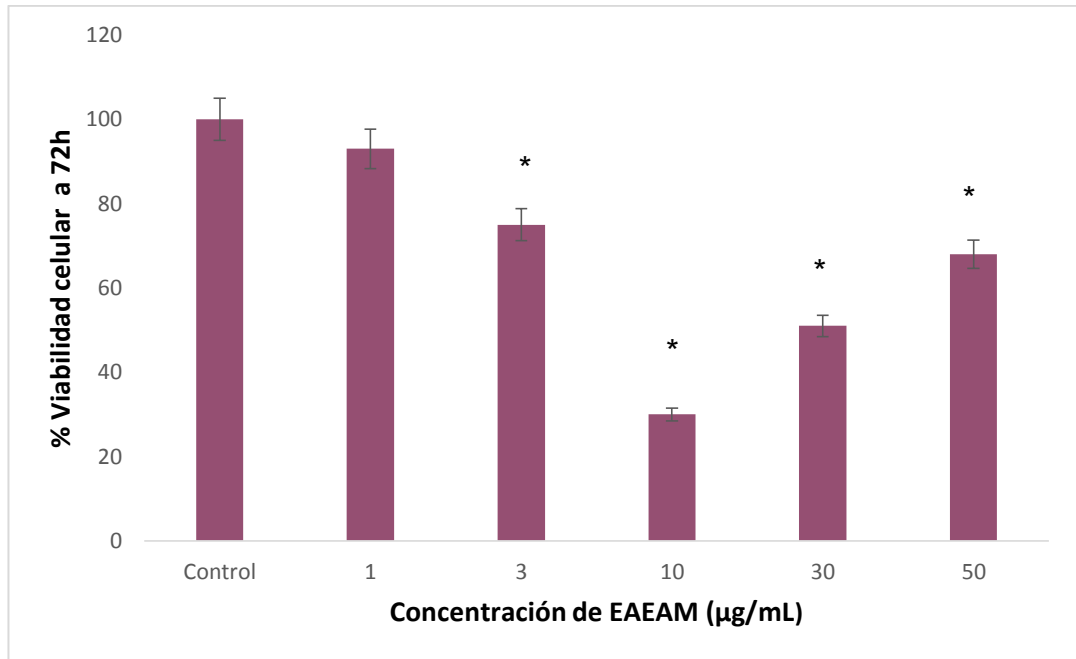
* $p < 0.05$ vs Control; $n = 9$

Fig.Nº 17: Efecto del extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata* (EAEAM) sobre la viabilidad celular durante 48 horas de aplicación en células cancerígenas de próstata humana (PC-3).

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 18 se muestran los resultados obtenidos con el ensayo colorimétrico de MTS. Se puede notar que al comienzo (1 µg/mL de EAEAM) no existe diferencia significativa. Conforme aumentó la concentración del EAEAM (3 y 10 µg/mL), el porcentaje de viabilidad celular disminuyó hasta llegar a los valores de 75% y 30 % respectivamente, una vez que se llegó a la concentración de EAEAM de 30 µg/mL, el porcentaje comenzó a incrementar e incluso a partir de 50 µg/mL, dicho porcentaje alcanzó valores de 68%.

Los datos muestran que existe una diferencia significativa (* $p < 0.05$) en las concentraciones de 3, 10, 30 y 50 µg/mL con respecto al grupo control.



*p<0.05 vs Control; n=9

Fig.Nº 18: Efecto del extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata* (EAEAM) sobre la viabilidad celular durante 72 horas de aplicación en células cancerígenas de próstata humana (PC-3).

Fuente: Elaboración propia

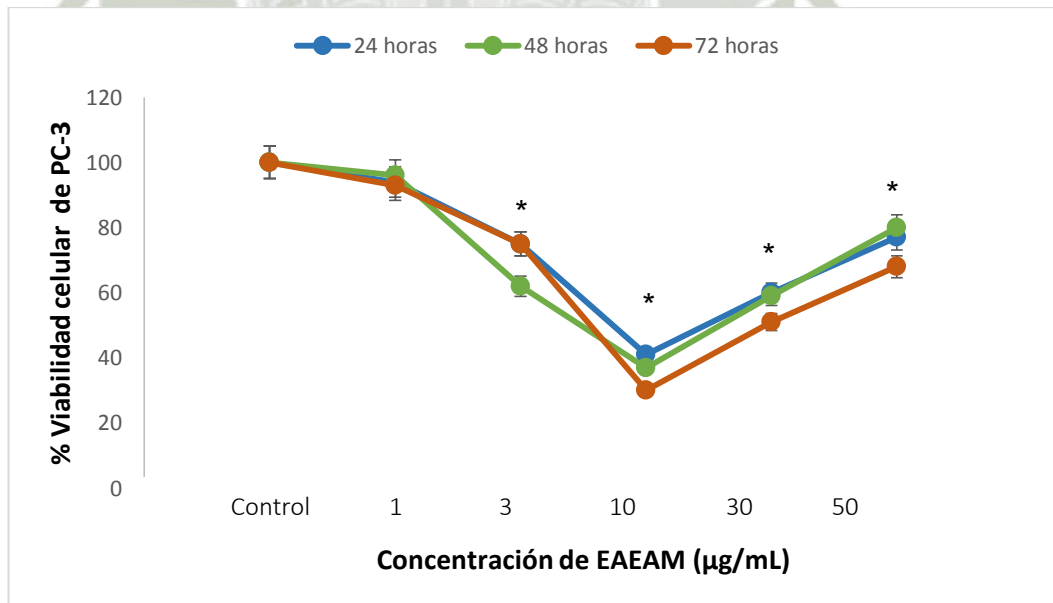


Fig.Nº 19: Viabilidad porcentual de células cancerígenas de próstata humana (PC-3) expuestas a distintas concentraciones de extracto en acetato de etilo de las hojas

de Annona muricata (EAEAM) durante 24, 48 y 72 horas. Cada punto es el valor promedio obtenido en tres experimentos independientes por triplicado. Las barras representan la desviación estándar.

Fuente: Elaboración propia

Tabla 6: Promedio del porcentaje de viabilidad celular frente a las distintas concentraciones del extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata* (EAEAM) en células de cáncer de próstata (PC-3).

	Control	1 µg/mL	3 µg/mL	10 µg/mL	30 µg/mL	50 µg/mL
24h	100%	94%	75%	41%	60%	77%
48h	100%	96%	62%	37%	59%	80%
72h	100%	93%	75%	30%	51%	68%

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 19 y Tabla 6, se evidenció el efecto apoptótico y antiproliferativo del extracto en estas células a diferentes tiempos de exposición al tratamiento. A partir de la concentración de 3 µg/mL se observa una diferencia estadísticamente significativa en la viabilidad celular.

Además se demostró que la concentración de 10 µg/mL es la de mayor efecto, dado que reduce la viabilidad de las PC-3 en un 59% en las primeras 24 horas luego de ser administrada, y sigue reduciendo la viabilidad de estas células mostrando una reducción del 63% a las 48 horas y del 70% a las 72 horas.

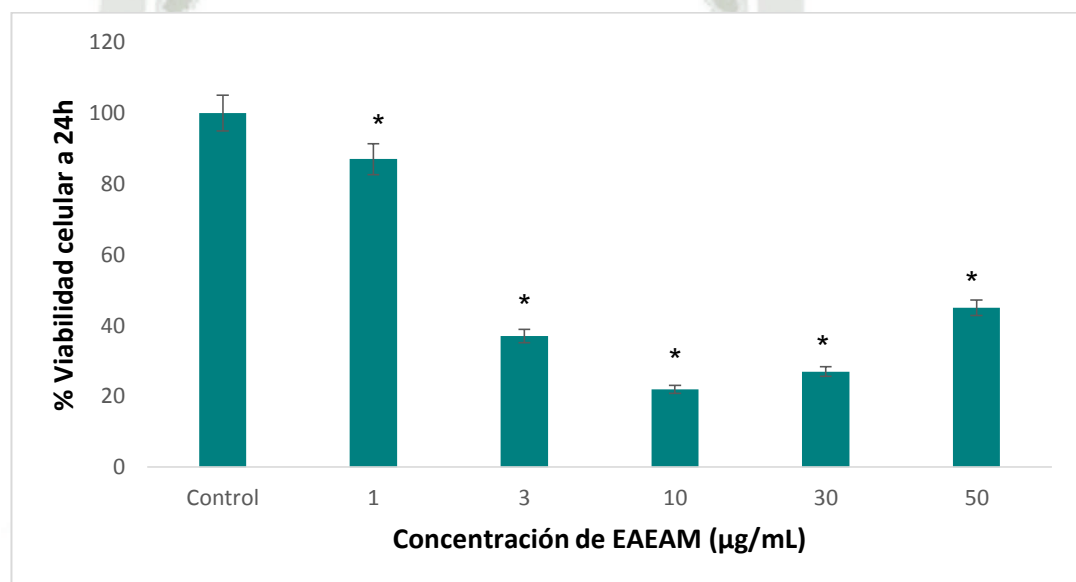
En la Figura 20, 21 y 22 se puede observar la variación de la viabilidad celular de las células HPrEC tratadas con el extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata* (EAEAM) en relación al control (DMSO 0.2%)

La viabilidad celular de los grupos tratados con el extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata* (24, 48 y 72 horas) fueron expresados como porcentajes con respecto al grupo control, el cual tiene el 100% de células viables, utilizando la ecuación mencionada en el apartado 2.4.1.

En la Figura 20 se muestran los resultados obtenidos con el ensayo colorimétrico de MTS. Se puede apreciar que desde la concentración menor (1

$\mu\text{g/mL}$ de EAEAM) existe diferencia significativa en el porcentaje de viabilidad celular con un valor de 87%. Conforme aumentó la concentración del EAEAM (3 y 10 $\mu\text{g/mL}$), el porcentaje de viabilidad celular disminuyó hasta llegar a los valores de 37% y 22 % respectivamente, una vez que se llegó a la concentración de EAEAM de 30 $\mu\text{g/mL}$, el porcentaje comenzó a incrementar e incluso a partir de 50 $\mu\text{g/mL}$, dicho porcentaje alcanzó valores de 45%.

Los datos muestran que existe una diferencia significativa ($*p<0.05$) en las concentraciones de 1, 3, 10, 30 y 50 $\mu\text{g/mL}$ con respecto al grupo control.



* $p<0.05$ vs Control; $n=9$

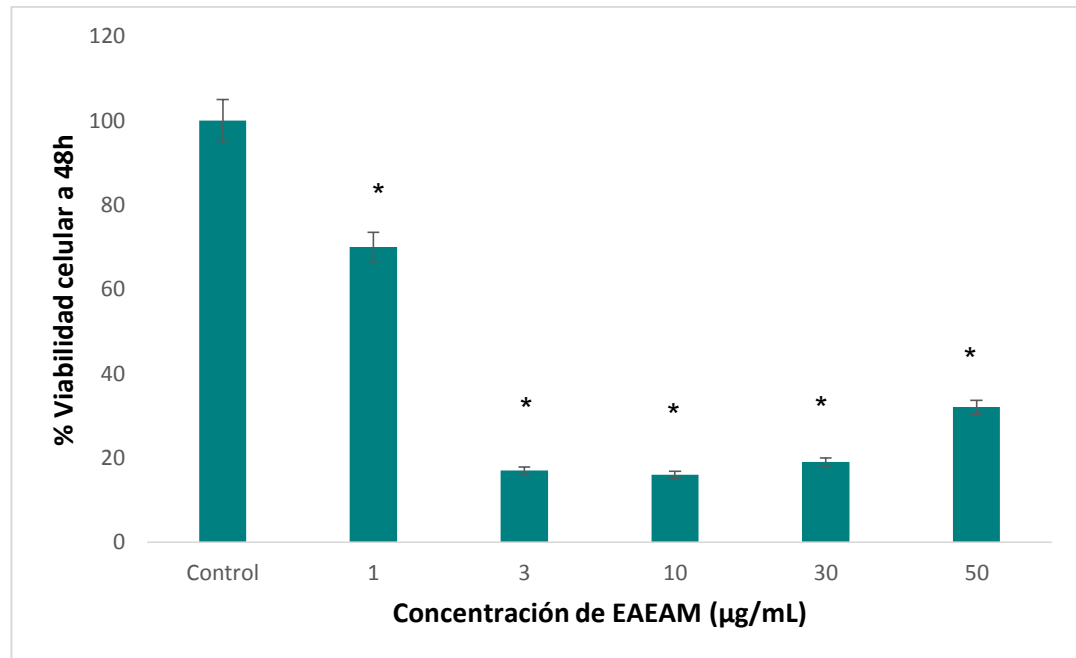
Fig.Nº 20: Efecto del extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata* (EAEAM) sobre la viabilidad celular durante 24 horas de aplicación en células epiteliales sanas de próstata humana (HPrEC).

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 21 se muestran los resultados obtenidos con el ensayo colorimétrico de MTS. Se puede apreciar que desde la concentración menor (1 $\mu\text{g/mL}$ de EAEAM) existe diferencia significativa en el porcentaje de viabilidad celular con un valor de 70%. Conforme aumentó la concentración del EAEAM (3 y 10 $\mu\text{g/mL}$), el porcentaje de viabilidad celular disminuyó hasta llegar a los valores de 17% y 16% respectivamente, una vez que se llegó a la concentración

de EAEAM de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, el porcentaje comenzó a incrementar e incluso a partir de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, dicho porcentaje alcanzó valores de 32%.

Los datos muestran que existe una diferencia significativa ($*p < 0.05$) en las concentraciones de 1, 3, 10, 30 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con respecto al grupo control.



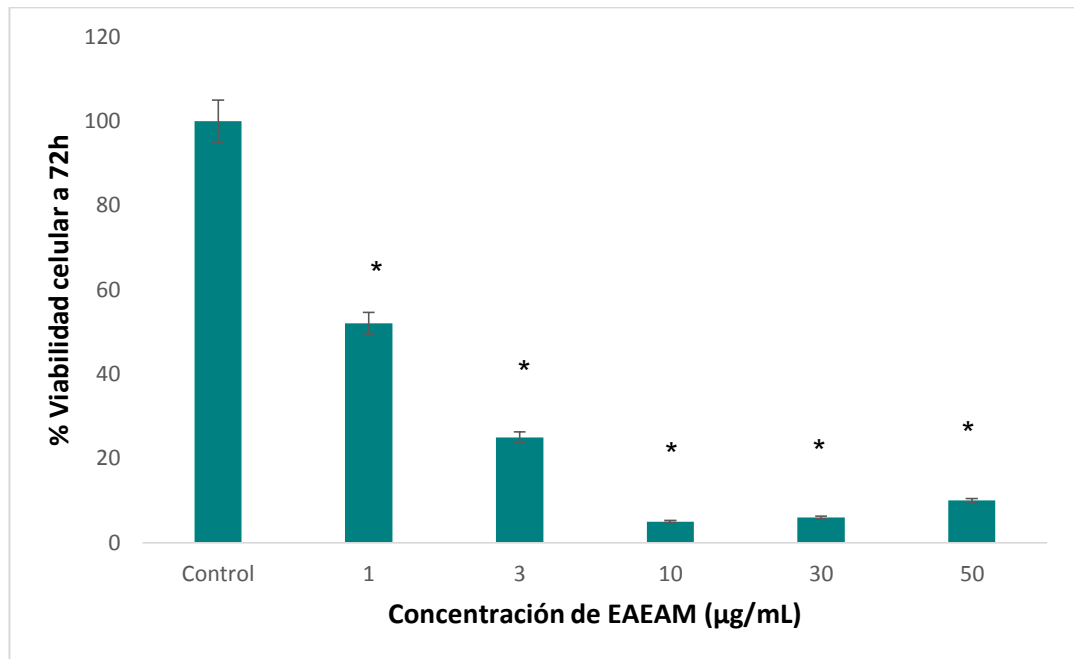
* $p < 0.05$ vs Control; $n=9$

Fig.N° 21: Efecto del extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata* (EAEAM) sobre la viabilidad celular durante 48 horas de aplicación en células epiteliales sanas de próstata humana (HPrEC).

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 22 se muestran los resultados obtenidos con el ensayo colorimétrico de MTS. Se puede apreciar que desde la concentración menor (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de EAEAM) existe diferencia significativa en el porcentaje de viabilidad celular con un valor de 52%. Conforme aumentó la concentración del EAEAM (3 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), el porcentaje de viabilidad celular disminuyó hasta llegar a los valores de 25% y 5 % respectivamente, una vez que se llegó a la concentración de EAEAM de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, el porcentaje comenzó a incrementar e incluso a partir de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, dicho porcentaje alcanzó valores de 10%.

Los datos muestran que existe una diferencia significativa ($*p<0.05$) en las concentraciones de 1, 3, 10, 30 y 50 $\mu\text{g/mL}$ con respecto al grupo control.



* $p<0.05$ vs Control; n=9

Fig.Nº 22: Efecto del extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata* (EAEAM) sobre la viabilidad celular durante 72 horas de aplicación en células epiteliales sanas de próstata humana (HPrEC).

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 23 y Tabla 7, se evidencia el efecto apoptótico y antiproliferativo del extracto en estas células a diferentes tiempos de exposición al tratamiento. A partir de la concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$ se observa una diferencia estadísticamente significativa en la viabilidad celular.

También se demostró que la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ es la de mayor efecto, dado que reduce la viabilidad de las HPrEC en un 78% en las primeras 24 horas luego de ser administrada, y sigue reduciendo la viabilidad de estas células mostrando una reducción del 84% a las 48 horas y del 95% a las 72 horas.

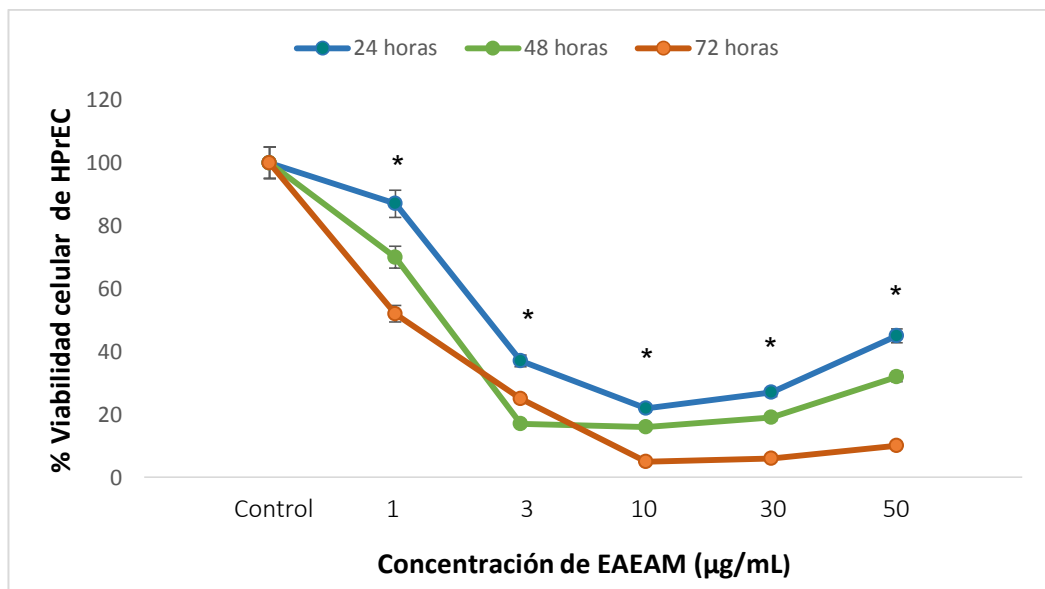


Fig.N° 23: Viabilidad porcentual de células epiteliales sanas de próstata humana (HPrEC) expuestas a distintas concentraciones de extracto en acetato de etilo de las hojas de Annona muricata (EAEAM) durante 24, 48 y 72 horas. Cada punto es el valor promedio obtenido en tres experimentos independientes por triplicado. Las barras representan la desviación estándar.

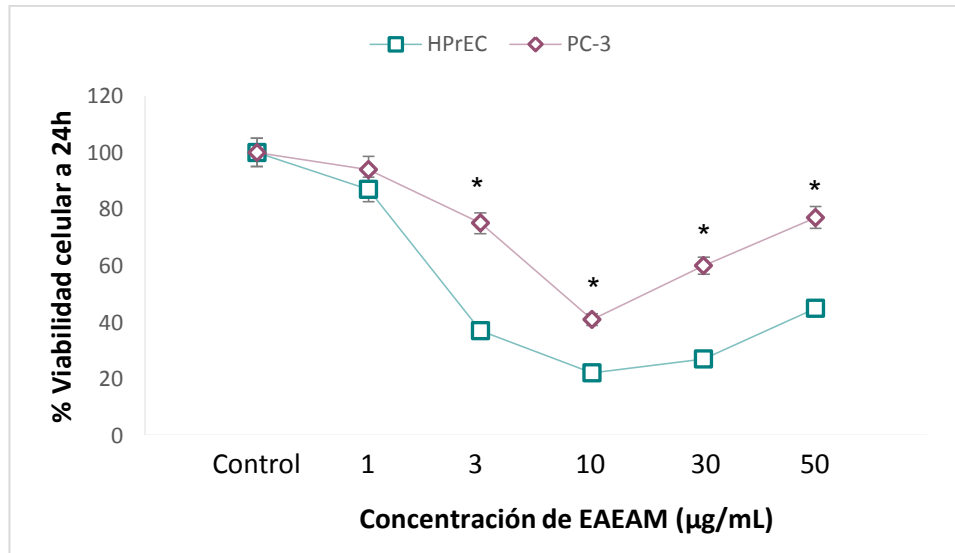
Fuente: Elaboración propia

Tabla 7: Promedio del porcentaje de viabilidad celular frente a las distintas concentraciones del extracto en acetato de etilo de las hojas de Annona muricata (EAEAM) en células epiteliales sanas de próstata humana (HPrEC).

	Control	1 µg/mL	3 µg/mL	10 µg/mL	30 µg/mL	50 µg/mL
24h	100%	87%	37%	22%	27%	45%
48h	100%	70%	17%	16%	19%	32%
72h	100%	52%	25%	5%	6%	10%

Fuente: Elaboración propia

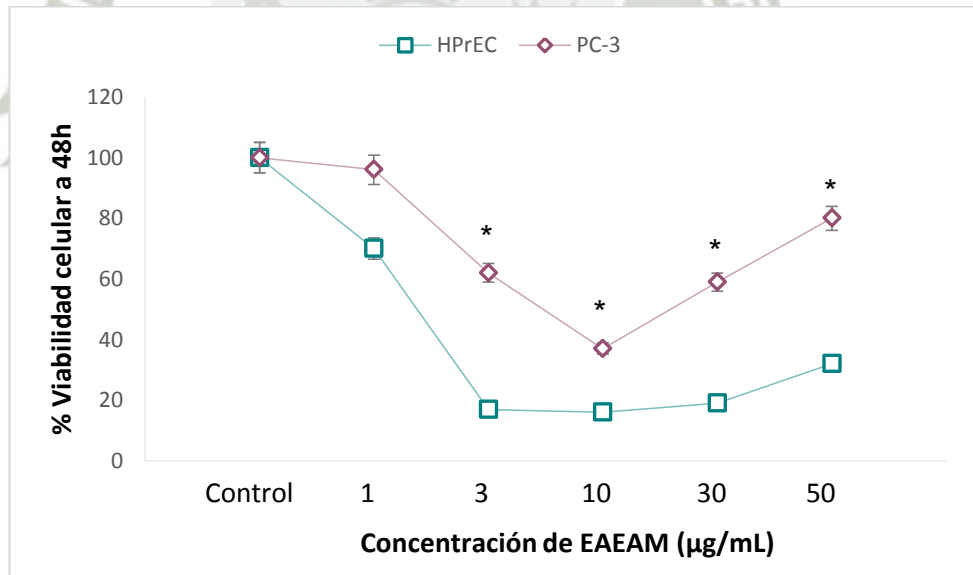
En las Figuras 24, 25 y 26 se observa la comparación de los resultados obtenidos de la viabilidad celular en ambas líneas celulares, en donde se muestra que existe una diferencia significativa entre los resultados de ambas líneas celulares. Siendo siempre la dosis de 10 µg/mL la más efectiva en ambas.



*p<0.05; n=9

Fig.Nº 24: Efecto del extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata* (EAEAM) sobre la viabilidad celular durante 24 horas de aplicación en células cancerígenas (PC-3) y en células epiteliales sanas de próstata humana (HPrEC).

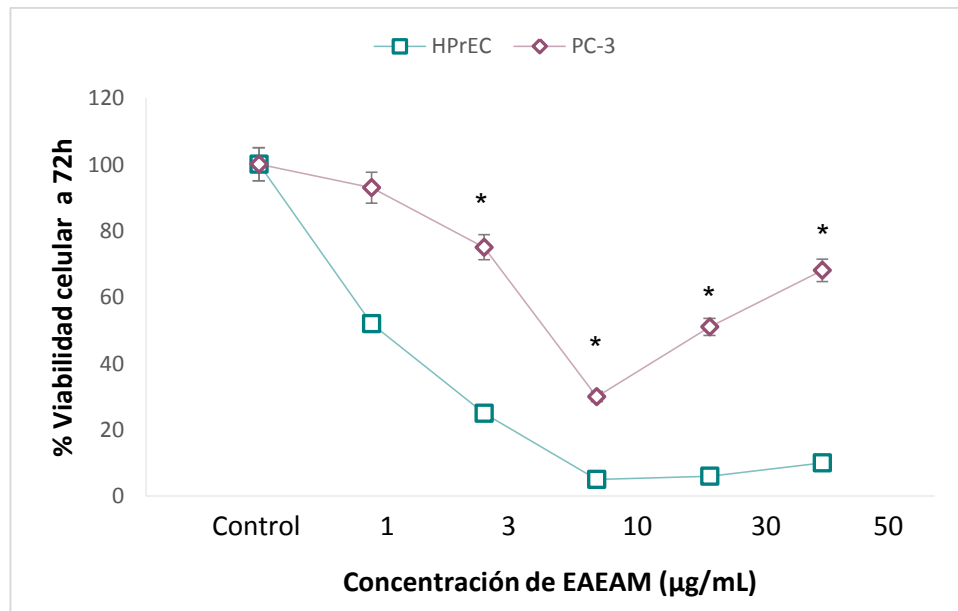
Fuente: Elaboración propia



*p<0.05; n=9

Fig.Nº 25: Efecto del extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata* (EAEAM) sobre la viabilidad celular durante 48 horas de aplicación en células cancerígenas (PC-3) y en células epiteliales sanas de próstata humana (HPrEC).

Fuente: Elaboración propia



* $p < 0.05$; $n = 3$

Fig.Nº 26: Efecto del extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata* (EAEAM) sobre la viabilidad celular durante 72 horas de aplicación en células cancerígenas (PC-3) y en células epiteliales sanas de próstata humana (HPrEC).

Fuente: Elaboración propia

La *Annona muricata* se describió como "el asesino del cáncer" debido a su notable citotoxicidad contra varias líneas celulares de cáncer. Las semillas y hojas de *Annona muricata* han sido ampliamente utilizadas por los nativos de Sudamérica para el tratamiento del cáncer y de los tumores.¹¹⁸ En estudios anteriores se ha demostrado la citotoxicidad del extracto de acetato de etilo de hojas de *Annona muricata* induciendo a apoptosis a las células cancerígenas de colon (HT-29 y HCT116) y células cancerígenas de pulmón (A549).^(118,119)

El estudio realizado por Zorofchian et al., 2014, donde utilizó dos líneas celulares de cáncer de colon (HT-29 y HCT-116) y células de colon normales (CCD841), encontró que el extracto de acetato de etilo de *Annona muricata* inducía la apoptosis en las células cancerígenas a una concentración de 10 µg/mL, y que a concentraciones mayores producía la muerte de las células de colon normales. Comparando estos resultados con los obtenidos en la presente investigación, corroboramos la capacidad antiproliferativa y apoptótica del

extracto de acetato de etilo de *Annona muricata* en las dos líneas celulares que hemos utilizado tanto las PC-3 y las HPrEC, siendo en donde difiere nuestra investigación con respecto a las células normales, ya que en la investigación realizada, el extracto aplicado en la misma concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ en ambas líneas celulares, producía apoptosis, siendo en las HPrEC de mayor porcentaje que en las PC-3. Por lo que el extracto no sólo produciría la muerte de las células cancerígenas de próstata sino también de las células epiteliales sanas de próstata.

El estudio realizado por M. Bogis, 2016, donde trabajó con células PC-3, demostró el efecto antiproliferativo y apoptótico de este extracto frente a estas células siendo este similar con el obtenido en esta investigación, con la diferencia que en el estudio realizado por M. Bogis, 2016, muestra que a partir de la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ se produce la muerte celular y en nuestro estudio se observó que a partir de una concentración de 3 $\mu\text{g/mL}$ se da la muerte celular.

3. DETECCIÓN DE Bcl-2, Bax Y p53

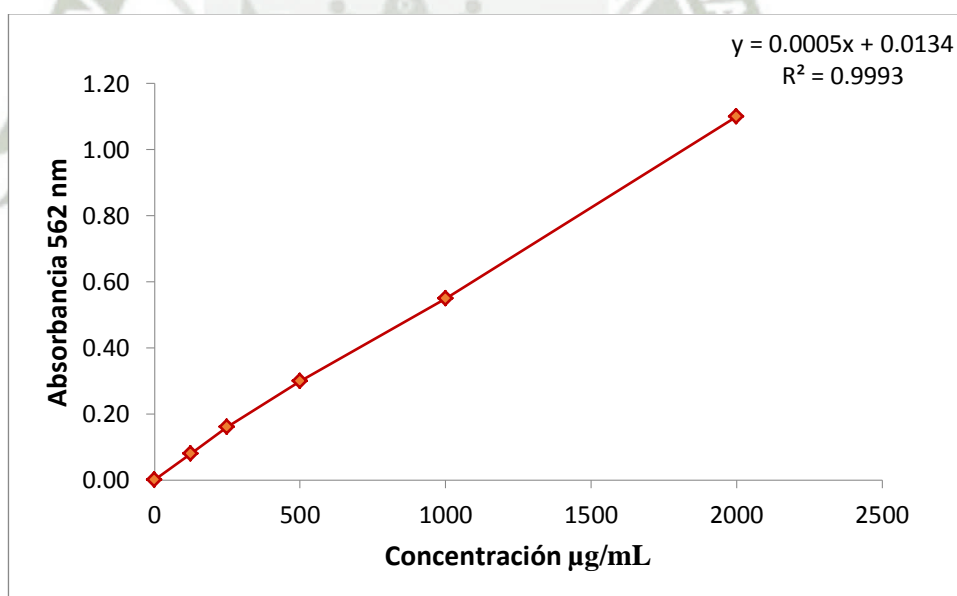
Para la identificación de las proteínas Bcl-2, Bax y p53 se aplicó la técnica de Western Blot. Previamente a aplicar ésta técnica se realizó el lisado celular de las células de cáncer de próstata (PC-3) y luego se desarrolló la cuantificación proteica mediante el método de BCA (ácido Bicinconínico), como se indicó en el capítulo de materiales y métodos.

Para hallar la concentración proteica de las muestras se utilizaron cinco estándares y un blanco; habiendo obtenido las absorbancias de cada estándar (Tabla 8) se procedió a construir la curva de calibración que se aprecia en la Figura 27. Tras haber construido la curva de calibración se hallaron los valores que se muestran en la Tabla 9.

Tabla 8: Absorbancias obtenidas de la albúmina (estándares) y las muestras en el ensayo de BCA.

	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia (562 nm)		
Albúmina	2000	1.331	1.175	1.142
	1000	0.675	0.685	0.634
	500	0.42	0.422	0.402
	250	0.282	0.271	0.276
	125	0.197	0.194	0.196
	0	0.099	0.101	0.149
Blanco	---	0.92	0.922	0.882
Muestra	---	0.803	0.773	0.782

Fuente: Elaboración propia



n=3

Fig.Nº 27: Curva de calibración para determinación de concentración proteica (562 nm).

Fuente: Elaboración propia

Tabla 9: Valores obtenidos a partir de la curva de calibración de albúmina.

Intercepto (m)	Valor B	Valor R ²
0.0005	0.0134	0.9993

Fuente: Elaboración propia

Con los valores obtenidos de la curva de calibración se construyó la ecuación de la recta que se ve a continuación:

$$y = 0.0005x + 0.0134$$

Ecuación N°2: Ecuación de la recta obtenida a partir de la curva de calibración

Fuente: Elaboración propia

Una vez obtenida la ecuación de la recta, se reemplazó el valor promedio de las absorbancias de las muestras (Tabla 8) y se reemplazó en la Ecuación N°2, obteniendo como resultado la concentración proteica total: en el control 3113.07 µg/mL y en las células PC-3 tratadas con el extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata* de 10 µg/mL una concentración proteica de 2625.07 µg/mL.

Después de haber determinado la concentración de proteínas presente en cada muestra, se procedió a realizar el cálculo correspondiente para saber que volumen del lisado celular se debía tomar, para que todas nuestras muestras tengan la misma cantidad de proteínas, que en este caso sería de 2625.07 µg/mL, teniendo como resultado que se debía extraer un volumen de 63.2 µL del lisado correspondiente al control y 75 µL del lisado correspondiente a la muestra con tratamiento, luego a ambos volúmenes se les añadió 25 µL del buffer reductor y 11.8 µL del diluyente PBS al volumen que corresponde al control para que al final, tanto la muestra como el control tengan un volumen de 100 µL. Luego de haber obtenido el volumen final, se llevó los tubos de microcentrifugación a incubar a 95°C por cinco minutos.

Se realizó el cálculo para saber qué cantidad de volumen se debía de tomar del control y de la muestra para tener una concentración de 40 µg y 50 µg de proteínas en cada pocillo del gel, donde se obtuvo que debían de tomarse 20.32

μL de la muestra y el control para tener una concentración de $40 \mu\text{g/celda}$ de proteína y $25.40 \mu\text{L}$ de la muestra y el control para tener una concentración de $50 \mu\text{g/celda}$ de proteína. Se usaron estas concentraciones de proteína, debido a que en ensayos anteriores con concentraciones de proteína menores a $40 \mu\text{g/celda}$ no se observaron las bandas de las proteínas a detectar (Bcl-2, Bax y p53).

Una vez obtenido la cantidad de μL que se necesitaban se procedió a realizar la técnica de Western Blot.

La inmunodetección se realizó con los anticuerpos de Bcl-2, Bax y p53. El equipo escáner blotting para Western Blot (Scanner C-DiGit, LICOR-), detectó la presencia de las bandas para cada gel que corresponden a las proteínas estudiadas (Bcl-2, Bax y p53). Se trabajaron 3 membranas de nitrocelulosa, la primera para la proteína Bcl-2, la segunda para la proteína Bax y la tercera para la proteína p53; y en cada una se utilizó un control positivo para cada proteína.

En la Figura 28 se observan cuatro bandas, siendo las dos primeras correspondientes a los carriles cargados con $40 \mu\text{g}$ de proteínas, en donde el carril 1 (C1) muestra una banda que corresponde al control positivo y en el carril 2 (C2) una banda que corresponde a la presencia de la proteína Bcl-2. Las dos últimas bandas corresponden a los carriles cargados con $50 \mu\text{g}$ de proteínas, siendo en el carril 3 (C3) donde se aprecia una banda que corresponde al control positivo y en el carril 4 (C4) se observa una banda que corresponde a la presencia de la proteína Bcl-2.

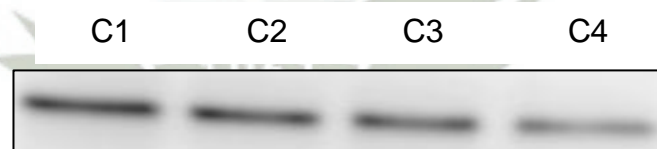
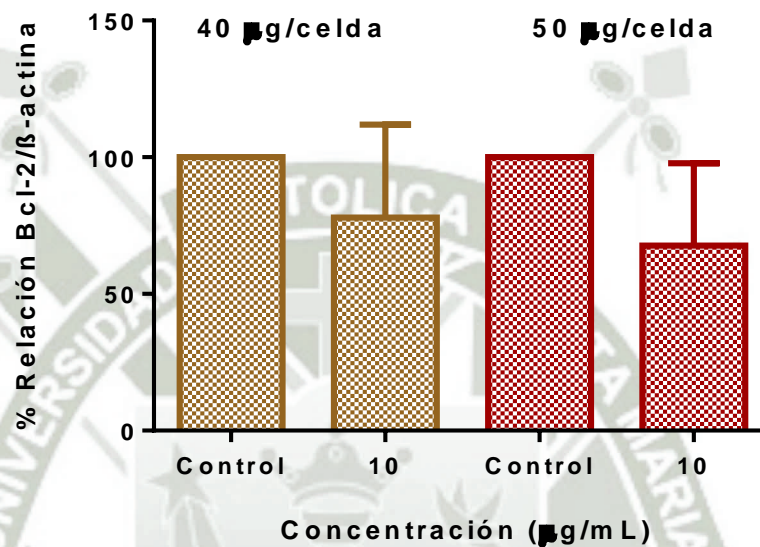


Fig.N° 28: Bandas de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 (26 kDa) detectadas mediante el análisis de Western Blot utilizando lisados celulares de PC-3 tratados con extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata* (EAEAM) de $10 \mu\text{g/mL}$.

Fuente: Registro de la investigación

La Figura 29 es la expresión porcentual de las bandas detectadas en la Figura 28, en esta gráfica se observa la disminución de la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 en presencia del tratamiento de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata*.



* $p < 0.05$ vs Control; $n = 3$

Fig.N° 29: Expresión de Bcl-2 en células cancerígenas (PC-3), tratadas con extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata* (EAEAM) de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 30 se observan dos bandas, siendo la primera correspondiente al carril 2 (C2) cargado con 40 μg de proteínas, y la segunda correspondiente al carril 4 (C4) cargado con 50 μg de proteínas, en donde se observa la presencia de la proteína Bax; los carriles 1 y 3 (C1 y C3) corresponden a los controles positivos para la proteína Bax, en donde se observa la ausencia de bandas, dado que esta proteína no se expresa en las células cancerígenas.

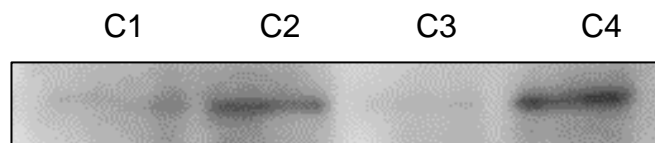
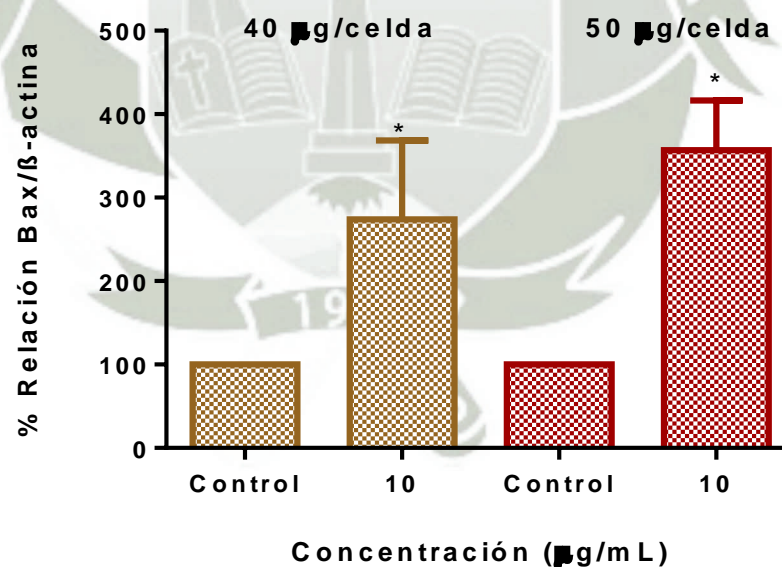


Fig.N° 30: Bandas de la proteína pro-apoptótica Bax (21 kDa) detectadas mediante el análisis de Western Blot utilizando lisados celulares de PC-3 tratados con extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata* (EAEAM) de 10 µg/mL.

Fuente: Registro de la Investigación

La Figura 31 es la expresión porcentual de las bandas detectadas en la Figura 30, en esta gráfica se observa el aumento de la expresión de la proteína pro-apoptótica Bax en presencia del tratamiento de 10 µg/mL de extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata*.



*p<0.05 vs Control; n=3

Fig.N° 31: Expresión de Bax en células cancerígenas (PC-3).tratadas con extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata* (EAEAM) de 10 µg/mL.

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 32 no se observan bandas de identificación de la proteína p53 en ninguno de los carriles a pesar que se colocó en el carril 1 (C1) y carril 2 (C2) una concentración de proteínas de 40 μg y en el carril 3 (C3) y carril 4 (C4) una concentración de proteínas de 50 μg .

C1 C2 C3 C4



Fig.Nº 32: Bandas de la proteína p53 (53 kDa) detectadas mediante el análisis de Western Blot utilizando lisados celulares de PC-3 tratados con extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata* (EAEAM) de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Fuente: Registro de la investigación

Los eventos mitocondriales apoptóticos están estrechamente regulados por los miembros de la familia de proteínas Bcl-2.¹²⁰ Las proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas en esta familia rigen la permeabilidad de la membrana mitocondrial. La proteína pro-apoptótica Bax a través de cambios conformacionales y la translocación a la mitocondria media la liberación de citocromo C.¹²¹ Mientras tanto, la proteína anti-apoptótica Bcl-2 suprime la fuga de citocromo c de las mitocondrias.¹²² El Bcl-2 fue el primer proto-oncogen detectado y fue asociado con procesos malignos de las células B. Durante la maduración de las células B puede ocurrir una traslocación cromosomal 14,18 en el gen Bcl-2; ello provoca un aumento en la expresión de la proteína citoplasmática Bcl-2, que origina inhibición de la apoptosis en células B y da como resultado la supervivencia de la célula transformada.¹²³ Está demostrado que la sobreexpresión del gen Bcl-2 en linfomas inducidos experimentalmente, se asocia con la proliferación neoplásica por los efectos inhibitorios de Bcl-2 sobre las vías de apoptosis.¹²⁴ Este gen facilita el aumento de la supervivencia de la célula transformada y de este modo aumenta la posibilidad de futuras

aberraciones genéticas que pueden conducir a la progresión maligna.^(125,126) La expresión de este gen en algunos tipos de cáncer es un marcador de mal pronóstico.¹²⁷

La formación del heterodímero Bcl-2 Bax tiene efecto inhibitorio en la muerte celular, al impedir la acción de las proteasas cisteínas que median señales de apoptosis. Sin embargo, la formación de homodímeros Bax-Bax, así como elevados niveles de Bax, pueden favorecer la muerte programada de la célula.^(128,129)

La Figura 28 corresponde a la identificación de la proteína antiapoptótica Bcl-2, ya que las bandas observadas en la membrana se ubican a la altura de 26 kDa, se observa que los controles que se encuentran en el carril 1 y el carril 3 (C1 y C3) muestran la presencia de la proteína en las células cancerígenas de próstata humana (PC-3), mientras que en los carriles 2 y 4 (C2 y C4) que contenían la muestra con tratamiento de 10 µg se observan unas bandas más tenues comparadas con su respectivo control; en la figura 29 se puede observar gráficamente la expresión de la proteína Bcl-2 en presencia del tratamiento con el extracto de acetato de etilo de *Annona muricata* a una concentración de 10 µg/mL, en donde se puede ver que existe una disminución de ésta proteína, mas no hay una diferencia significativa entre la muestra y el control.

Los resultados obtenidos en el presente estudio son comparables con el estudio realizado por Zorofchian et al., 2014, en donde se vió que el extracto de hojas de acetato de etilo de *Annona muricata* induce a la apoptosis en células HT-29 y HCT-116 mediante la disminución de la expresión de Bcl-2, y con el estudio realizado por M. Bogis, 2016, en células PC-3, se corrobora que el extracto con acetato de etilo de *Annona muricata* disminuye la expresión de Bcl-2. Esto nos indica que el extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata* utilizado en este estudio actúa disminuyendo la concentración de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 ya que esta se encuentra sobre expresada en la células cancerígenas.

La Figura 30 corresponde a la identificación de la proteína pro-apoptótica Bax, ya que las bandas observadas en la membrana se ubican a la altura de 21

kDa, se observa que los controles que se encuentran en el carril 1 y el carril 3 (C1 y C3) muestran la ausencia de la proteína en las células cancerígenas de próstata humana (PC-3), mientras que en los carriles 2 y 4 (C2 y C4) que contenían la muestra con tratamiento de 10 μg , se observa la presencia de bandas comparadas con su respectivo control; en la figura 31 se puede observar gráficamente la expresión de la proteína Bax en presencia del tratamiento con el extracto de acetato de etilo de *Annona muricata* a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en donde se puede ver que existe un aumento en la expresión de esta proteína presentando una diferencia significativa entre la muestra y el control.

Estos resultados obtenidos son comparables con el estudio realizado por Zorofchian et al., 2014, en donde vio que el extracto de hojas de acetato de etilo de *Annona muricata* induce a la apoptosis en células HT-29 y HCT-116 mediante el aumento de la expresión de Bax, y con el estudio realizado por M. Bogis, 2016, en células PC-3, se corrobora que el extracto con acetato de etilo de *Annona muricata* aumenta la expresión de Bax. Esto nos indica que el extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata* utilizado en este estudio actúa incrementando la concentración de la proteína proapoptótica Bax ya que esta no se encuentra expresada en las células cancerígenas.

Es conocido que ciertos oncogenes y genes supresores de tumor influyen en el mecanismo de muerte celular programada; tal es el caso del gen Bcl-2 que como ya ha sido descrito, bloquea la apoptosis cuando es sobreexpresado¹²⁴ y el gen p53, cuyo requerimiento se produce en casos de daño genómico.¹²⁷ La expresión de estos genes puede inducir a algunos tipos de cáncer a la apoptosis. Esto sugiere que la muerte celular programada es un mecanismo de defensa contra la transformación maligna.¹³⁰

El gen p53 ha sido llamado guardián del genoma por ser el encargado de bloquear la división celular cuando las células han sufrido daño en su material genético. Este bloqueo lo lleva a cabo deteniendo las células en la fase G1 del ciclo celular, con el objetivo de que se produzca la reparación del DNA antes de que se replique.^(131,132) Este gen mantiene la integridad del genoma ya que estimula la apoptosis en las células en las que el daño en el DNA ha sido

sustancial.¹³³ En diversos tipos celulares incluyendo los linfocitos, la sobreexpresión de p53 conduce directamente a la apoptosis.¹²⁷

La pérdida de la función normal del gen p53 puede conducir al desarrollo de neoplasias malignas; de hecho son muy frecuentes las alteraciones en este gen en una variedad de cánceres humanos (más del 50 % de los tumores humanos están asociados a mutaciones en p53).^(128,132) Hay evidencias que hacen pensar que el alto riesgo de la transformación maligna en ausencia de p53 funcional, probablemente origina una oportunidad reducida de reparar el DNA y una incapacidad de eliminar por apoptosis la célula dañada no reparada. Aunque es desconocida la base real de la apoptosis inducida por este gen.¹³⁴

Cuando se produce un daño en el genoma, el gen p53 resulta frecuentemente lesionado. Habitualmente, la alteración del gen p53 es una mutación localizada en zonas diferentes del gen. Estas mutaciones permiten que se produzca proteína p53 mutada, que pierde su capacidad para regular el ciclo celular e inducir apoptosis. Así, las células que tienen una mutación del gen p53 pueden proliferar sin reparar su ADN o sin morir por apoptosis, de forma incontrolada, hasta establecer, clones celulares malignos con capacidad de invasión.¹³⁵

En la Figura 32 no se observan bandas que correspondan a la identificación de la proteína p53, ya que éstas se deberían de observar a la altura de 53 kDa en los carriles 2 y 4 (C2 y C4), que contenían la muestra con el tratamiento de 10 µg/mL, esto nos indica que el extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata* no actúa a nivel de la proteína p53 ya que esta no se encuentra expresada en la células cancerígenas y el extracto no incrementa la expresión de ésta.

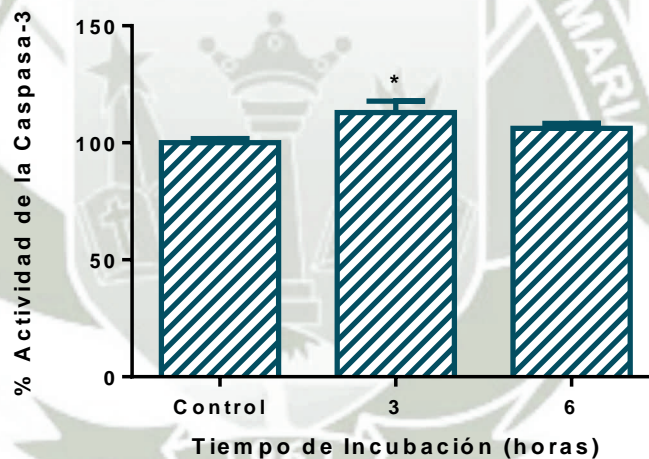
4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA CASPASA-3

Las caspasas pertenecen a una familia de cistein-proteasas que dividen sus sustratos específicamente después del ácido aspártico. Se han identificado 14 caspasas en mamíferos implicadas en la apoptosis. Son sintetizadas como pro-

enzimas (zimógenos) de 30-50 KD y requieren un proceso de proteólisis para ser activadas,¹³⁶ el que está comprendido de una cascada de precursores y coenzimas.¹³⁷

De todas las caspasas, la caspasa-3 ha sido caracterizada como la más vinculada a la apoptosis. Se ha sugerido que la expresión de la caspasa-3 aumenta la vulnerabilidad a la apoptosis o activa por sí misma la cascada de la apoptosis o hace ambas cosas a la vez. La caspasa-3 ha sido identificada en un amplio número de neoplasias benignas y malignas tales como ameloblastoma, carcinoma de células escamosas, cáncer de pulmón, neuroblastoma y linfoma.¹³⁸

En la Figura 33 se muestra una expresión positiva de caspasa-3, después de tres horas de exposición al tratamiento (EAEAM), en donde el incremento es significativo comparado con el control, con un aumento del 13%.



* $p < 0.05$ vs Control; $n = 3$

Fig.Nº 33: Actividad de la caspasa-3 en PC-3 frente al tratamiento de 10 $\mu\text{g/mL}$ del extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata*.

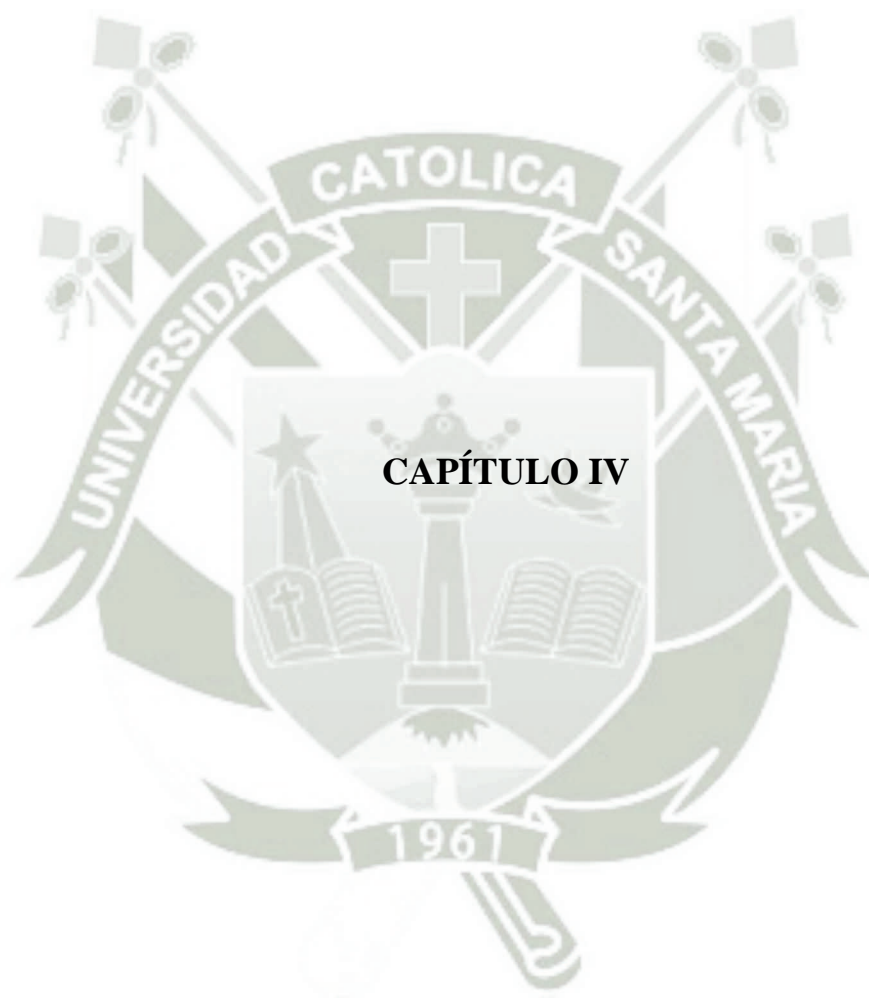
Fuente: Elaboración propia

Estos resultados obtenidos son comparables con el estudio realizado por Zorofchian et al., 2014, en donde se demostró, que el extracto de hojas de acetato de etilo de *Annona muricata* induce a la apoptosis en células HT-29 y HCT-116,

tal como en las PC-3 mediante el aumento de la actividad de la caspasa-3, difiriendo en el tiempo de exposición al tratamiento, siendo 24 horas para el estudio antes mencionado y tres horas en el presente estudio.

En el estudio realizado por M. Bogis, 2016, con células PC-3, encontramos igualdad de resultados con respecto al incremento significativo de la actividad de la caspasa-3, por lo que se corrobora que el extracto de acetato de etilo de *Annona muricata* aumenta la actividad de la caspasa-3 luego de tres horas de exposición frente al tratamiento. Esto nos indica que el extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata* (EAEAM) utilizado en este estudio actúa incrementando la actividad de la caspasa-3 desencadenando la muerte celular de las células cancerígenas.





CONCLUSIONES

1. Se obtuvo una confluencia celular mayor al 90% en las líneas celulares PC-3 y HPrEC.
2. El extracto de extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana) mostró un efecto apoptótico y antiproliferativo en las células cancerígenas (PC-3) y células epiteliales sanas de próstata humana (HPrEC) después de 24, 48 y 72 horas de exposición al tratamiento, además se demostró que la concentración de 10 µg/mL de EAEAM es la más efectiva en ambas líneas celulares.
3. Se determinó que el efecto apoptótico y antiproliferativo del extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata*, es producido mediante la vía mitocondrial, debido a que se observó una disminución en la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2, un aumento en la expresión de la proteína pro-apoptótica Bax, sin embargo la proteína p53 no se vió expresada.
4. Se comprobó que a las tres horas de exposición al extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata*, aumenta la actividad de la caspasa-3, implicada en la apoptosis.

SUGERENCIAS

1. Determinar el principio activo del extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata* responsable de la muerte celular tanto en las células PC-3 y las HPrEC.
2. Determinar a qué otras proteínas involucradas en la apoptosis afecta el extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata*.
3. Realizar estudios *in vitro* aplicando el extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata* en otras líneas celulares de cáncer.



REFERENCIAS

1. Organización Mundial de la Salud [Internet]. Cáncer; 2016 [citado 26 nov 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/cancer/es/>
2. Organización Mundial de la Salud [Internet]. Centro de Prensa. Cáncer. Datos y cifras; 2016 [citado 26 nov 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
3. Ferlay J, Shin HR, Bray F, y cols. GLOBOCAN 2012, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase No. 10. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2014.
4. Adewole, S.O.; Caxton-Martins, E.A. Morphological changes and hypoglycemic effects of *Annona muricata* Linn. (Annonaceae) leaf aqueous extract on pancreatic B-cells of streptozotocin-treated diabetic rats. *Afr. J. Biomed. Res.* 2006, 9, 173–187.
5. Cáncer.vg [Internet]. Hojas y pulpa de guanábana. 2016 [citado 26 nov 2016]. Disponible en: <http://www.cancer.vg/es/annona-muricata-guanabana-graviola/>
6. Albert V, Maestro E. Cáncer de próstata. *Semergen* 2002;28(6):315-23.
7. Scher HI, Isaacs JT, Zelefsky MJ and Scardino PT. Prostate Cancer. In Abeloff MD, Armitage JO, Lichter AS, Niederhuber JE. Eds., *Clinical Oncology*, Second Ed Churchill Livingstone, 2000:1825.
8. Watanabe M, Imai H, Suimazaki J et al. Microsatellite instability in human prostate cancer. *Br J Cancer* 1995;72:562-4.
9. Cunningham JM, Shan A, Wick MJ et al. Allelic imbalance and microsatellite instability in prostate adenocarcinoma. *Cancer Res* 1996;56:4475-82.

10. Brawley OW. Prostate cancer epidemiology in the United States. *World J Urol*. 2012; 30 (2): 195-200.
11. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures for African Americans 2013-2014*. Atlanta, Ga: American Cancer Society; 2013.
12. Bosland MD. The etiopathogenesis of prostatic cancer with special reference to environmental factors. *Adv Cancer Res* 1988;51:1-6.
13. ESMO.org [Internet]. ESMO/ACF Patient Guide Series basada en las Guías de Práctica Clínica de la ESMO; 2016 [citado 9 nov 2016]. Disponible en: <https://www.esmo.org/content/download/6628/115197/file/ES-Cancer-de-Prostata-Guia-para-Pacientes.pdf>
14. Gimenez S. Patologías de la próstata. Revisión. *Farmacia Profesional* 2003;17(1):38-44.
15. American Joint Committee on Cancer. Prostate. In: *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York, NY: Springer; 2010:457-464.
16. Richie JP, Catalona WJ, Ahmann FR, Hudson MA, Scardino PT, Flanigan RC, deKernion JB, Ratliff TL, Kavoussi LR, Dalkin BL. Effect of patient age on early detection of prostate cancer with serum prostate-specific antigen and digital rectal examination. *Urology* 1993 Oct;42(4):365-74.
17. Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Parnes HL, Minasian LM, Ford LG, Lippman SM, Crawford ED, Crowley JJ, Coltman CA Jr. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level ≤ 4.0 ng per milliliter. *N Engl J Med* 2004 May 27;350(22):2239-46.
18. Bianco FJ Jr, Scardino PT, Eastham JA. Radical prostatectomy: long-term cancer control and recovery of sexual and urinary function (“trifecta”). *Urology* 2005 Nov;66(5Suppl):83-94.
19. Corral DA, Bahnson RR. Survival of men with clinically localized prostate cancer detected in the eighth decade of life. *J Urol* 1994 May;151(5):1326-29.
20. D’Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB et al. A multivariable analysis of clinical factors predicting for pathological features associated with local failure after radical prostatectomy for prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994;30:293-302.

21. Zietman AL, Coen JJ, Dallow KC et al. The treatment of prostate cancer by conventional radiation therapy: An analysis of long-term outcome. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;32(2):287-92.
22. Galceran JC, Pérez C. Tratamiento del cáncer de próstata hormonoindependiente. *Revista de Oncología* 2000;2(2):67-73.
23. Tannock I, Osoba D, Stockler MR et al. Chemotherapy with mitoxantrone plus prednisone or prednisone alone for symptomatic hormone-resistant prostate cancer: a Canadian randomized trial with palliative end points. *J Clin Oncol* 1996;14:1756-1764.
24. FLORES, P.S. Cultivo de frutales nativos amazónicos. Manual para el extensionista. *Tratado de Cooperación Amazónica*. Secretaría Pro Tempore. Lima Perú, 1997.307 pp.
25. Soukup J. Vocabulario de los nombres vulgares de la flora peruana y catálogo de los géneros. Lima: Editorial Salesiana; 1987.
26. Kim GS, Zeng L, Alali L, Wu F, Sastrodihardjo S, McLaughlin J. Muricoreacin and murihexocin C. monotetrahydrofuran acetogenins from the leaves of *Annona muricata*. *Phytochemistry* 1998; 49(2): 565-71.
27. Kim GS, Zeng L, Alali L, Wu F, Sastrodihardjo S, McLaughlin J. Muricoreacin and murihexocin C. monotetrahydrofuran acetogenins from the leaves of *Annona muricata*. *Phytochemistry* 1998; 49(2): 565-71.
28. Hopp DC, Zeng L, Gu Z, McLaughlin JL. Squamotacin: an annonaceous acetogenin with cytotoxic selectivity for the human prostate tumor cell line PC-3. *J Nat Prod* 1997; 59(2): 97-99.
29. Chang FR, Liaw CC, Lin CY, Chou CJ, Chiu HF, Wu YC. New adjacent Bis-tetrahydrofuran Annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. *Planta Med* 2003; 69(3): 241-46.
30. Tormo J, González M, Cortes D, Estornell E. Kinetic characterization of mitochondrial complex I inhibitors using annonaceous acetogenins. *Arch Biochem Biophys* 1999; 369(1): 119-26.
31. Dspace.unapiquitos.edu.pe [Internet]. “PROPAGACIÓN BOTANICA DE *Annona muricata* L. “Guanabana” BAJO CUATRO SUSTRATOS EN IQUITOS - PERÚ” ; 2016 [citado 11 nov 2016]. Disponible en:

<http://dspace.unapiquitos.edu.pe/bitstream/unapiquitos/354/1/TESIS%20HILDA%20SOPLIN%20-%20GUANABANA.pdf>

32. García, j. H. Actividad tóxica de los extractos de la corteza de tallo de *annona cherimolioides* (annonaceae) sobre *artemia salina*. 2012. *Biol.cient.mus.hist.nat*, 17-22.
33. Alali, F. K. Annonaceous acetogenins as natural pesticides: Potent toxicity against insecticide-susceptible and insecticide-resistant German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). *Journal of economic entomology*, 1998, 91(3), 641-649.
34. Romano, V. A. Biomimetic approach to the stereoselective synthesis of acetogenins. *Pure Appl. Chem*, 2003, 75(3), 259–264.
35. Robledo-Reyes, P. Evaluación de la toxicidad de acetogeninas annonáceas sobre ninfas de *Periplaneta Americana*. *Boletín del Museo de entomología de la Universidad del Valle*, 2008, 54-61.
36. Alali, F., & Mc. Laughlin, J. Annonaceous acetogenins: Recent progress. *J Nat Prod*, 1999, 62(3), 504- 540.
37. He, K., ZENG, L., YE, Q., SHI, G., OBERLIES, N. H., ZHO, G., y otros. Comparative Evaluations of Acetogenins for Pesticidal Activity. *Nat. Prod. Rep.*, 14, 81-84.
38. Rupprechet, J. H. Annonaceous Acetogenins: A Review. Department of Medicinal Chemistry and Pharmacognosy, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. Purdue University, West Lafayette. Indiana- *Nat. Prod. Rep.* 1990, 53.
39. Jaramillo, M.; Arango, G.; Gonzalez, M.; Robledo, S.; Velez, I.D. Cytotoxicity and antileishmanial activity of *Annona muricata* pericarp. *Fitoterapia* 2000, 71, 183–186.
40. Moghadamtousi, S.Z.; Kadir, H.A.; Paydar, M.; Rouhollahi, E.; Karimian, H. *Annona muricata* leaves induced apoptosis in A549 cells through mitochondrial-mediated pathway and involvement of NF- κ B. *BMC Complement. Altern. Med.* 2014, 14, 299.
41. Moghadamtousi, S.Z.; Karimian, H.; Rouhollahi, E.; Paydar, M.; Fadaeinasab, M.; Kadir, H.A. *Annona muricata* leaves induce g1 cell cycle arrest and apoptosis

- through mitochondria-mediated pathway in human HCT-116 and HT-29 colon cancer cells. *J. Ethnopharmacol.* 2014, 156, 277–289.
42. Bedford, S. B. (1992). Iodoetherification of Homoallylic Alcohols-A Stereoselective Approach to Tetrahydrofurans". *Tetrahedron Lett.*,1992, 33, 6511.
43. Tormo, J. E.-P. Gamma-lactone-Functionalized antitumoral acetogenins are the most potent inhibitors of mitochondrial complex I. *Bioorg Med Chem Lett.*,2001, 11(5), 681-4.
44. Chahboune, N. B.-P. Guanaconetins, new antitumoral acetogenins, mitochondrial complex I and tumor cell growth inhibitors. *Bioorg Med Chem.*, 2006, 14(4), 1089-94.
45. Kojima, N. T. Medicinal Chemistry of Annonaceous Acetogenins: Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel Analogues. *Molecules*, 2009, 14(9), 3621-3661.
46. Uclm.net [Internet]. Apoptosis: Muerte celular programada; 2016 [citado 11 nov 2016]. Disponible en: <http://www.uclm.net/profesorado/jjordan/pdf/review/10.pdf>.
47. Martín SJ. Apoptosis: suicide, execution or murder? *Trens in cell biology* [Internet]. 2016 [citado 13 nov 2016];3(5). Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096289249390128N>
48. Kurokawa M, Kornbluth S. Caspases and kinases in a death grip. *Cell* 2009; 138:838-54.
49. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004; 116:205-19.
50. Rev Cubana Pediatr [Internet]. Christian López LC, Abreu Díaz L, Rabassa Pérez J, Chevalier P, Parra Fernández V. Estudio de apoptosis linfoide por esteroides en 1 caso con miastenia gravis: seguimiento por ultrasonografía.. 2016 [citado 13 nov 2016]; 73(1). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S003475312001000100010&script=sci_arttext.

51. Med.unne.edu.ar. [Internet]. Apoptosis, 2016 [citado 13 nov 2016]. Disponible en:<http://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/Carrera-Medicina/BIOQUIMICA/apoptosis.pdf>.
52. Silvestri F, Ribatti D, Nico B, Silvestri, Romito A, Dammacco F. Apoptosis or programmata cell death: regulatory and pathophysiological mechanisms (editorial). Ann Ital Med Int [Internet]. 2016 [citado 13 nov 2016];10(1). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7727211>
53. Cory S. Regulation of lymphocyte survived by the Bcl-2 gene family. Annu Rev Immunol [Internet]. 2016 [citado 13 nov 2016];13. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7612233>
54. Conradt B, Xue D. Programmed cell death. WormBook 2005; 6:1-13.
55. Gulbins E, Dreschers S, Bock J. Role of mitochondria in apoptosis. Exp Physiol 2003; 88:85-90.
56. Fulda S, Debatin K. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. Oncogene 2006; 25: 47984811.
57. Reap EA, Felix NJ, Wolthusen PA, Kotzin BL, Cohen PL, Eisenberg RA. Bel-2 transgenic Lpr mice show profound enhauecement of lymphadenopathy. J Immunol [Internet]. 2016 [citado 16 nov 2016];155(11). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7594564>
58. Wigdorovitz de Wikinski RL, Negri GA. Historia y actividades actuales. Acta Bioquím Clín Latinoam [Internet]. 2016 [citado 16 nov 2016];44(3). Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S032529572010000300011
59. Tartas NE. Foncuberta MC. Sánchez Avalos JC. Tratamiento de las neoplasias hematológicas en el embarazo. Medicina (Buenos Aires) [Internet]. 2016 [citado 16 nov 2016];67(6-2). Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S002576802007000600014
60. Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. Oncogene. 2003; 22: 85908607.

61. Tsujimoto Y, Bashir MM, Givol I, Cossman J, Jaffe E, Croce CM (1987) DNA rearrangements in human follicular lymphoma can involve the 5' or the 3' region of the bcl-2 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:1329-1331.
62. Hardwick JM, Youle RJ. SnapShot: Bcl-2 proteins. *Cell*. 2009; 138 (2): 404.
63. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer S, Korsmeyer J. Bcl2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 1993; 74: 609-619.
64. Polager S, Kalma Y, Berkovich E, Ginsberg D. E2Fs upregulate expressions of genes involved in DNA replication, DNA repair and mitosis. *Oncogene*. 2002; 21: 437446.
65. Gross A, McDonnell J, Korsmeyer S. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*. 1999; 13: 1899-1911.
66. Youle RJ, Strasser A (2008) The Bcl-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature Rev*. 9: 47-59.
67. Borner C (1996) Diminished cell proliferation associated with the death-protective activity of Bcl-2. *J Biol Chem* 271:12695-12698.
68. Crescenzi E, Palumbo G, Brady HJ (2003) Bcl-2 activates a programme of premature senescence in human carcinoma cells. *Biochem J* 375:263-274.
69. López-Diazguerrero NE, López-Araiza H, CondePérezprina JC, Bucio L, Cárdenas MC, Ventura JL, Covarrubias L, Gutiérrez-Ruiz MC, Zentella A, Königsberg M (2006) Bcl-2 protects against oxidative stress while inducing premature senescence. *Free Radic Biol Med* 40: 1161-1169.
70. Adams JM, Cory S (2007) The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 26:1324-1337.
71. Yin C, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Van Dyke T. Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo. *Nature* 1997;385(6617):637-640.
72. Suzuki M, Youle RJ, Tjandra N. Structure of Bax: Coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* 2000;103(4):645-654.
73. Yoo KC, Yoon CH, Kwon D, Hyun KH, Woo SJ, Kim RK, Lim EJ, Suh Y, Kim MJ, Yoon TH, Lee SJ. Titanium dioxide induces apoptotic cell death through reactive oxygen species-mediated Fas upregulation and Bax activation. *Int J Nanomedicine* 2012;7:1203-1214.

74. Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* 2000;20(3):929–935.
75. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997;91(4):479–489.
76. Soderquist R, Pletnev AA, Danilov AV, Eastman A. The putative BH3 mimetic S1 sensitizes leukemia to ABT-737 by increasing reactive oxygen species, inducing endoplasmic reticulum stress, and upregulating the BH3-only protein NOXA. *Apoptosis*. 2014; 19 (1): 201-209. doi: 10.1007/s10495-013-0910
77. Wali JA, Rondas D, McKenzie MD, Zhao Y, Elkerbout L, Fynch S et al. The proapoptotic BH3-only proteins Bim and PUMA are downstream of endoplasmic reticulum and mitochondrial oxidative stress in pancreatic islets in response to glucotoxicity. *Cell Death Dis*. 2014; 13 (5): e1124. doi: 10.1038/cddis.2014.88.
78. Shamas-Din A, Brahmhatt H, Leber B, Andrews DW. BH3-only proteins: orchestrators of apoptosis. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2011; 1813: 508-520.
79. Lane D, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 1979; 278: 261-263.
80. Linzer DI, Levine AJ. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells an uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 1979; 17: 43-52.
81. Levine, A.; Perry, M.; Chang, A.; Silver, A.; Dittmer, D.; Wu, M.; Welsh, D. “The 1993 Walter Hubert Lecture: “The role of the p53 tumor-suppressor gene in tumorigenesis”. *Rev Cancer* 69: 409-416, 1994.
82. Cooper G. *Oncogenes*. Jones and Bartlett Publishers, 1995. 151-152, 175-176.
83. Symonds H, Krall C, Remington L, Dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo. *Cell* 1994; 78:703.
84. Funk JO, Kind P. [Cell cycle control, genetic instability and cancer] *Hautarzt* 1997; 48(3):157-65.
85. Perry ME, Levine AJ. Tumor suppressor p53 and the cell cycle. *Curr Opin Genet Devel* 1993; 3:50.

86. Lane DP, et al. "Regulation of p53 stability. The role of Mdm2 and nuclear export." CRC Laboratories. University of Dundee. (2002).
87. Senturk S, Yao Z, Camiolo M, Stiles B, Rathod T, Walsh AM, Nemaierova A, Lazzara MJ, Altorki NK, Krainer A, Moll UM, Lowe SW, Cartegni L, Sordella R. p53 ζ is a transcriptionally inactive p53 isoform able to reprogram cells toward a metastatic-like state. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Aug 12;111(32):E3287-96. Epub 2014 Jul 29.
88. Cerretti DP, Kozlosky CJ, Mosley B, Nelson N, Van Ness K, Greenstreet TA, March CJ, Kronheim SR, Black RA. Molecular cloning of the interleukin1b converting enzyme. Science 1992;256:97-100.
89. Kidd VJ. Proteolytic activities mediate apoptosis. Annu Rev Physiol 1998;60:533-73.
90. Cryns VL, Yuan J. Proteases to die for. Genes Dev 1998;12:1551-1570.
91. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. Science 1998;281:312-316.
92. BUTT AJ, Harvey NL, Parasivam G, Kumar S. Dimerization and autoprocessing of the Nadd2 (caspase-2) precursor requires both the prodomain and the carboxyl-terminal regions. J Biol Chem 1998;273:6763-6768.
93. Fraser A, Evan G. A licence to kill. Cell 1996;85:781-784.
94. Keller JN, Kindy MS, Holtsberg FW, St. Clair DK, Yen HC, Germeyer A, Steiner SM, Bruce-Keller AJ, Hutchins JB, Mattson MP. Mitochondrial manganese superoxide dismutase prevents neural apoptosis and reduces ischemic brain injury, suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction. J Neurosci 1998;18:687-697.
95. Huang B, Eberstadt M, Olejniczak ET, Meadows RP, Fesik SW. NMR Structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) Death domain. Nature 1996;384:638-641.
96. Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH, Peter ME. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). EMBO J 1997;16:2794-2804.

97. Hakem R, Hakem A, Duncan G, Henderson JT, Woo M, Soengas MS, Elía A, de la Pompa JL, Kagi D, Khoo W. Differential requirements for caspase9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell* 1998;94:339-352.
98. Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS, Dixit VM. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* 1998;273:29262930.
99. Debatin KM, Kramer PH, Peter ME. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 1998;17:1674-1687.
100. Stennicke RH, Jurgensmeier JM, Shin H, Deveraux Q, Wolf BB, Yang X, Zhou Q, Eyerbe LM, Bredesen D. Pro-caspase-3 in a major physiologic target of caspase-8. *J Biol Chem* 1998;273:27084-27090.
101. Li H, Shu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998;94:491-501.
102. Porter AG. Protein translocation in apoptosis. *Trends Cell Biol* 1999;9:394401.
103. Yoshida H, Kong YY, Yoshida R, Elia AJ, Hakem A, Hakem R, Penninger JM, Mak TW. Apaf-1 is required for mitochondrial Pathway of apoptosis and brain development. *Cell* 1998;94:739-750.
104. Yang J, Liu X, Bhalla K. Prevention of apoptosis by bcl-2: release of cytochrome c mitochondria blocked. *Science* 1997;275:1129-1132.
105. Kaighn, M.E.; K.S. Narayan; Y. Ohnuki; J. F. Lechner; L.W. Jones (17 Jul 1979). "Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3)."
106. Johnston ST, Shah ET, Chopin LK, McElwain DS, Simpson MJ (June 2015). "Estimating cell diffusivity and cell proliferation rate by interpreting IncuCyte ZOOM assay data using the Fisher-Kolmogorov model". *BMC Sys. Biol.* 9 (38).
107. Atcc.org [Internet]. PC-3 (ATCC® CRL-1435™); 2017 [citado 15 ene 2017]. Disponible en: <https://www.atcc.org/Products/All/CRL-1435.aspx#characteristics>.
108. Ghosh, Arundhati; Xinning Wang; Eric Klein; Warren D.W. Heston (1 Feb 2005). "Novel role of prostate-specific membrane antigen in suppressing prostate cancer invasiveness." *Cancer Research.* 65 (3): 727–31.

109. Alimirah F, Chen J, Basrawala Z, Xin H, Choubey D (April 2006). "PC-3 cell line expresses androgen receptor: implications for the androgen receptor functions and regulation". *FEBS Lett.* 580 (9): 2294–300.
110. Cellsystems.de [Internet]. Normal Human Prostate Epithelial Cells, HprEC; 2017 [citado 15 ene 2017]. Disponible en: <http://cellsystems.de/cells-and-media/c/normal-human-prostate-epithelial-cells-hprec>.
111. Atcc.org [Internet]. PRIMARY PROSTATE EPITHELIAL CELLS; NORMAL, HUMAN (ATCC® PCS-440-010™); 2017 [citado 15 ene 2017]. Disponible en: <https://www.atcc.org/Products/All/PCS-440-010.aspx#generalinformation>.
112. Plumb J, Milroy R, Kaye S. 1989. Effects of the pH dependence of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. *Cancer Res.* 1989; 49(16): 4435-4440.
113. Abcam.com [Internet]. Colombia: MTS Cell Proliferation Assay Kit (Colorimetric); 2017 [citado 17 ene 2017]. Disponible en: <http://www.abcam.com/mts-cell-proliferation-assay-kit-colorimetric-ab197010.html>.
114. Towbin, H. et. al. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76(9):4350-4.
115. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979). «Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.».*Proc Natl Acad Sci U S A.* 76 (9): 4350-4354.
116. Innoprot.com [Internet]. Kit de Determinación de Actividad Caspasa-3; 2017 [citado 17 ene 2017]. Disponible en: http://www.innoprot.com/es_productos.asp?idsf=28&id=13&idp=164
117. Mishra, S., Ahmad, S., Kumar, N., Sharma, B.K., 2013. *Annona muricata* (The cancer killer): a review. *The Global Journal of Pharmaceutical Research* 2, 1613-1618.
118. Moghadamtousi S.Z., Karimian H., Rouhollahi E., Paydar M., Kadir H.A., Fadaeinasab M., etal. *Annona muricata* leaves induce G1 cell cycle arrest and

- apoptosis through mitochondria-mediated pathway in Human HCT-116 and HT-29 colon Cancer cells. *J Ethnopharmacol.* 2014; 156:277–289.doi:10.1016/j.jep.2014.08.011PMID:25195082.
119. Moghadamtousi S.Z., Kadir H.A., Paydar M., Rouhollahi E., Karimian H. *Annona muricata* leaves induced apoptosis in A549 cells through mitochondrial-mediated pathway and involvement of NF-kappaB. *BMC Complem Altern M.* 2014; 14:299.
120. Cory, S., Adams, J.M., 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer* 2, 647-656.
121. Liu, F.-T., Newland, A.C., Jia, L., 2003. Bax conformational change is a crucial step for PUMA-mediated apoptosis in human leukemia. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 310, 956-962.
122. Martinou, J.-C., Youle, R.J., 2011. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Developmental Cell* 21, 92-101.
123. Reap EA, Felix NJ, Wolthusen PA, Kotzin BL, Cohen PL, Eisenberg RA. Bcl-2 transgenic Lpr mice show profound enhancement of lymphadenopathy. *J Immunol* 1995;155(11):5455-62.
124. Munn DH, Pressey J, Beall AC, Hudes R, Alderson MR. Selective activation induced apoptosis of peripheral T cells imposed by macrophages. *J. Immunol.* 1995;156(2):515-22.
125. Binder C, Marx D, Overhoff R, Binder L, Schauer A, Hiddemann W. Bcl-2 protein expression in breast cancer in relation to established prognostic factors and other clinicopathological variables. *Annals of Oncology* 1995;6:1005-10.
126. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog. Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993;74:609-19.
127. Osborne BA, Schwartz LM. Essential genes that regulate apoptosis. *Trends in Cell. Biol.* 1994;4:394-99.
128. Cory S. Regulation of lymphocyte survival by the Bcl-2 gene family. *Ann Rev, Immunol* 1995;13:513-43.
129. Boise LH, Gottschalk AR, Quintns J, Thompson CB. Bcl-2 and Bcl-2-related proteins in apoptosis regulation. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995;200:107-21.

130. Núñez G, Clarke MF. The Bcl-2 family of proteins: Regulators of cell death and survival. *Trends in Cell Biol* 1994;4:399-03.
131. Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol. Today* 1993;14(3):126-30.
132. Meyn RE, Stephens LC, Mason KA, Medina D. Radiation-induced apoptosis in normal and premoplastic mammary glands in vivo: significance of gland differentiation and P53 status. *Int J Cancer* 1996;66:466-72.
133. Tanaka H, Shilbagaki I, Shimada Y, Wagata T, Imamura M, Ishizaki K. Characterization of p53 gene mutations in esophageal squamous cell carcinoma cell lines: Increased frequency and different spectrum of mutations from primary tumors. *Int J. Cancer* 1996;65:372-76.
134. Ashwell JD, Berger NA, Cidlowski JA, Jane DP, Korsweyer SJ. Coming to terms with death: Apoptosis in cancer and immune development. *Today* 1994;15(4):147-51.
135. Scielo.isciii.es [Internet]. Expresión de bcl-2, ki-67 y caspasa-3 en lesiones cancerosas de la mucosa oral. 2017 [citado 20 abr 2017]. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-12852006000500002.
136. Loro L. y cols. Cell death regulation in oral squamous cell carcinoma: methodological considerations and clinical significance. *J Oral Pathol Med* 2003;32:125-38.
137. Tong D. y cols. 5-Fluorouracil-induced apoptosis in cultured oral cancer cells. *Oral Oncology* 2000;36: 236-41.
138. Chrysomali E. y cols. Immunohistochemical evaluation of cell proliferation antigen Ki-67 and apoptosis-related proteins Bcl-2 and caspase-3 in oral granular cell tumor. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 96:566-72.



ANEXOS

ANEXO 1

**ABSORBANCIAS OBTENIDAS A PARTIR DEL ENSAYO DE VIABILIDAD
CELULAR (MTS) SOBRE CÉLULAS PC-3 A LAS 24 HORAS.**

Blanco	Control	1 µg/mL	3 µg/mL	10 µg/mL	30 µg/mL	50 µg/mL
0.079	0.276	0.254	0.208	0.151	0.188	0.217
0.079	0.276	0.244	0.206	0.147	0.183	0.219
0.079	0.253	0.238	0.207	0.152	0.190	0.217
0.082	0.254	0.246	0.227	0.176	0.183	0.213
0.082	0.256	0.251	0.201	0.175	0.199	0.217
0.084	0.272	0.249	0.221	0.154	0.188	0.227
0.079	0.258	0.248	0.236	0.152	0.196	0.238
0.079	0.257	0.276	0.232	0.148	0.195	0.220
0.079	0.279	0.277	0.227	0.146	0.195	0.236

Fuente: Elaboración Propia

Control	1 µg/mL	3 µg/mL	10	30	50
----------------	----------------	----------------	-----------	-----------	-----------

				$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$
Promedio	0.184	0.173	0.138	0.075	0.111	0.142
% Células viables	100%	94%	75%	41%	60%	77%
SD	0.06	0.07	0.07	0.06	0.03	0.05
SEM	0.020	0.025	0.023	0.021	0.010	0.016

Fuente: Elaboración Propia

ANEXO 2

ABSORBANCIAS OBTENIDAS A PARTIR DEL ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR (MTS) SOBRE CÉLULAS PC-3 A LAS 48 HORAS.

Blanco	Control	1 $\mu\text{g/mL}$	3 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	30 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$
0.078	0.229	0.216	0.189	0.137	0.174	0.204
0.077	0.259	0.262	0.195	0.138	0.172	0.207
0.076	0.225	0.223	0.166	0.135	0.170	0.197
0.079	0.243	0.235	0.166	0.139	0.173	0.204
0.077	0.229	0.224	0.158	0.136	0.175	0.207
0.076	0.248	0.251	0.176	0.138	0.175	0.205
0.079	0.229	0.227	0.169	0.140	0.179	0.215
0.077	0.251	0.247	0.195	0.141	0.178	0.217
0.078	0.260	0.231	0.196	0.140	0.179	0.215

Fuente: Elaboración Propia

Control	1 $\mu\text{g/mL}$	3 $\mu\text{g/mL}$	10	30	50
----------------	--------------------------------------	--------------------------------------	-----------	-----------	-----------

				$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$
Promedio	0.164	0.158	0.101	0.061	0.098	0.130
% Células viables	100%	96%	62%	37%	59%	80%
DS	0.08	0.09	0.09	0.01	0.02	0.04
SEM	0.028	0.031	0.030	0.004	0.006	0.013

Fuente: Elaboración Propia

ANEXO 3

ABSORBANCIAS OBTENIDAS A PARTIR DEL ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR (MTS) SOBRE CÉLULAS PC-3 A LAS 72 HORAS.

Blanco	Control	1 $\mu\text{g/mL}$	3 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	30 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$
0.080	0.264	0.260	0.220	0.136	0.165	0.199
0.080	0.270	0.253	0.235	0.134	0.168	0.200
0.080	0.281	0.266	0.202	0.131	0.171	0.197
0.079	0.277	0.236	0.203	0.135	0.173	0.198
0.078	0.259	0.267	0.211	0.135	0.171	0.198
0.080	0.268	0.246	0.214	0.132	0.173	0.206
0.081	0.249	0.242	0.219	0.136	0.170	0.204
0.079	0.234	0.224	0.217	0.136	0.174	0.205
0.078	0.238	0.234	0.218	0.133	0.171	0.208

Fuente: Elaboración Propia

Control	1 $\mu\text{g/mL}$	3 $\mu\text{g/mL}$	10	30	50
----------------	--------------------------------------	--------------------------------------	-----------	-----------	-----------

				$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$
Promedio	0.181	0.168	0.136	0.055	0.091	0.122
% Células viables	100%	93%	75%	30%	51%	68%
DS	0.09	0.08	0.05	0.01	0.02	0.02
SEM	0.031	0.028	0.018	0.003	0.005	0.008

Fuente: Elaboración Propia

ANEXO 4

ABSORBANCIAS OBTENIDAS A PARTIR DEL ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR (MTS) SOBRE CÉLULAS HPrEC A LAS 24 HORAS.

Blanco	Control	1 $\mu\text{g/mL}$	3 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	30 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$
0.196	0.448	0.409	0.280	0.256	0.272	0.319
0.189	0.501	0.441	0.299	0.253	0.264	0.318
0.186	0.510	0.442	0.307	0.260	0.267	0.318
0.189	0.474	0.438	0.302	0.257	0.275	0.323
0.188	0.447	0.442	0.277	0.249	0.269	0.337
0.196	0.446	0.433	0.288	0.249	0.262	0.311
0.189	0.468	0.434	0.312	0.249	0.259	0.308
0.186	0.549	0.430	0.297	0.248	0.261	0.319
0.189	0.511	0.459	0.295	0.246	0.258	0.310

Fuente: Elaboración Propia

Control	1 $\mu\text{g/mL}$	3 $\mu\text{g/mL}$	10	30	50
---------	--------------------	--------------------	----	----	----

				µg/mL	µg/mL	µg/mL
Promedio	0.283	0.247	0.105	0.062	0.075	0.128
% Células viables	100%	87%	37%	22%	27%	45%
DS	0.01	0.05	0.04	0.02	0.02	0.03
SEM	0.033	1.56	0.014	0.006	0.007	0.010

Fuente: Elaboración Propia

ANEXO 5

ABSORBANCIAS OBTENIDAS A PARTIR DEL ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR (MTS) SOBRE CÉLULAS HPrEC A LAS 48 HORAS.

Blanco	Control	1 µg/mL	3 µg/mL	10 µg/mL	30 µg/mL	50 µg/mL
0.184	0.552	0.495	0.248	0.253	0.265	0.310
0.183	0.648	0.519	0.248	0.249	0.263	0.311
0.186	0.611	0.488	0.251	0.251	0.264	0.311
0.188	0.598	0.538	0.291	0.255	0.261	0.312
0.189	0.577	0.471	0.262	0.261	0.277	0.322
0.189	0.595	0.439	0.261	0.250	0.261	0.327
0.187	0.589	0.430	0.251	0.257	0.266	0.323
0.189	0.650	0.459	0.245	0.252	0.257	0.321
0.186	0.598	0.470	0.247	0.250	0.261	0.327

Fuente: Elaboración Propia

Control	1 µg/mL	3 µg/mL	10	30	50
---------	---------	---------	----	----	----

				$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$
Promedio	0.415	0.292	0.069	0.066	0.077	0.131
% Células viables	100%	70%	17%	16%	19%	32%
DS	0.08	0.08	0.03	0.01	0.01	0.02
SEM	0.025	0.028	0.012	0.003	0.004	0.006

Fuente: Elaboración Propia

ANEXO 6

ABSORBANCIAS OBTENIDAS A PARTIR DEL ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR (MTS) SOBRE CÉLULAS HPrEC A LAS 72 HORAS.

Blanco	Control	1 $\mu\text{g/mL}$	3 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	30 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$
0.183	1.532	0.705	0.514	0.254	0.243	0.288
0.182	1.393	0.741	0.416	0.245	0.251	0.288
0.183	1.379	0.743	0.515	0.245	0.249	0.290
0.192	1.381	0.815	0.459	0.247	0.249	0.307
0.185	1.540	0.784	0.546	0.257	0.272	0.334
0.183	1.300	0.907	0.598	0.256	0.266	0.327
0.183	1.513	0.845	0.470	0.260	0.267	0.324
0.182	1.389	0.962	0.493	0.248	0.254	0.299
0.183	1.518	0.971	0.496	0.241	0.247	0.305

Fuente: Elaboración Propia

Control	1 $\mu\text{g/mL}$	3 $\mu\text{g/mL}$	10	30	50
---------	--------------------	--------------------	----	----	----

				$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$
Promedio	1.254	0.646	0.317	0.066	0.074	0.123
% Células viables	100%	52%	25%	5%	6%	10%
DS	0.07	0.08	0.04	0.01	0.01	0.01
SEM	0.023	0.026	0.014	0.002	0.003	0.005

Fuente: Elaboración Propia

