

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímica y
Biotecnológicas

Escuela de Farmacia y Bioquímica



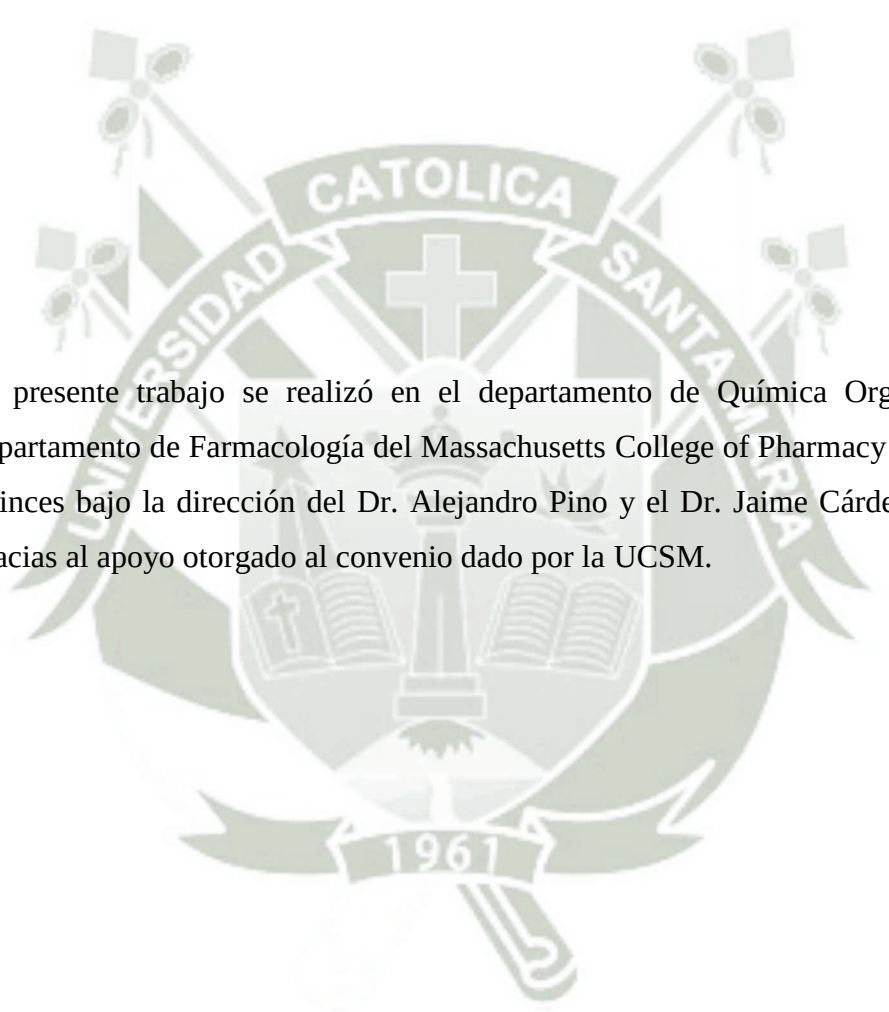
“EXTRACCION DE ACETOGENINAS DE LAS HOJAS DE *Annona muricata* Y SU EFECTO APOPTOTICO EN CELULAS DE CANCER DE PROSTATA HUMANO PC-3”

Tesis presentada por el bachiller:
EDWIN STEVEN BEDREGAL VERA

Para optar el título profesional de:
QUIMICO FARMACEUTICO

ASESORES:
Dr. Jaime Cárdenas García
Dr. José Carpio Carpio

Arequipa-Perú
2017



El presente trabajo se realizó en el departamento de Química Orgánica y el departamento de Farmacología del Massachusetts College of Pharmacy and Health Sciences bajo la dirección del Dr. Alejandro Pino y el Dr. Jaime Cárdenas García gracias al apoyo otorgado al convenio dado por la UCSM.

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	8
RESUMEN.....	10
ABSTRACT	12
INTRODUCCION	14
1. OBJETIVOS	18
1.1 Objetivo Principal.....	18
1.2 Objetivos Específicos	18
2. HIPÓTESIS.....	18
CAPÍTULO I.....	19
MARCO TEÓRICO	19
1.1 Familia <i>Annonaceae</i>	19
1.2 <i>Annona muricata</i>	20
1.3 Estudio fitoquímico de <i>Annona muricata</i>	21
1.4 Métodos de obtención de extractos	22
1.5 Cultivo Celular.....	22
1.5.1 Tipos de cultivo celular.....	22
1.5.2 Medios de cultivo.....	23
1.6 Acetogeninas o (ACG).....	25
1.6.1 Características estructurales	25
1.6.2 Mecanismo de acción de las ACG sobre el sistema celular.....	26
1.6.3 Relación estructura-actividad	28
1.7 Actividades biológicas reportadas	29
1.7.1 Actividad citotóxica.....	29
1.8 Cáncer.....	30

1.8.1 Etapas del cáncer.....	32
1.8.2 Cáncer de próstata.....	33
1.9 Citotoxicidad.....	34
1.10 Apoptosis.....	35
1.10.1 Proteínas implicadas en la regulación de la apoptosis	39
CAPITULO II.....	40
MATERIALES Y METODOS	40
2.1 Instrumentos, materiales, reactivos y equipos	40
2.2 METODOLOGIA	42
2.2.1 Extracción de ACG a partir de las hojas de <i>Annona muricata</i>	42
2.2.2 Obtención de los extractos crudos	43
2.3 Separación cromatográfica mediante cromatografía en columna guiada por MTS.	43
2.4 Divisiones de la columna cromatográfica guiada por viabilidad celular de las células PC-3.....	44
2.5 Fraccionamiento por TLC preparativa	46
2.6 Caracterización de la ACG.	46
2.7 Cultivo de células y evaluación de la citotoxicidad	47
2.8 Obtención de células de cáncer de próstata	47
2.9 Estabilización de cultivo (“in vitro”).....	48
2.10Evaluación de la citotoxicidad por el método MTS.	48
2.10.1 Metodología para la evaluación de la citotoxicidad.....	49
2.11Medición de las caspasas efectoras -3/7.....	50
2.11.1 Concentraciones y Tiempos utilizados para la evaluación de la citotoxicidad.....	51
2.12Análisis estadísticos	51

CAPÍTULO III.....	52
RESULTADOS Y DISCUSION	52
3. Aislamiento, purificación y elucidación estructural de ACG a partir de las hojas de <i>Annona muricata</i>	52
3.1 Obtención de los extractos crudos.....	52
3.2 Separación cromatográfica mediante cromatografía en columna guiada por MTS.	54
3.2.1 Fraccionamiento del extracto de Metanol por medio de la Cromatografía en columna usando resina AMBERLITE XAD – 2.	54
3.2.2 Purificación de ACG mediante cromatografía en columna y diferenciación de las 39 fracciones luego obtenidas.....	54
3.3 Proceso de fraccionamiento guiado por viabilidad celular MTS.....	57
3.3.1 Evaluación de la viabilidad celular de las células PC-3 sobre todos los extractos obtenidos.....	57
3.4 Separación de las fracciones más activas por medio de una TLC preparativa.....	59
3.4.1 Evaluación de la viabilidad celular de las células PC-3 sobre las bandas obtenida de la TLC preparativa.	59
3.5 Propuestas estructurales de las ACG aisladas de <i>Annona muricata</i>	60
3.5.1 Análisis de los espectros de RMN ¹ H y de ¹³ C y discusión en el uso de criterios de desplazamiento químico para la asignación de configuración relativa.	60
3.6 Medición de la actividad de las caspasas efectoras -3/7.....	67
CAPITULO IV.....	70
CONCLUSIONES	70
REFERENCIAS.....	71

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. 1 Distribución geográfica de la familia <i>Annonaceae</i>	19
Figura 1. 2. <i>Annona muricata</i>	20
Figura 1.3: Estructura general de las ACG.	25
Figura 2.1: Proceso de extracción por columna de fraccionamiento	44
Figura 3.1: Primer proceso de fraccionamiento guiado por MTS.....	53
Figura 3.2: Cromatografía en columna de fraccionamiento.....	55
Figura 3.3: Placas de TLC resultantes del extracto separado luego de la columna de fraccionamiento	56
Figura 3. 4: Placas TLC Amberlite XAD-2 por medio de radiación UV.	56
Figura 3. 5: Placas de TLC bajo radiación UV.	56
Figura 3.6: Segundo fraccionamiento de las 36 fracciones agrupadas guiadas por MTS.....	58
Figura 3.7: Bandas presentes en la TLC preparativa.	59
Figura 3.8: Tercer fraccionamiento de las bandas de la TLC preparativa guiadas por MTS.....	60
Figura 3. 9: Espectro de RMN 1H de la ACG aislada de <i>Annona muricata</i>	64
Figura 3.10: Ubicación de los H y C y su similitud con el compuesto Rolledecin C ¹⁵	65
Figura 3.11: ACG encontrada.	66
Figura 3.12. “Rolledecin C” encontrada por Zhen-Ming Gu, 1997 ¹⁵	66
Figura 3. 13: Localización de Carbonos según el espectro de RMN	66
Figura 3. 14: Localización de Hidrógenos según el espectro de RMN.....	67
Figura 3.15. Diferencia de “FOLD CHANGE” mayor que el grupo control	68

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1:	Compuestos aislados de <i>Annona muricata</i>	21
Tabla 1.2:.	ACG tetrahidroxiladas C35 obtenidas de diversas fuentes.23-29	26
Tabla 1.3:	Concentración necesaria para inhibir el 50% del crecimiento celular (IG50)	30
Tabla 1.4:	Principales causas de mortalidad.....	31
Tabla 3.1:	Fracciones obtenidas a partir de la primera separación cromatografica	55



LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

- **FBS:** Suero Bovino Fetal
- **AIF:** Factor inductor de apoptosis
- **Akt:** Proteína Quinasa B ANDEVA: Análisis de varianzas
- **BSA:** Albúmina de Suero Bovino
- **CMF:** Calcium Magnesium Free (Buffer libre de Calcio y Magnesio)
- **CRM:** Cadena respiratoria mitocondrial
- **Erk:** Quinasa MAPK/Erk
- **F.C.:** Factor de calibración
- **H₂O:** Agua
- **H₂O₂:** Peróxido de Hidrogeno
- **IC₅₀:** Concentración inhibitoria 50
- **LTP:** Potenciación de larga duración
- **SNC:** Sistema Nervioso central
- **MNDA:** N-Metil D-aspartato
- **Mek:** Quinasa regulada por señales extracelulares
- **mg.:** Miligramo
- **mL:** Mililitro
- **mM:** Milíolar
- **MTS:** 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromo tetrazole
- **NBT:** Nitroblue tetrazolium
- **Nm:** Nanometros
- **PI3K:** Fosfoinositol 3-quinasas fosfoinositol 3-quinasas
- **PTEN:** Fosfatasa de las familia de las Tensinas
- **PVDF:** Difloruro de polivniilo
- **RNS:** Especies Reactivas de Nitrógeno
- **ROS:** Especies Reactivas de Oxígeno
- **SDS:** Sulfato dodecil de sódio
- **SOD:** Súper Oxido Dismutasa (enzima)
- **TEMED:** N*, N*, N*, N*. tetrametil etilendiamina

- **U.I./L:** Unidades Internacionales sobre Litro
- **μ L:** Microlitros
- **μ M:** Micromolar
- **DESV. ST:** Desviación Estándar
- **PROM:** Promedio



RESUMEN

Se utilizaron hojas de guanábana (*Annona muricata*) obtenidas por medio de una empresa distribuidora la cual tenía las siguientes características: Hojas tomadas de huertos establecidos en la zona agroindustrial del Valle del Cauca, (Colombia), sector rural del municipio de Pradera, Agrícola Varahonda, Finca la Española, localizada a 1070 msnm. A 23°C de temperatura promedio, 1225 mm de precipitación promedio anual, y humedad relativa promedio de 83%. Las hojas fueron colectadas en igual grado de madurez, correspondiente a 16 semanas luego de la formación del “erizo” y el mismo día transportadas en contenedores de poliestireno expandido (tecnopor), hasta los laboratorios del MCPHS University llegando el material vegetal vía aérea.

Para poder evaluar la actividad citotóxica de los extractos obtenidos a partir de la planta, se cultivaron células de cáncer de próstata PC-3 en medio F-12K (suplementado con 10% de FBS y 1% de penicilina y estreptomycin) incubándose a 37 ° C con 5% de CO₂. Para la interpretación de los resultados el control negativo para todos los ensayos fue representado por medio F-12K no tratado que contenía DMSO al 0,1% como vehículo.

La respuesta de las células a los extractos se midió por medio de ensayos de viabilidad celular (MTS), en los cuales se evaluó que tan dañinos resultaban ser los extractos a las células PC-3.

Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones, y diluidas en agua ultra pura. Se sembraron concentraciones de 2×10^4 de células en placas de 96 pocillos y se dejaron incubar durante 24 horas con medio F-12K.

Luego de procesos de extracción cromatografica realizada por medio de columnas de fraccionamiento, TLC y TLC preparativa se identificó una acetogenina (ACG), para dilucidar su estructura química se usó resonancia magnética nuclear (RMN) además, ensayos de luminiscencia también fueron realizados para determinar la actividad de las Caspasas efectoras -3//7 en las células luego de varias horas de tratamiento con el

extracto de *Annona muricata* con el objetivo de determinar indicios de apoptosis en las células.

Los ensayos de MTS revelaron una citotoxicidad que causó una disminución de más del 80% de células PC-3 a una concentración de 30 µg/mL luego de 24 horas, el tratamiento con la fracción 1 de la TLC preparativa demostró una disminución del 90% de células cancerosas a una concentración de 10 µg/mL luego de el mismo periodo de tiempo.

La actividad de las caspasas -3/7 aumentó dos veces más que el grupo control al momento de usar el extracto a una concentración de 10 µg/mL a las 12 horas del tratamiento a su vez, los picos encontrados en los ensayos de Resonancia magnética nuclear son similares a la ACG llamada “Rolledecin C” hallada por Zheng-Ming Gu et al, confirmando la presencia de una ACG¹⁰.

Nuestros estudios han mostrado una extracción exitosa de ACG de *Annona muricata* la cual ha mostrado indicios de inhibir la proliferación de células de cáncer PC-3.

Luego del tratamiento que se realizó a las Caspasas -3/7 se presentó un aumento de su actividad, lo que es indicio de una muerte celular programada y de una activación de la vía mitocondrial de muerte celular.

Palabras clave: *Annona muricata*, Medio F-12K, Cáncer de próstata, MTS, Apoptosis, Caspasas, Resonancia Magnética Nuclear.



ABSTRACT

Leaves of guanabana (*Annona muricata*) obtained through a distribution company were used: Leaves taken from orchards established in the agroindustrial zone of Valle del Cauca, Colombia, rural sector of the municipality of Pradera, Agricultural Varahonda, Finca la Española, located at 1070 masl. At 23 ° C average temperature, 1225 mm average annual precipitation, and average relative humidity 83%. The leaves were collected in the same degree of maturity, corresponding to 16 weeks after the formation of the "hedgehog" and the same day transported in containers of expanded polystyrene (technopor), to the laboratories of MCPHS University arriving the vegetal material by air.

In order to evaluate the cytotoxic activity of extracts obtained from the plant, PC-3 prostate cancer cells were cultured in F-12K medium (supplemented with 10% FBS and 1% penicillin and streptomycin) by incubating at 37 ° C with 5% CO₂. For the interpretation of the results the negative control for all assays was represented by untreated F-12K medium containing 0.1% DMSO as vehicle. Cell responses to the extracts were measured by cell viability assays (MTS), in which the extracts were found to be deleterious to PC-3 cells. Cells were treated with different concentrations, and diluted in water. Concentrations of 2×10^4 cells were seeded in 96-well plates and allowed to incubate for 24 hours with F-12K medium.

Chromatographic extraction was carried out by means of fractionation columns, TLC and preparative TLC, and an acetogenin (ACG) was identified. In order to elucidate its chemical structure, nuclear magnetic resonance (NMR) was also used. Luminescence tests were also performed to determine the Activity of the effector Caspases -3 // 7 in the cells after several hours of treatment with the extract of *Annona muricata* with the aim of determining indications of apoptosis in the cells. MTS assays revealed a cytotoxicity that caused a decrease of more than 80% PC-3 cells at a concentration of 30 µg / mL after 24 hours, treatment with fraction 1 of the

preparative TLC demonstrated a 90% of cancer cells at a concentration of 10 μg / mL after the same time period.

The activity of caspases -3/7 increased twice more than the control group at the time of using the extract at a concentration of 10 μg / mL at 12 hours of treatment in turn, the peaks found in the Magnetic Resonance Nuclear are similar to the ACG called "Rolledecin C" found by Zheng-Ming Gu et al, confirming the presence of an ACG¹⁰.

Our studies have shown successful extraction of ACG from *Annona muricata* which has shown evidence of inhibiting the proliferation of PC-3 cancer cells. After treatment with Caspase-3/7, an increase in its activity occurred, indicating a programmed cell death and an activation of the mitochondrial cell death pathway.

Keywords: *Annona muricata*, prostate cancer, MTS, Apoptosis, caspases, Nuclear Magnetic Resonance.



INTRODUCCION

El cáncer es una enfermedad que resulta del crecimiento sin control de células anormales que se originan en alguna parte del cuerpo y suelen vivir más tiempo que las células normales, pueden formar tumores, destruir las partes vecinas y diseminarse por el cuerpo¹.

El cáncer constituye una de las principales causas de muerte en el mundo. En los últimos años la carga de enfermedad por el cáncer se ha incrementado progresivamente con un mayor impacto en las poblaciones de menores recursos, en el Perú, ocurren anualmente alrededor de 42 mil nuevos casos de cáncer y fallecen aproximadamente 15 mil personas por esta enfermedad cada año¹. El 90% de los pacientes con cáncer que acuden al Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN), los cuales llegan en estados avanzados de la enfermedad, hecho que hace más difícil su tratamiento y pronóstico. El cáncer de Próstata es el más frecuente en varones y su tasa de incidencia estimada es de 18.9 por 100 mil hombres y la mortalidad asciende a 13.6 por 100 mil².

De acuerdo a la Vigilancia Epidemiológica de Cáncer, de un total de 109 914 casos notificados en el período 2009- 2015, los cánceres más frecuentes fueron los de cérvix (14.9%), estómago (11.1%), mama (10.3%), piel (6.6%) y próstata (5.8%). En niños (menores de 15 años) los cánceres más frecuentes fueron los del sistema hematopoyético y retículo endotelial (44.2%), encéfalo (8.0%), ojo y anexos (7.8%),

ganglios linfáticos (6.9%) y hueso, cartílago y articulaciones (5.2%). Para dicho período, el 5.6% de los casos de cáncer de cérvix notificados (922/16 374), el 0.4% de los cánceres de mama (49/11 340) y el 0.2% de los cánceres de próstata (15/6359) fueron diagnosticados mediante un programa de detección precoz (Estadística tomada del portal virtual del INEN).

La mayoría de los hombres con cáncer de próstata son mayores de 65 años y no se mueren por la enfermedad es importante detectar y tratar este mal antes de que se presenten los síntomas pueden no mejorar la salud o ayudarlo a vivir más tiempo.

A medida que surgen las cifras de nuevos casos, también lo hace la demanda de encontrar un mejor tratamiento para esta enfermedad. En lugar de la quimioterapia muchas personas han estado buscando otro tipo de tratamiento.

La *Annona muricata* es conocida fuera de América del Sur por tener una amplia gama de usos médicos, comúnmente conocida como graviola o guanábana, pertenece a la familia de las *Annonaceae* esta planta es un árbol tropical típico con frutas comestibles en forma de corazón y ampliamente distribuida en la mayoría de los países tropicales² sus son lanceoladas con el verde brillante y de color oscuro había sido utilizado tradicionalmente para tratar dolores de cabeza, hipertensión, la tos, el asma y se utiliza como antiespasmódico, es una fruta tropical exótica, altamente perecedera, con pérdidas alrededor de 30% en poscosecha⁴.

En la actualidad es ampliamente sabido que compuestos químicos aislados de fuentes naturales han representado una alternativa eficaz para tratar diversas enfermedades que afectan a los seres humanos tales como las enfermedades neoplásicas en nuestro país.

La persistencia y repunte de enfermedades malignas, así como el resurgimiento de aquellas causadas por gérmenes patógenos fármaco-resistentes, mantienen muy activas las investigaciones en todas las disciplinas que conducen a la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos de origen natural no farmacológico para su tratamiento eficiente.

Desde su descubrimiento ya años atrás, las ACG han sido objeto de intensos

estudios debido a sus variadas actividades biológicas, particularmente por su marcado efecto citotóxico *in vitro*, en la cuales se han cimentado muy buenas expectativas para el tratamiento de algunos tipos de cánceres y de enfermedades de origen parasitario. Por fortuna, la fuente natural de las ACG (Familia *Annonaceae*, particularmente el género *Annona* es muy extenso, por lo cual ofrece una ventana de posibilidades para poder seguir explorando sus propiedades biológicas y químicas.

En este sentido, se ha encontrado previamente, a través de un estudio tipo agudo realizado *in vivo*, una baja genotoxicidad y alta citotoxicidad de una mezcla de ACG aisladas de *Annona muricata*.

Estos resultados motivaron el desarrollo del presente trabajo, el cual consiste en realizar una búsqueda por medio de separación cromatografica e identificación fitoquímica de los agentes citotóxicos presentes y evaluarlos por medio del método de ensayo de viabilidad celular MTS y la evaluación de la actividad de las caspasas efectoras -3/7 para poder determinar si tienen efectos o no sobre células de cáncer de próstata PC-3.

Muchos compuestos químicos que se usan actualmente como medicamentos se obtienen de fuentes como las plantas y los hongos, algunos se han encontrado de manera azarosa y otros a partir de comunidades que los emplean tradicionalmente para aliviar ciertos padecimientos. Los estudios al azar suelen ser altamente costosos y poco efectivos; sin embargo, con mucha suerte se puede llegar a tener resultados tan exitosos como el descubrimiento del taxol, extraído del árbol *Taxus breviflora*, que desde 1994 se usa para el tratamiento de cáncer de pecho⁵ por citar algún ejemplo.

Tanto en los países desarrollados como en los que se encuentran en vías de desarrollo el uso de las plantas medicinales, o productos derivados de éstas, ha aumentado considerablemente, aunque las causas sean diferentes. Los primeros principalmente por tratarse de una moda, pero tanto en unos como en otros se ha presentado su uso en forma indiscriminada, lo que ha traído como consecuencia, un aumento en el interés científico y en la comprobación de las propiedades atribuidas a las plantas medicinales³.

Considerando la riqueza cultural y de recursos naturales que presenta nuestro país, el estudio de la flora y la comprobación de sus propiedades terapéuticas resulta relevante desde un punto de vista científico y cultural.

Por otro lado, la presencia de diversos padecimientos crónico-degenerativos como el cáncer, la diabetes, la hipertensión, entre otros ha motivado que los grupos de investigación vuelvan la mirada a los productos naturales, con la finalidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas³

El compuesto químico principal de la *Annona muricata* que causa estos efectos se llama acetogenina (ACG) de la cual se encontró que era un nuevo agente anti-tumoral prometedor contra el cáncer en numerosos estudios *in vitro*⁴, sin embargo, estos estudios sólo muestran cómo el extracto crudo contiene estas sustancias químicas antitumorales *in vitro*, y la pregunta continúa siendo si estas tienen o no citotoxicidad específica⁹ es por ello que en el siguiente trabajo se dispone a extraer y evaluar *in vitro* las acetogeninas contenidas en las hojas de *Annona muricata*.

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo Principal

Aislar las acetogeninas (ACG) responsables del efecto antitumoral de las hojas de la planta conocida como *Annona muricata* y probar su citotoxicidad en células de cáncer de próstata humano PC-3 además, estudiar su posible mecanismo de acción anti proliferativo.

1.2 Objetivos Específicos

- Aislar las ACG de la planta *Annona muricata*.
- Identificar los compuestos activos antitumorales ACG de la planta *Annona muricata*.
- Comprobar por medio de los ensayos de viabilidad celular (MTS) en células de cáncer que el compuesto aislado de *Annona muricata* tiene efecto supresor del crecimiento y proliferación celular en células de cáncer de próstata PC-3.
- Comprobar que la muerte celular causada por el extracto *Annona muricata* induce el camino de la apoptosis y no está llevando a estas a un proceso de necrosis celular.

2. HIPÓTESIS

“Sabido que los compuestos activos de las hojas de *Annona muricata* presentan efectos citotóxicos sobre diversas líneas celulares cancerosas previamente estudiadas, es probable que esta planta pueda inducir apoptosis en células de cáncer de próstata PC-3”.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Familia *Annonaceae*.

En general, la familia *Annonaceae* de la planta que estamos estudiando es de ubicación subtropical como se muestra en la imagen de la figura 1.1.

Esta contiene alrededor de 130 géneros con 2300 especies o más. Los usos más comunes para estas plantas van desde el cultivo para el consumo de sus frutos, la obtención de aceites para perfumería y el interés por las propiedades de dureza y elasticidad que presenta su madera, usada en la fabricación de tacos de billar y arpones².

Figura 1. 1 Distribución geográfica de la familia *Annonaceae*⁴.



Fuente: Plantas Medicinales de México II
Composición, uso y Actividad Biológica. Ed.
UNAM, México, D.F. 49-51.

En América Latina, la familia *Annonaceae* está integrada por 75 géneros y un poco más de 600 especies, pero solamente cuatro géneros contienen especies de importancia frutícola, éstos son: *Annona*, *Rollinia*, *Uvaria* y *Asimina*².

En el Perú existen alrededor de 16 especies de anonáceas con este interés, donde algunas especies de gran importancia al momento del comercio son

la guanábana (*Annona muricata*), la chirimoya (*A. Cherimola*) y el anono (*A. Reticulata*)⁴.

1.2 *Annona muricata*

Es una especie del género *Annona* de la familia del árbol de chirimoya es conocido sobre todo por su fruto comestible llamado graviola o guanábana.

Muchos compuestos activos y productos químicos han sido encontrados en el mismo, ya que numerosos científicos han estado estudiando sus propiedades desde la década de los años cuarenta. La mayor parte de la investigación sobre *Annona muricata* se centra en un nuevo conjunto de sustancias químicas llamadas acetogeninas annonaceous (ACG)⁵.

Figura 1. 2. *Annona muricata*



Dentro de la medicina tradicional las hojas se usan en infusión como antidiarreicas y como digestivas. Aplicadas localmente en forma de cataplasma, son antiinflamatorias e inclusive se han empleado en el caso de las paperas⁵.

Las flores son pectorales y febrífugas, por lo que se usan en tisana en casos de gripe y catarro bronquial. Poseen propiedades astringentes, colagogas (facilitan el vaciamiento de la vesícula biliar), digestivas, y también vermífugas. Se recomienda a los hipertensos, obesos, cardíacos, y diabéticos⁵. Tiene marcada importancia comercial especialmente para consumo interno, con una vida útil máxima luego de recolectada de 6 a 8 días, en condiciones ambientales normales (24°C y 65% de HR), susceptible

al daño por frío, de alto consumo interno y potencialmente comercializable para el exterior, por sus excelsas características sensoriales⁵

1.3 Estudio fitoquímico de *Annona muricata*.

Es una de las annonaceas más estudiadas, lo mismo que en el caso de *A. cherimolia*, se han aislado metabolitos como alcaloides, ácidos grasos, amidas y ACG tanto de corteza, como de la semilla, el tallo y las hojas. En la Tabla 1.1, se mencionan algunos de los compuestos aislados para esta especie.¹⁵⁻²⁵

Tabla 1. 1: Compuestos aislados de *Annona muricata*.

Nombre del compuesto	Tipo de compuesto	Fuente	Actividad	Referencia
			Biológica Reportada	
Cis-annonacina	Acetogenina	Semillas	Citotóxica	25
Annomuricin E	Acetogenina	Hoja	Citotóxica	16
Cohibina	Acetogenina	Semillas	Citotóxica	22
Acetogenina	Acetogenina	Semillas	-----	19
Ácido butanoico	Aceite	Semillas	-----	21
Javoricina	Acetogenina	Semillas	Citotóxica	25
Motecristin	Precursor de Acetogenina	Raíz		15
Cis-solamin	Acetogenina	Raíz	Citotóxica	17
Acetogenina	Acetogenina	Semilla	Citotóxica	20
Annopentocina	Acetogenina	Hojas	Citotóxica	18
Longicin	Acetogenina	Semillas	Citotóxica	23
Annomutacin	Acetogenina	Hoja	Citotóxica	24

Fuente: Isolation of Montecristin, a Key metabolite in Biogenesis of Acetogenins from *Annona muricata* and Its Structure elucidation by Using Tandem Mass Spectrometry. J. Org. Chem. 62: 510-513

1.4 Métodos de obtención de extractos

Maceración:

Este tipo de extracción se realiza temperatura ambiente, en el cual se remoja el material vegetal, ya fragmentada en un solvente que en este caso será el metanol, hasta que penetre y disuelva las porciones solubles. Se puede utilizar cualquier recipiente con tapa que no sea atacado con el disolvente; en éste se colocan el material vegetal con el disolvente y tapado se deja en reposo por un período de 2 a 14 días con agitación esporádica. Luego se filtra el líquido, se exprime el residuo, se recupera el solvente en un evaporador rotatorio y se obtiene el extracto.⁶

Percolación:

Es también denominado lixiviación, es uno de los métodos más difundidos y utilizados ya que se puede realizar con disolventes orgánicos en frío para preservar los compuestos termolábiles que pudiera contener el material. Este método consiste en colocar el material fragmentado en un embudo o recipiente cónico, y se hace pasar un disolvente adecuado por el mismo⁶

1.5 Cultivo Celular

Es conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células 'in vitro', manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Las células son capaces de dividirse, incrementar su tamaño y en condiciones adecuadas pueden replicarse hasta ser limitadas por algunas variables de cultivo como el consumo total de nutrientes o limitación del espacio físico.⁷

1.5.1 Tipos de cultivo celular

Una vez obtenido el órgano o tejido del organismo de origen se pueden obtener diferentes clases de cultivos, que se caracterizan por su capacidad de replicación y por su capacidad de ser cultivados. Entre los cultivos que se pueden generar tenemos⁷:

Cultivo primario

Son preparados directamente de un tejido u órgano; consisten en una mezcla de células por lo general del riñón, pulmón o piel, obtenidas por disociación de las células de trozos de órgano. Una vez que se subcultivan repetidas veces in vitro, los cultivos primarios se transforman en líneas celulares. En estos cultivos las células están vivas, conservan sus características originales y su proliferación es limitada⁷.

1.5.2 Medios de cultivo

Los medios de cultivo están constituidos por una solución salina balanceada, suplementada con factores implicados en el metabolismo celular tales como carbohidratos, aminoácidos, vitaminas, SFB o Líquido amniótico y otros suplementos como lacto-albumina hidrolizada, extractos embrionarios o de levaduras y hormonas entre otras⁸.

A. Clasificación de los medios de cultivo

Los medios de cultivos de acuerdo a su composición se clasifica en:

a) Medio esencial mínimo:

Como su nombre lo indica contiene los requerimientos mínimos de un medio. Está compuesto de SSB, aminoácidos esenciales y vitaminas; a partir de estos se separan los otros tipos de medios⁸.

b) Medios de crecimiento: es F-12K con 10 a 15% de FBS. Se emplea para iniciar los cultivos debido a su capacidad de inducción de una rápida multiplicación celular⁸.

- c) Medios de Mantenimiento: se usan para mantener las células vivas pero en baja actividad metabólica, atrasando la degeneración celular y aumentando el intervalo en los subcultivos. Es el mismo F-12K pero con suplemento con 1% de FBS⁸.
- d) Medios Selectivos: utilizados para favorecer el crecimiento de un tipo de células en particular. Para su uso se deben tener en cuenta dos factores. Primero, el tipo de Células, su origen y adaptación previa; segunda, la naturaleza o propósito del cultivo, tiempo de supervivencia, crecimiento y utilización⁷.

B. Líneas celulares

Son células derivadas de un cultivo primario, las cuales pueden subcultivarse in vitro repetidamente⁸. Pueden subdividirse en:

- a) Diploides: se originan de un tejido normal y continúan normales a medida que se cultivan⁸.
- b) Heteroploides o continuas: se originan de un tejido normal o anormal, pero se considera que estas células han sufrido una transformación que le confiere características de crecimiento diferentes⁸.

C. Línea celular de cáncer de Próstata PC-3

La línea celular de cáncer de próstata (PC-3) fue creada en 1972 a través de remoción y cultivo de un tumor canceroso proveniente de un hombre caucásico en estado 3 de la enfermedad¹¹.

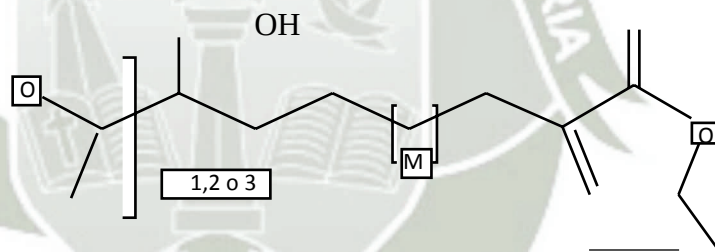
Las células PC-3, poseen una naturaleza escamosa; In vitro estas células cancerígenas crecen adherentemente como una mono capa e in vivo pueden inducir tumores.¹¹

1.6 Acetogeninas o (ACG)

1.6.1 Características estructurales

Estructuralmente, las ACG son productos naturales de 35 o 37 carbonos derivados de ácidos grasos de 32 a 34 carbonos enlazados a una unidad de 2-propanol. Usualmente, se caracterizan por una larga cadena alifática unida en la parte terminal a un anillo de una γ -metil- γ -lactona- α,β -insaturada, uno, dos o tres anillos de tetrahydrofurano (THF) y algunos sustituyentes oxigenados a lo largo de la cadena, particularmente alfa a un tetrahydrofurano, y en algunos casos puede contener dobles enlaces o epóxidos como se aprecia en la figura 1.3¹⁵.

Figura 1.3: Estructura general de las ACG.



Fuente: Cytotoxic Monotetrahydrofuran Annonaceous Acetogenins from *Annona muricata*. Chih-Chuang Liaw (2002).

En el caso de ACG con fórmula mínima $C_{35}H_{64}O_7$ se tienen reportes de diversas fuentes, donde la variación no solamente es la posición de los sustituyentes hidroxilo a lo largo de la cadena, sino también de la estereoquímica que presentan¹⁵. En la Tabla 1.2 se presentan compuestos reportados con dicha fórmula mínima.

Tabla 1.2: ACG tetrahidroxiladas C35 obtenidas de diversas fuentes.23-29

Acetogenina	Fuente	M	N	O	Referencia
Longicin	<i>Asimina longifolia</i> Hojas	9	2	4	23
Annomutacin	<i>Annona muricata</i> Hojas	5	6	4	24
cis-annonacin	<i>Annona muricata</i> semillas	7	4	4	25
Arianacin	<i>Annona muricata</i> semillas	7	2	6	25
Javoricin	<i>Annona muricata</i> semillas	7	2	6	25
Glacins A	<i>Annona glabra</i> corteza	5	4	6	26
Glacins B	<i>Annona glabra</i> corteza	7	2	6	26
Rolliacocin	<i>Rollinia mucosa</i> Baill Fruto	7	3	5	27
Annonacin	<i>Annona densicoma</i> corteza	7	4	4	28
Asitrocín	<i>Asimina triloba</i> semillas	7	2	6	29

Fuente: Five Novel Mono-tetrahydrofuran Ring Acetogenins from the Seeds of *Annona muricata*. J. Nat. Prod. 59: 100-108

1.6.2 Mecanismo de acción de las ACG sobre el sistema celular.

Las ACG tienen la característica de bloquear la respiración mitocondrial, al inhibir la NADH ubiquinona reductasa (Complejo I), una enzima unida a la membrana y esencial para la producción de ATP. Al interferir en la producción de ATP se produce una disminución en la concentración de esta molécula en el interior celular y en consecuencia se promueve la muerte; por lo anterior, las ACG intervienen en el punto terminal de la cadena de transferencia de electrones del Complejo I de forma similar a los inhibidores ordinarios de la cadena respiratoria, aunque existen pocas similitudes estructurales entre las ACG y los inhibidores convencionales, como la rotenona³⁰⁻³².

Recientemente, se ha demostrado que las ACG también inhiben la actividad de la NADH oxidasa presente en la membrana plasmática. Este segundo modo de acción produce una disminución del nivel intracelular de ATP, bloqueando la regeneración del NAD e inhibiendo la fosforilación glicolítica en el citosol; la

combinación de los dos modos de acción promueven el proceso de apoptosis y explican la potencia de este tipo de compuestos.^{33, 34}

En estudios realizados in vitro se ha observado que las ACG presentan selectividad contra las células tumorales, que puede ser explicada por la elevada actividad de la NADH oxidasa que es peculiar en estos tipos celulares, así como por un incremento en la demanda de ATP que es inherente a su crecimiento incontrolado³⁵⁻³⁹

Además, investigaciones recientes vinculan a las modificaciones estructurales y funcionales del Complejo I de la cadena respiratoria con enfermedades congénitas y adquiridas, dentro de las que se pueden mencionar a la enfermedad de Huntington, la de Parkinson, y la diabetes³⁰. El estudio del Complejo I involucra en la actualidad la evaluación de diversos agentes terapéuticos y plaguicidas³⁰.

En los últimos años se ha encontrado, a través del empleo de RMN, que las ACG tienen la capacidad de complejarse con el ión Ca^{2+} , y que la formación de dicho complejo está relacionada con la configuración relativa de las ACG.

Como consecuencia de dicha acción se ha postulado que quizás sea la formación de este complejo el que interviene en la inhibición de la NADH ubiquinona reductasa, ya que ésta es una enzima dependiente de calcio.^{22, 33}

El calcio es un ión que interviene en una variedad de procesos metabólicos como cofactor de diversas enzimas, por lo cual su captura, mediante la formación de complejos con las ACG puede modificar las funciones biológicas.

1.6.3 Relación estructura-actividad

Dos estudios han sugerido una relación entre la estructura de las ACG y la actividad biológica al considerar las siguientes características.²²

- Las ACG que contienen en su estructura dos anillos de tetrahidrofurano adyacentes en su estructura son las que han presentado mayor actividad biológica. Los estudios realizados han sugerido que la función del anillo de THF sea anclar la ACG a la región que contiene glicerol en la membrana liposomal²².
- La γ -lactona terminal es esencial para la actividad, ya que una reducción del doble enlace de la γ -lactona α, β -insaturada reduce la actividad. Las cetolactonas son menos potentes que las γ -lactonas α, β -insaturadas²².
- El número de grupos hidroxilo presentes a lo largo de la cadena también está relacionado con la actividad, presentando mayor actividad aquellas ACG que poseen un mayor número de grupos OH²².
- Un grupo hidroxilo en C-4 es esencial para la actividad²².
- ACG con grupos ceto a lo largo de la cadena alifática son menos activas que aquellas que presentan grupos hidroxilo²².
- La presencia de dobles enlaces o de dioles vecinales a lo largo de la cadena hidrocarbonada aumenta la actividad²².
- La longitud de la cadena C-35 o C-37 es la ideal para que se presente actividad²².

- Otro factor que afecta la actividad biológica es la distancia entre los grupos funcionales presentes en la ACG²².
- Se observa una mayor actividad cuando la distancia entre la γ -lactona y el THF es de trece carbonos. Las ACG que presentan un hidroxilo en C-9 presentan actividad considerable, así como aquellas que presentan anillos de THF flanqueados por OH²².

1.7 Actividades biológicas reportadas

1.7.1 Actividad citotóxica

Las ACG evaluadas hasta el día de hoy han mostrado actividad citotóxica determinada mediante la prueba de toxicidad *in vitro* contra células VERO (“African green monkey kidney epithelial cell”) o K.B. (carcinoma nasofaríngeo humano), en un intervalo de concentración entre 10^{-1} y 10^{-12} ($\mu\text{g/mL}$)^{22, 40-42} y/o contra *Artemia salina* (brine screen test BST)⁴³.

Además de las pruebas mencionadas anteriormente, también se han hecho estudios adicionales sobre la actividad de las ACG en líneas celulares entre las que se pueden mencionar colon, riñón, páncreas, pulmón, y seno, entre otras que podrían tomarse como referencia.

En la tabla 1.3, se presenta un espectro de la acción citotóxica de las ACG, reportando los resultados de la concentración media inhibitoria de crecimiento (IG_{50}) en 60 líneas celulares siguiendo el protocolo por el Instituto Nacional de Cáncer (USA), que mide el efecto producido por tres días de exposición. La IG_{50} se observó en un intervalo de 1 a $10 \mu\text{M}$ ²².

Tabla 1.3: Concentración necesaria para inhibir el 50% del crecimiento celular (IG50)

ACETOGENINA	IG 50 PROMEDIO DE 60 LÍNEAS CELULARES
Anonacina	0.81
Anonacinona	1.55
Isoanonacina	1.35
Isoanonacinona	3.02
Gigantetrocina	0.87
Bulatacina	1.91

Fuente: Banco de líneas celulares empleadas en el NCI (National Cancer Institute)

1.8 Cáncer

Uno de los mayores problemas en la quimioterapia actual ha sido el surgimiento de líneas celulares tumorales que han desarrollado resistencia a los agentes terapéuticos convencionales, tales como la adriamicina, vincristina, taxol, entre otros³². Considerando el mecanismo de acción de las ACG mencionado en el anteriormente, en diversos estudios in vitro se ha encontrado que estos compuestos producen un efecto citostático o/y citotóxico en líneas de células resistentes a fármacos.^{22, 44}.

Además, se ha reportado que en algunos casos la actividad citotóxica contra células no cancerosas es menor en relación a la que se observa contra células tumorales²². Por otro lado, en estudios recientes se ha reportado que la citotoxicidad producida por ACG es dependiente del ciclo celular, mediante el empleo de citometría de flujo se ha observado que estos compuestos tienen la capacidad de inhibir el crecimiento en líneas celulares cancerosas en la fase G1 del ciclo celular y que en células que se encuentran en la fase S de crecimiento el efecto citotóxico es mayor⁴⁵⁻⁴⁷.

Actualmente el cáncer es considerado como la segunda causa de muerte a nivel mundial y en el caso particular de Perú de acuerdo con los datos

reportados por el INEN en relación al índice de mortalidad, la incidencia de tumores malignos es la tercera causa de muerte, Tabla 1.4⁵⁰.

Tabla 1.4: Principales causas de mortalidad.

Causa de muerte	Porcentaje
Enfermedades del corazón	14
Diabetes mellitus	14
Tumores malignos	13
Accidentes	6
Enfermedades del hígado	5
Enfermedades cerebrovasculares	10
Demás causas	38

Fuente: Martínez-Climent, J. A., Andreu, E. J., Prosper, F. (2006) Somatic stem cells and the origin of cancer. Clinical & Translational Oncology. 9: 647-663

El cáncer es una de las dolencias multifactoriales que ha llamado la atención del mundo científico debido a la peligrosidad que éste presenta, y al hecho de que no se conoce un sistema que lo controle por completo de forma eficiente. Por tal motivo, se han desarrollado investigaciones con el propósito de encontrar alternativas para su tratamiento y prevención. Dichas alternativas involucran el estudio y empleo de los productos naturales como posibles agentes quimioterapéuticos tanto sintéticos como naturales tal es el caso de la presente investigación⁵⁰.

El desarrollo del cáncer está ligado a factores tanto ambientales (radiación UV), como químicos (agentes oxidantes) y biológicos (infecciones bacterianas o virales).

Los carcinógenos químicos y físicos influyen de modo significativo en el desarrollo de los tumores mediante varias vías, ya sea actuando como iniciadores (mutágenos comunes), promotores o como agentes que inducen estrés oxidativo, generando estrés e inestabilidad en el genoma⁵⁰.

1.8.1 Etapas del cáncer

El proceso de carcinogénesis es un proceso que involucra al menos tres etapas: la iniciación seguida por la fase de promoción a partir de la cual se puede llegar al desarrollo de la fase de progresión.

Durante la iniciación, el ADN adquiere mutaciones que pueden ser irreversibles y que requieren de uno o más ciclos celulares para mantenerse. Tanto el incremento en la velocidad de replicación y como el decremento en el proceso de apoptosis pueden contribuir a la promoción de la neoplasia a través de la producción de las clonas de las células inicialmente modificadas.

En este contexto los carcinógenos químicos pueden clasificarse como genotóxicos o no genotóxicos^{51, 52}.

Los carcinógenos genotóxicos son especies que reaccionan directamente con el ADN y actúan sobre las células de los órganos blancos mediante la formación de aductos en el material genético los cuales contribuyen a la formación de las neoplasias⁵¹.

Los carcinógenos no-genotóxicos o epigénicos reaccionan en las células blancas de tal modo que producen indirectamente la neoplasia o estimulan el desarrollo de tumores a partir de células dañadas⁵¹.

Su efecto mutagénico puede ser medido mediante varias pruebas ya sea *in vitro*, como la de Ames, y pruebas *in vivo*, como la de micronúcleos, que puede realizarse a corto plazo. En el caso de los carcinógenos epigénicos se han discutido diversos mecanismos, los cuales involucran un incremento en las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, que pueden actuar sobre el ADN, los lípidos y las proteínas.

De forma directa o mediante productos de la lipoperoxidación

pueden generar daño sobre el ADN, y contribuir de este modo con la etapa de iniciación. La producción de proteínas oxidadas puede tener efecto sobre las rutas de señalización, incluyendo la regulación de los factores de transcripción y las cascadas de las cinasas. Estos pueden ser los medios que generen aberraciones en la expresión genética y conlleven a un incremento en la proliferación celular o decremento en la apoptosis. Los carcinógenos no genotóxicos pueden contribuir al proceso de proliferación celular mediante interacciones sobre el proceso de mitosis o diversos procesos citotóxicos⁵⁰.

En el caso de las dos primeras etapas del proceso de carcinogénesis, se considera que están relacionadas en forma directa con el proceso de mutación; por consiguiente la evaluación del efecto anticancerígeno está ligada a la evaluación de antimutagénesis.

Los anticarcinógenos son compuestos que pueden inhibir la iniciación o la promoción del proceso de carcinogénesis. Muchos anticarcinógenos son también antimutágenos, de ahí la importancia de evaluar este tipo de compuestos. Instituciones como el Chemoprevention Branch of the National Cancer Institute (U.S.A.)

⁵¹.

1.8.2 Cáncer de próstata

El cáncer de próstata ha sido un problema para los hombres de mediana edad en los Estados Unidos. Aproximadamente 1 de cada 7 hombres son propensos a tener cáncer de próstata en sus vidas. El cáncer de próstata a menudo no presenta síntomas tempranos y cuando este se encuentra avanzado puede hacer que los hombres orinen con más frecuencia o tengan un flujo débil de orina, pero estos síntomas también obedecen a afecciones benignas de la próstata.⁴⁸

La mayoría de los hombres con cáncer de próstata son mayores de 65 años y no se mueren por la enfermedad es importante detectar y tratar este mal antes de que se presenten los síntomas pueden no mejorar la salud o ayudarlo a vivir más tiempo.

A medida que surgen las cifras de nuevos casos, también lo hace la demanda de encontrar un mejor tratamiento para esta enfermedad. En lugar de la quimioterapia muchas personas han estado buscando otro tipo de tratamiento⁴⁷.

1.9 Citotoxicidad

Un factor importante en el proceso de carcinogénesis es la evaluación del efecto citotóxico de diversos agentes. Esta muerte celular puede darse por dos vías básicamente:

- a) La necrosis se promueve cuando las células se exponen a condiciones fisiológicas extremas, como hipotermia o hipoxia, lo que produce un daño en la membrana plasmática. El proceso comienza con la pérdida de la habilidad de las células para mantener la homeostasis, llevando esto a una afluencia de agua e iones extracelulares. Los organelos, principalmente la mitocondria aumentan de tamaño llevando la célula a lisis.
- b) La apoptosis es un tipo de muerte celular que ocurre bajo condiciones fisiológicas normales en donde la célula misma induce su muerte. Las células que mueren por apoptosis muestran características morfológicas y bioquímicas específicas. Estas características incluyen agregación de la cromatina, condensación nuclear y citoplásmica, así como partición del citoplasma y núcleo en vesículas membranosas que contienen ribosomas, mitocondrias y material nuclear⁶⁹.

La apoptosis es un mecanismo de defensa celular innata contra la generación de tumores al menos por dos vías: la remoción de células con inestabilidad genómica producida por un agente epigénico y por la

eliminación de células que sufrieron daño sobre el ADN debido a un carcinógeno genotóxico⁶⁹.

Se ha observado además que algunos compuestos y agentes quimioterapéuticos con efecto antitumoral pueden disparar la apoptosis de células cancerosas. Las ACG al bloquear la cadena respiratoria, pueden activar este mecanismo celular.

Los ensayos para determinar la citotoxicidad pueden ser realizados *in vitro* mediante el cultivo de líneas celulares específicas, o *in vivo*, determinando el efecto del agente sobre el organismo en general, un órgano o sistema empleando modelos animales.⁵⁵ Estos métodos pueden estar relacionados con la viabilidad celular o la capacidad metabólica. La observación de los cuerpos apoptóticos empleando técnicas de tinción como la de hematoxilina-eosina es útil y ofrece resultados confiables⁶¹.

1.10 Apoptosis

Apoptosis o muerte celular Tipo I La muerte celular programada es el principal mecanismo de supresión tumoral que es ejecutado por células no malignas como un mecanismo de protección para eliminar células dañadas o no saludables y que pueden ser potencialmente dañinas. El término “apoptosis” fue introducido por Kerr y Wyllce⁶⁵ para definir una muerte celular regulada con características morfológicas distintas a la muerte celular por necrosis. La muerte celular por apoptosis se caracteriza por reducción del volumen celular, fragmentación y condensación nuclear, formación de burbujas y finalmente separación de los componentes celulares en el interior de los cuerpos apoptóticos⁶⁵.

Durante la apoptosis ocurren una serie de eventos moleculares y bioquímicos que hacen que este sea un tipo de muerte muy controlado, con una función biológica clara dirigida a eliminar de forma silenciosa células que ya han realizado su función o que están dañadas irreversiblemente^{66,68}.

Uno de los eventos tempranos durante la apoptosis es la translocación de la fosfatidilserina a la superficie externa de la membrana plasmática, la cual representa una señal quimiotáctica para las células fagocíticas para eliminar estas células y los cuerpos apoptóticos resultantes de este proceso, contribuyendo, a evitar que se liberen componentes extracelulares al medio que desencadenen procesos inflamatorios⁶⁷.

La apoptosis puede ser activada principalmente por dos vías de señalización:

- 1) La vía intrínseca o mitocondrial, donde las señales de muerte provienen del interior de la célula, normalmente en respuesta a señales de estrés celular, daño en el DNA, niveles altos de especies reactivas de oxígeno (ROS), infecciones virales o activación de oncogenes.
- 2) La vía extrínseca, la cual involucra la activación de receptores en la superficie celular por unión de ligando extracelulares. Ambas vías de activación de la apoptosis eventualmente convergen en la activación de enzimas proteolíticas llamadas caspasas que median rápidamente el desmantelamiento de las proteínas celulares y la estructura de la célula⁶⁸.

Dentro de este proceso hay una gran cantidad de interacciones proteicas como entrecruzamientos, rompimientos, síntesis y degradación, además de un reordenamiento de estructuras celulares, elevando significativamente el consumo de energía por parte de la célula, logrando su efectiva degradación para finalmente ser reciclada por parte de otras células. Se ha reportado que el tiempo que le toma a una célula en llevar a cabo este proceso depende del tipo de célula y las características de activación, pero en promedio es de 2 a 3 horas⁶⁷. En un cultivo de células la activación de este proceso depende de múltiples factores que estimulan las vías de iniciación, como ejemplo de ello se ha observado que si se presentan alteraciones en los procedimientos de subcultivo en el momento de confluencia celular, se ve afectado el índice mitótico promedio de las células, y posteriormente una activación del proceso apoptótico.⁶⁸

Uno de los aspectos más importantes frente a esta dinámica es que la muerte celular no solo puede darse por apoptosis. Como lo observaron inicialmente Kerr *et al.* (1972), la muerte celular puede ocurrir por medio de dos vías principales claramente distinguidas en su naturaleza: apoptosis y necrosis⁶⁵. Se ha postulado y comprobado que la necrosis celular es un proceso desordenado e independiente de energía, presenta cambios irreversibles en el núcleo celular (cariólisis) y pérdida de la estructura citoplasmática, además hay una clara disfunción en la mitocondria y aumento en el volumen celular, desencadenando citólisis⁶⁷, y posteriormente liberando todo el material citoplasmático hacia el exterior de la célula, produciendo generalmente fenotipos inflamatorios y necróticos en los tejidos afectados; mientras que el proceso apoptótico establece mecanismos que aseguran que el contenido celular no será liberado⁶⁷.

La vía de señalización extrínseca que inicia apoptosis se denominó así ya que involucra interacciones mediadas por receptores transmembranales⁶⁹, se ha descrito que esta vía es iniciada por unión de:

- 1) El TNF (Factor de Necrosis Tumoral) ligando al TNF receptor
- 2) El TRAIL (en inglés: TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand) a los receptores DR4 (en inglés: Death Receptor-4) y DR5
- 3) El FasL (en inglés: Fatty acid synthetase Ligand) al receptor FasR⁶⁸. Se conoce que estas asociaciones reclutan moléculas adaptadoras como FADD (en inglés: Fas-Associated Death Domain) o TRADD (en inglés: TNF Receptor-Associated Death Domain), las cuales activan caspasas iniciadoras -8 y -10 y finalmente se da la activación de caspasas ejecutoras -3, -6 y -7, lo que culmina en un fenotipo celular apoptótico con características fisiológicas y morfológicas descritas.

En la cascada de señalización intrínseca se ha reportado una serie de estímulos intracelulares, específicamente en la mitocondria, que causan cambios estructurales en la membrana mitocondrial, principalmente por la

apertura de poros de transición y alteración en el potencial transmembranal, lo que conlleva una liberación hacia el citosol de sustancias pro-apoptóticas que en estado normal permanecen dentro del espacio intermembranal⁶⁷. Estos componentes liberados han sido clasificados en dos grupos principales constituidos por:

- 1) Citocromo c, SMAC/Diablo (en inglés: Second mitochondrial activator of caspases / Direct IAP Binding protein with low PI) y la serín-proteasa HtrA2/Omi (en inglés: High-temperature requirement)⁶⁷, estos impulsan la cascada apoptótica vía activación de caspasas. Se ha descubierto que la liberación de citocromo c activa la proteína Apaf-1 (en inglés: Apoptotic protease activating factor-1) y la procaspasa-9, además de ATP, estableciendo un complejo proteico denominado “apoptosoma”, el cual activa la caspasa-3, iniciando la vía efectora de apoptosis mientras que las proteínas SMAC/Diablo y HtrA2/Omi promueven apoptosis por inhibición de IAP (inhibidores de proteínas apoptóticas) como cIAP1, cIAP2⁶¹
- 2) Factores inductores de apoptosis (AIF), endonucelasa G y la DNasa activada por caspasas (CAD). Estos últimos se liberan hacia el citosol, entran en el núcleo y fragmentan el ADN⁶⁷. La importancia de la degradación de ADN por endonucleasas dependientes de Ca²⁺ y Mg²⁺ radica en que generan fragmentos de 180 a 200 pares de bases⁶⁸, este patrón de fragmentos es altamente específico, y es un factor muy claro que diferencia este tipo de muerte celular programada con la necrosis, la cual no presenta patrón de degradación ni especificidad en los tamaños de los fragmentos⁶¹.

Actualmente se conoce que las proteínas reguladoras de los cambios estructurales en la membrana mitocondrial son de la familia Bcl-2, cuya función puede ser apoptótica o anti-apoptótica, quienes a su vez son controladas por la proteína supresora de tumores p53. Elmore (2007) reporta que las proteínas anti-apoptóticas incluyen Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG, y algunas de las proteínas pro-apoptóticas incluyen Bcl-10,

Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik, y Blk. Estas proteínas pueden eventualmente ser detectadas como un referente de gran confianza de activación⁶⁷.

1.10.1 Proteínas implicadas en la regulación de la apoptosis

La activación de la apoptosis es un proceso controlado estrictamente y regulado por la interacción de un gran grupo de proteínas. Entre estas proteínas se distinguen dos grupos o familias ampliamente estudiadas: las caspasas y las proteínas de la familia Bcl-2. Esta última familia se subdivide su a vez en tres grupos: antiapoptóticas, proapoptóticas y sólo-BH3.

- a) **Caspasas:** Las caspasas son una familia de proteínas que contienen un residuo nucleofílico de cisteína en el centro activo que participa en la ruptura proteolítica de motivos que contienen residuos de ácido aspártico, de aquí proviene su nombre (Caspases: “Cysteiny-ASPartic-acidproteASES”) y fue adoptado por convenio en 1996⁶⁹. La familia de las caspasas está compuesta por 15 miembros los cuales se pueden dividir en dos grupos: las caspasas procesadoras de citoquinas e involucradas en inflamación, también llamadas caspasas del grupo I y las caspasas involucradas en apoptosis, en las cuales centraremos la atención. Estas se pueden subdividir en caspasas iniciadoras o del grupo II (caspasas -8, -9 y -10) y caspasas ejecutoras o del grupo III (caspasa 3, caspasa 6 y caspasa 7) las cuales son a las que les tomaremos mayor atención como indicadores de presencia de apoptosis en los estudios realizados en este trabajo⁵⁶.

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

2.1 Instrumentos, materiales, reactivos y equipos

A. Materiales

- Pinzas
- Tijeras
- Gradilla para tubos de ensayo
- Micropipetas 20 uL
- Micropipetas 200 uL
- Micropipetas 1000 uL
- Tips 20 uL
- Tips 200 uL
- Tips 1000 uL
- Filtros de 2 um
- Pozos de cultivo 40 mm
- Placa de pozos 12 de cultivo
- Tubos eppendorf
- Pro-pipeta
- Cubetas de 1 mL. para espectrofotómetro
- Jeringa de 50 mL
- Recipiente plástico rectangular
- Tecnopor
- Parafilm
- Mechero de alcohol
- Placas Petri
- Pipetas Pasteur

- Frascos para medios de cultivo 1000 mL
- Frascos para medios de cultivo 250 mL.
- Frascos para medios de cultivo 100 mL
- Tubos medio de cultivo
- Beacker 100 mL
- Cámara de Neubauer
- Embudo
- Pipeta de 1 mL.
- Pipeta de 5 mL.
- Pipeta de 10 mL

B. Reactivos

De Pharmco-AAPER Chemical Company.

- Acetona - 4x4L - 32900HPLCCS4L
- Diclorometano - 4x4L- 32900HPLCCS4L
- Metanol - 4x4L - 339000ACSCS4L
- N-Hexano - 4x4L- 35900HPLCCS4L
- Suero Bovino Fetal (GIBCO, Nueva York)
- MTS (Sigma, Aldrich)
- NBT (Sigma, Aldrich)
- P-formaldehido (Sigma, Aldrich)
- Penicilina (Sigma, St. Louis)
- Estreptomicina (Sigma, St. Louis)
- Bis Acrilamida (USB corporation, Cleveland)
- Papel filtro
- Alcohol metílico
- Alcohol Isopropílico
- Sulfato Cúprico
- Hidróxido de Sodio

De Sigma Aldrich Chemical Company

- Sílica gel 60741-1KG
- TLC Plates – 60762-59EA
- 5-fluoruracil - F6627-1G
- Resina Amberlite XAD-2

De ATCC

- PC-3 Celulas de Cancer de Prostata – CLR-1435
- Medio F-12K 30-2004 – 6 botellas
- Tripsina EDTA 0.25% - 3 botellas
- Kit MTS de 1,000 Ensayos – G3580
- Kit Caspase - Glo -3/7 assay

C. Equipos

- Espectrofotómetro lector de multiplatos de 96 pocillos (96 well plate), marca Synergy, versión de software 2.00.18.
- Espectrofotómetro lector de platos de 96 pocillos (96 well plate), marca Synergy HTX, versión de software 2.05.5. para lumuinescencia.
- Contador de células de marca Synergy.
- Resonador magnético nuclear de marca Varian NMR, con frecuencias de observación de ^1H a 500 MHz y de ^{13}C a 125 MHz.

2.2 METODOLOGIA

2.2.1 Extracción de ACG a partir de las hojas de *Annona muricata*.

Las hojas fueron colectadas en igual grado de madurez, correspondiente a 16 semanas luego de la formación del “erizo” y el mismo día transportadas en contenedores de poliestireno expandido (tecnopor), hasta los laboratorios del MCPHS llegando el material vegetal vía aérea.

2.2.2 Obtención de los extractos crudos

El proceso para la obtención de los extractos fue de la siguiente manera para las hojas y los tallos, se secaron a temperatura ambiente y posteriormente se molieron empleando un molino manual. Para la extracción, se obtuvo un pulverizado de 431 gramos que fue macerado en 4 litros de metanol al 90% por siete días, después se filtró para separar los restos vegetales.

El extracto crudo se obtuvo después de evaporar el disolvente en el rota vapor a presión reducida y a una temperatura de 65 °C.

El extracto crudo metanólico se sometió a un proceso de partición empleando CH_2Cl_2 y agua por separado, posteriormente, la fracción CH_2Cl_2 se extrajo nuevamente con hexano y metanol al 90%. La fracción de CH_2Cl_2 se secó con sulfato de sodio anhidro para eliminar las trazas de agua, se filtró y se evaporó en rota vapor a una temperatura de 30°C, obteniéndose los extractos respectivos en formas y colores variados dependiendo del solvente. Estos extractos fueron los empleados en el siguiente nivel de purificación.

2.3 Separación cromatográfica mediante cromatografía en columna guiada por MTS.

a) Fraccionamiento en columna de resina AMBRLITE XAD-2

Aproximadamente 7 gramos de cada uno de los extractos anteriores se sometieron a separación cromatográfica usando una columna de 6 cm de diámetro y una altura de 25 cm, empleando sílica gel de malla 200-300 como soporte y eluyendo con un gradiente de diclorometano, hexano y metanol en una proporción inicial de 90:5:5, con un aumento gradual de polaridad hasta finalizar con metanol al 100%.

Figura 2.1: Proceso de extracción por columna de fraccionamiento



b) Purificación de las fracciones en placas de TLC

Posterior a la separación en columna de fraccionamiento las 39 fracciones obtenidas fueron sembradas en placas TLC de resina, en las cuales se usó el mismo solvente que en el fraccionamiento anterior las placas que tenían un patrón de R_f similar y una similitud bajo luz UV se agruparon en forma de un pool y se llevaron a las pruebas de viabilidad celular.

2.4 Divisiones de la columna cromatográfica guiada por viabilidad celular de las células PC-3.

La gran cantidad de ACG presentes en los extractos crudos, así como su gran parecido estructural, exigen métodos cromatográficos muy eficientes para lograr su purificación y posterior determinación estructural. La experiencia acumulada previamente en nuestro grupo de trabajo sobre estudios de extracción, purificación y elucidación estructural de ACG, motivó a establecer un método predictivo con células de cáncer de próstata PC-3 exponiéndolas a las 39 fracciones obtenidas previamente teniendo en cuenta que esta exposición y sus resultados sean reproducibles para separarlas y diferenciarlas.

Para concretar este propósito se decidió llevar a cabo la validación de

un método que permitiera establecer condiciones generales de separación de ACG a nivel analítico que pudiera servir de referencia para separaciones futuras de este tipo de compuestos. Las bases de dicho procedimiento se describen enseguida.

La validación de métodos analíticos se considera como un juicio que proporciona el fundamento para decidir si un método reúne las condiciones necesarias para su aplicación en un análisis químico. Por medio de este proceso también se establece que las características de un método cumplen con los requerimientos de aplicación analítica para los que fue diseñado. Para la validación del método se utilizó un lector multi platos (multi plate reader por su nombre en inglés) de marca Synergy HTX.

Los puntos analizados son los siguientes:

- a) Linealidad del sistema: Capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del compuesto en la muestra. Se realizó una curva de calibración por triplicado donde se monitoreó la relación concentración vs. respuesta medida. Se analizaron 4 diluciones (3, 10, 30 y 100 ($\mu\text{g/mL}$)).

Criterios de aceptación: El coeficiente de correlación lineal debe de ser mayor o igual a 0.99, el coeficiente de determinación (r^2) debe ser mayor a 0.98 y el coeficiente de variación $CV \leq 5\%$.

- b) Precisión: Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto, se evaluó como repetibilidad y reproducibilidad intra laboratorio.
- c) Repetibilidad: Precisión entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones. Se analizó un mismo día por quintuplicado, las cantidades de 100, 30 y 10 $\mu\text{g/mL}$. Criterio de

aceptación: El $CV \leq 5\%$.

- d) Reproducibilidad: Expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas en el mismo laboratorio, pero a diferentes condiciones de análisis, tales como días, equipo, columna o analista. Se realizó el análisis de 6 muestras con la concentración máxima establecida, en este caso 100 $\mu\text{g/mL}$, bajo las mismas condiciones de operación y por el mismo analista. Los resultados son aceptables si se obtiene un $CV \leq 15\%$.
- e) Límite de detección: concentración más baja que puede ser cuantificada cumpliendo con la exactitud y precisión del método. Los resultados son aceptables si se obtiene un $CV \leq 20\%$.
- f) Estabilidad de la muestra: Se evaluó la estabilidad de la muestra a diferentes períodos (1 semana, 15 días, 1 mes). Realizando la comparación de los resultados de los análisis iniciales de la muestra con los obtenidos de la misma muestra después de permanecer por un tiempo determinado en diferentes condiciones

2.5 Fraccionamiento por TLC preparativa

Luego del fraccionamiento en las placas de TLC las partes más activas sobre las pruebas de viabilidad celular se agruparon nuevamente y se llevaron a una placa de TLC preparativa la cual tiene la característica de absorber mayor cantidad de extracto y tiene una mayor visibilidad al momento de diferenciar los compuestos.

2.6 Caracterización de la ACG.

La caracterización estructural de las ACG se llevó a cabo empleando diferentes técnicas mono y bi-dimensionales de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) en un equipo Varian NMR con frecuencias de observación de ^1H a 500 MHz y de ^{13}C a 125 MHz (Cloroformo deuterado

como disolvente y como referencia interna).

2.7 Cultivo de células y evaluación de la citotoxicidad

Se preparó el Medio de cultivo F-12K el cual contiene medio Ham F12 modificado por Kaighn (F12K) con 2mM de glutamina modificado por la ATCC conteniendo 1.5 g/L de bicarbonato sódico + 10% Suero bovino fetal inactivado, también una solución de FBS (Suero Bovino Fetal por sus siglas en inglés) la cual sirvió para realizar tratamientos y lavados, se empleó también buffer borato sirvió para darle textura a las placas para el cultivo. Las preparaciones se realizaron en la cámara de bioseguridad en un medio totalmente estéril.

Al medio de cultivo F-12K; se adicionó Penicilina, Estreptomicina al 1%. El medio presentó un color rojo cereza, este ayudó a observar la variación de color. Así, si el medio se torna de color amarillo habrá estado en presencia de muerte celular y si se vuelve de color morado no habrá habido muerte celular en los cultivos. También el cambio de color del medio a amarillo puede significar contaminación.

La solución FBS proporcionó los componentes necesarios para realizar de una manera adecuada la extracción de las células.

Una cantidad de 20,000 células de cáncer de próstata PC-3 fueron sembradas dentro de los 96 pocillos de la placa de cultivo y se dio un tiempo de incubación de 24 horas junto con FBS y medio F-12k.

Pasadas las 24 horas de incubación se reemplazó con medio F-12K sin FBS luego se añadió cantidades diferentes de extracto y se usó 0.1% DMSO como solvente y como grupo control.

2.8 Obtención de células de cáncer de próstata

En un frasco estéril de 125 mL se colocaron células PC-3 que fueron obtenidas de la empresa ATCC luego se esperó la cantidad de días necesarios para que exista una confluencia evidente al microscopio óptico

entre las células.

Una vez pasado el tiempo y habiendo una confluencia significativa, la cantidad de 20,000 células de cáncer de próstata PC-3 previamente contadas en un equipo contador de células automatizado, fueron sembradas en cada uno de los pocillos dentro de los platos de 96 pocillos y se dio un tiempo de crecimiento de 24 horas junto con FBS y medio F-12K.

Luego se adicionó medio de cultivo F-12K dejando que repose durante 2 minutos y luego se retiró todo el medio que se adicionó. Para este primer lavado se usó el Medio F-12K sin enriquecerlo con Suero Bovino Fetal. Con otra pipeta se tomó medio F-12K enriquecido con Suero Bovino Fetal, y se lo adicionó al tubo de cultivo.

Pasadas las 24 horas se retiró el FBS y fue reemplazado con medio F-12K sin FBS.

Se añadió cantidades diferentes de extracto y se usó 0.1% DMSO como solvente y como grupo control.

2.9 Estabilización de cultivo (“in vitro”)

Las placas de cultivo fueron introducidas dentro de un recipiente plástico rectangular de 125 mL y se llevó a una incubadora que permitía una atmosfera adecuada de 5% de CO₂, para el desarrollo de las células.

El recipiente de plástico además de ser tapado, fue sellado con Parafilm. Esto para evitar la contaminación de los cultivos. El recipiente se colocó en la incubadora a 37°C.

2.10 Evaluación de la citotoxicidad por el método MTS.

Este método nos permitió evaluar como los diferentes extractos actúan sobre la muerte de las células. Esta técnica es un derivado del MTT, el cual es una compuesto amarillo que al ser reducido por la enzima Succinato-

deshidrogenasa (enzima del ciclo de Krebs); cambia de color a morado (Formazan). A mayor color morado formado habrá una mayor cantidad de células PC-3 viables lo que es cuantificado por absorbancia.

2.10.1 Metodología del método MTS

El medio de cultivo fue cambiado antes de la adición del reactivo MTS (25 µL), las condiciones de trabajo fueron a 37°C y todo el proceso se realizó en la cabina de bioseguridad. Se permitió que los cultivos estén en contacto con dicho compuesto en la incubadora a 37°C por 4 horas, esto para que las células puedan reducir el reactivo MTS (cambiar a este compuesto de un color amarillo a un color morado). Antes de completarse las 4 horas de exposición se adicionó los diversos extractos a diferentes concentraciones.

Al terminar el tiempo de exposición se retiró el medio de cultivo de las placas tratadas.

Esas soluciones fueron leídas a 570 nm en el espectrofotómetro que podía leer platos de 96 pocillos (96 well plate reader de la marca Realtek.). Las lecturas de los controles fueron tomadas como el 100% de sobrevivencia; las demás absorbancias fueron relacionadas con la absorbancia del control, esto para encontrar los porcentajes de sobrevivencia de todos los tratamientos. La siguiente muestra como hallamos los porcentajes de sobrevivencia.

$$\% \text{Sobrevivencia} = \frac{\text{Absorbancia}}{\text{Absorbancia Control}} \times 100\%$$

Los porcentajes de sobrevivencia celular fueron transformados en porcentaje de muerte con la siguiente relación, el 0% de sobrevivencia es igual 100% de muerte y viceversa.

$$\% \text{ Muerte} = 100\% - \% \text{ Supervivencia}$$

Para la medición de los tiempos y concentraciones más apropiadas de extracto primero se evaluó el efecto de la variación de concentraciones de los distintos extractos de *Annona muricata*, para hallar el IC₅₀ (Concentración que se utilizó en las subsiguientes pruebas). Para ello se utilizó distintas concentraciones de extractos, las cuales fueron calculadas utilizando la ecuación de dilución.

Las concentraciones que se utilizaron para encontrar el IC₅₀ fueron 100, 30, 10, 3 µg/mL y un control que no contenga extracto y un último con DMSO 1% como control positivo. Todos los tratamientos fueron adicionados 1 hora antes de culminar las 4 horas.

Luego se evaluó la muerte ocasionada por la variación de distintos tiempo de exposición. Los tiempos que se utilizaron para la evaluación de la acción de los extractos sobre las células fueron 15, 30, 40, 60 y 120 minutos.

2.11 Medición de las caspasas efectoras -3/7

Este método nos permitió evaluar como los diferentes extractos actúan sobre la muerte de las células programada o apoptosis y la diferencia de la necrosis celular. Esta técnica emplea un kit Caspasa - Glo® 3/7, el cual es un ensayo luminiscente que mide las actividades de dichas caspasas en los cultivos de células. El ensayo proporciona un sustrato luminiscente reactivo con las caspasas -3/7, el cual contiene la secuencia de tetrapéptido DEVD. Este sustrato se escinde para liberar aminoluciferina, un sustrato de luciferasa el cual se usa en la producción de luz.

El kit además tiene un reactivo que está optimizado para medir la actividad

de caspasas mediante la actividad de la luciferasa y la lisis celular.

2.11.1 Concentraciones y Tiempos utilizados para la evaluación de la citotoxicidad

Se evaluó el efecto de la variación de actividades en las células sembrando 10,000 células PC-3 en un microplato blanco de 96 pocillos por 24 horas y fue tratado con 10 mg/ml de del extracto dando intervalos de tiempo de 3, 6, 12 y 24 horas para ver la reacción de las caspasas sometidas al extracto además se usó DMSO como vehículo y control.

2.12 Análisis estadísticos

Para el caso del MTS y la medición de caspasas, se utilizó el análisis de ANOVA, para analizar si los distintos tratamientos presentan diferencias significativas.

Para hallar si las muestras eran similares se utilizó la prueba de contraste múltiple de Tukey. Se utilizó una significancia de $P < 0,01$; ya que la prueba de Tukey es de alta significancia. Esta prueba se realizó tanto para la prueba de variación de concentraciones de extractos y tiempos de exposición.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSION

3. Aislamiento, purificación y elucidación estructural de ACG a partir de las hojas de *Annona muricata*.

3.1 Obtención de los extractos crudos.

Se logró filtrar y separar los restos vegetales de los 431 gramos del polvo molido de *Annona muricata* macerados en los 4 litros de Metanol al 90%, el extracto crudo se obtuvo después de evaporar el disolvente en el rotavapor a presión reducida y a una temperatura de 65° el extracto crudo metanólico se sometió a un proceso de partición empleando CH_2Cl_2 y agua por separado, posteriormente, la fracción CH_2Cl_2 se extrajo nuevamente con hexano y metanol al 90%.

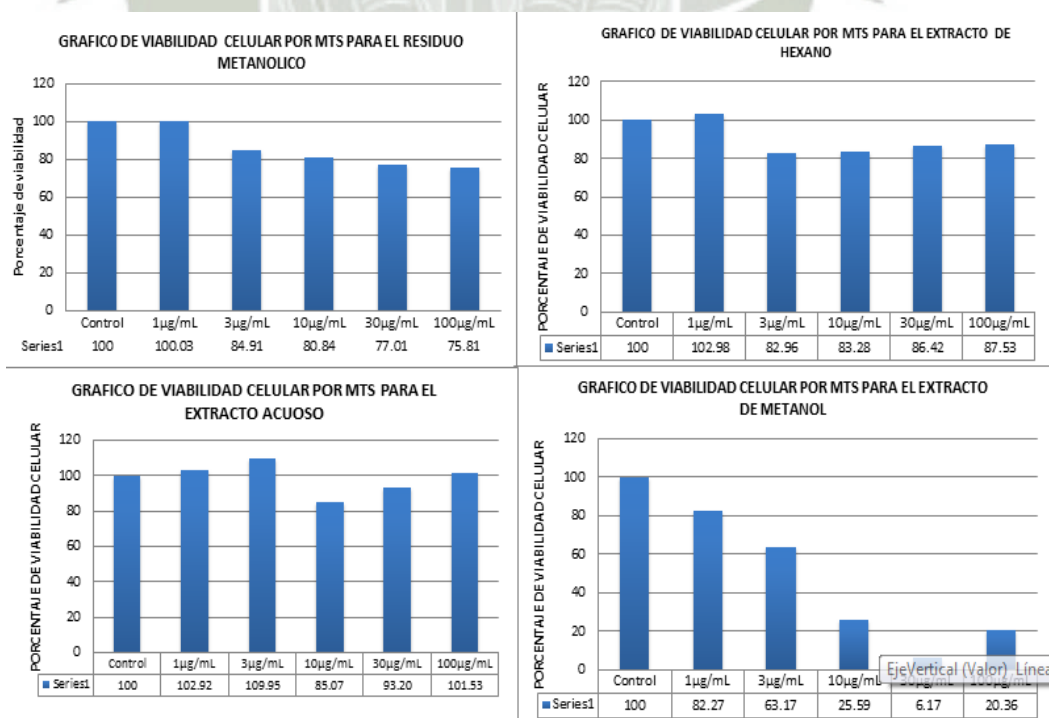
La fracción de CH_2Cl_2 se secó con sulfato de sodio anhidro para eliminar las trazas de agua, se filtró y se evaporó en el rotavapor a una temperatura de 30°C, obteniéndose los extractos respectivos en formas y colores variados dependiendo del solvente. Estos extractos fueron los empleados en el siguiente nivel de purificación resultando las 4 fracciones listas para ser tratadas por el ensayo de viabilidad celular MTS.

Como podemos apreciar en la figura 3.1 tenemos al extracto de residuo de metanol contenido en el frasco de la primera maceración, no presento una significativa diferencia sobre las células PC-3 a una concentración máxima de 30 $\mu\text{g/mL}$ y no fue considerado para las siguientes extracciones al obtenerse un

porcentaje de viabilidad celular de 75.81%, el extracto de Hexano igualmente no presento una significativa diferencia sobre las células PC-3 obteniendo un 86.41% de células viables y tampoco fue considerado para las siguientes extracciones al igual que el extracto acuoso, el cual tampoco presento una significativa diferencia sobre las células PC-3 llegando a 71.75 % de células viables.

El extracto metanólico si presento una significativa diferencia sobre las células PC-3 llegando a 6.58% de células viables, es decir más del 93% de muerte celular y fue el único extracto considerado para las siguientes extracciones que se realizarían para identificar las posibles ACG presentes en *Annona muricata*. Para las futuras mediciones por el método MTS se usó la concentración de 30 $\mu\text{g/mL}$ dado a que a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ el extracto metanólico llegaba solamente a 15.72 % de muerte celular es por eso que se vio por conveniente usar la concentración de 30 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 3.1: Primer proceso de fraccionamiento guiado por MTS.



Fuente: Elaboración propia.

3.2 Separación cromatográfica mediante cromatografía en columna guiada por MTS.

3.2.1 Fraccionamiento del extracto de Metanol por medio de la Cromatografía en columna usando resina AMBERLITE XAD – 2.

Se fraccionó el extracto que mostró ser más activo (Metanol), el siguiente paso fue tomar 10 gramos de la misma y llevar a rota vapor, después, el extracto se puso una columna de resina Amberlite XAD- 2 (Figura 3.2).

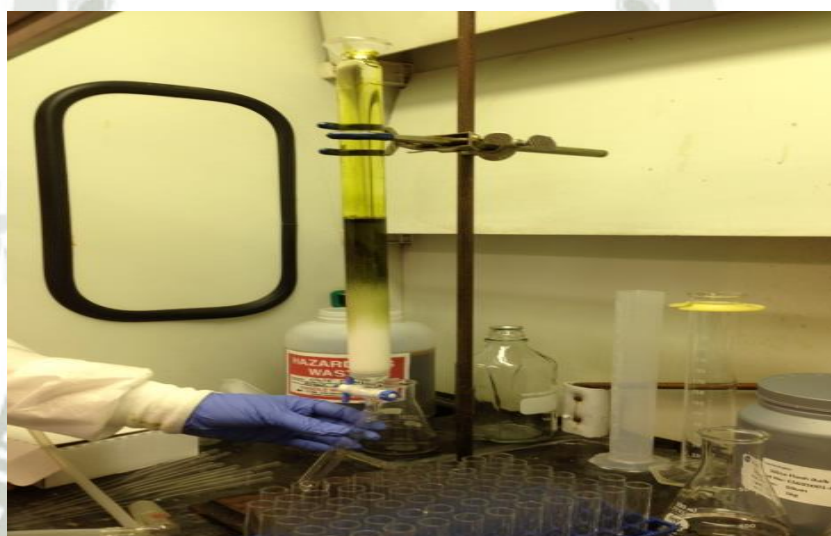
Dicha columna se utilizó con la finalidad de eliminar todos los compuestos iónicos, polares e inertes para concentrar la fracción que nos resultaba de interés.

3.2.2 Purificación de ACG mediante cromatografía en columna y diferenciación de las 39 fracciones luego obtenidas

Se realizó el fraccionamiento cromatográfico del extracto obtenido en aproximadamente 7 gramos de cada uno de los cuatro extractos anteriores los cuales se sometieron a separación cromatografica usando una columna de 6 cm de diámetro y una altura de 25 cm, empleando sílica gel y su gradiente de diclorometano, hexano y metanol en una proporción inicial de 90:5:5, colectaron 39 fracciones de 10 mL cada una aproximadamente, las cuales se agruparon en función de sus R_f comunes presentados en cromatografía en capa fina, se diferenció de una manera cualitativamente por sus variedades de colores frente a la radiación de luz UV los resultados de estas variación en R_f se puede apreciar en la Tabla 3.1 donde se muestran los tres grupos generales obtenidos, en la Figura 3.4 y 3.5 se puede apreciar las fracciones y los colores que se observa cuando las placas son alumbradas por una lámpara de luz UV los cuales iban desde un

color anaranjado claro a un rojo oscuro de manera que ascendía por la columna de TLC según estas variaciones de color y de medición de R_f se obtuvieron las siguientes cantidades de extractos: de la fracción 16-24 se obtuvieron 1.28 gramos con un R_f de 0.6. Esta muestra se empleó para la segunda separación obteniendo 9 fracciones de aproximadamente 10 mL. Donde finalmente se obtuvieron 0.265 gramos de las fracciones 25-39.

Figura 3.2: Cromatografía en columna de fraccionamiento



Fuente: Elaboración propia.

Tabla 3.1: Fracciones obtenidas a partir de la primera separación cromatografica

Tipo de ACG	R_f	Fracciones	Gramos Obtenidos
Menos polares (A)	0.8	1-15	1.16
Intermedias (B)	0.6	16-24	1.28
Más polares (C)	0.2	25-39	0.265

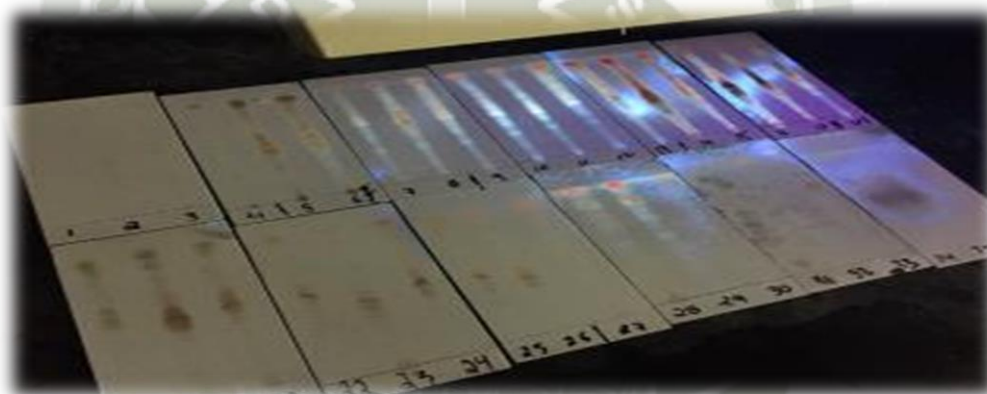
Fuente: Elaboración propia.

Figura 3.3: Placas de TLC resultantes del extracto separado luego de la columna de fraccionamiento



Fuente: Elaboración propia.

Figura 3. 4: Placas TLC Amberlite XAD-2 por medio de radiación UV.



Fuente: Elaboración propia

Figura 3. 5: Placas de TLC bajo radiación UV.



Fuente: Elaboración propia.

3.3 Proceso de fraccionamiento guiado por viabilidad celular MTS.

3.3.1 Evaluación de la viabilidad celular de las células PC-3 sobre todos los extractos obtenidos.

Todos los extractos de *Annona muricata* obtenidos previamente se llevaron a una gradiente de concentración ascendente la cual iba en concentraciones de 1, 3, 10, 30, 300 μg de extracto/mL diluido en agua ultra pura, todas estas concentraciones se sometieron a los ensayos de viabilidad celular MTS, fueron evaluados y diferenciados por proceso estadísticos.

3.3.2 Viabilidad celular de las células PC-3 sobre las 36 fracciones obtenidas.

Las 36 fracciones reunidas se analizaron a continuación en base a su citotoxicidad mediante el uso de ensayo de viabilidad celular MTS sobre las mismas células PC-3, las fracciones dieron los siguientes resultados (Figura 3.6).

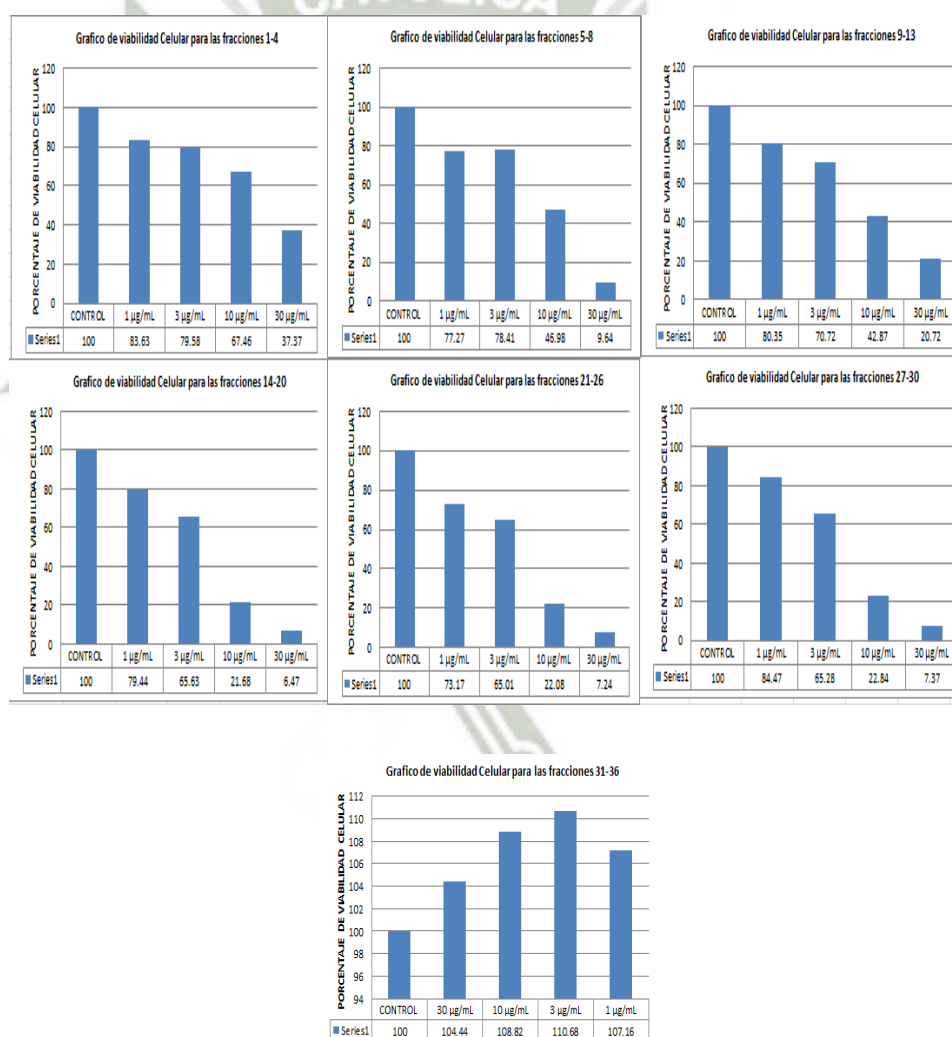
La fracción 1-4 dio un porcentaje de viabilidad celular a 30 $\mu\text{g/mL}$ a las 24 horas de tratamiento de 37.37% de células viables, la fracción 5-8 dio un porcentaje de muerte celular a 30 $\mu\text{g/mL}$ de 9.63% de células PC-3 viables que al parecer era significativa pero al no ser correlativa a los distintos aumentos en las concentraciones se le descartó. La fracción 5-8 dio un porcentaje de viabilidad celular de 9.63% por lo cual se le considero para las siguientes purificaciones por el contrario la fracción 9-13 no dio una significativa citotoxicidad sobre las células PC-3 obteniendo un porcentaje de viabilidad celular del 20.72%.

La fracción 14-20 si dio una citotoxicidad significativa sobre las células PC-3 obteniéndose 7.37% de células viables luego de 24 horas este resultado se valoró como significativo ya que el resultado era correlativo a los distintos aumentos en las concentraciones, por ende se la separo y se la llevo a posteriores purificaciones la misma suerte obtuvieron las fracciones 21-26 la cual también dio una

citotoxicidad sobre las células PC-3 que era significativa dando un porcentaje de viabilidad celular del 7.24% muy parecido al de la fracción 27-30 la cual dio 7.37% ambas fueron correlativas a los distintos aumentos en las concentraciones y por ende se las separo y se la llevo a posteriores purificaciones.

Las fracciones resultantes 31-36 tenían en su mayoría restos de clorofila y no poseían citotoxicidad alguna sobre las células PC-3, los cálculos y gráficos al detalle los podemos revisar en el apartado 1 de los anexos.

Figura 3.6: Segundo fraccionamiento de las 36 fracciones agrupadas guiadas por MTS.



Fuente: Elaboración propia.

3.4 Separación de las fracciones más activas por medio de una TLC preparativa

Después de obtener los resultados de MTS que ya se presentaron previamente las fracciones citotóxicas se agruparon de nuevo y se llevaron a un plato ancho de TLC Preparativa o PREPARATIVE TLC por sus siglas en inglés, para poder llevar a cabo este método cromatografico la fase móvil fue:

90 % Diclorometano, 5 % de Hexano, 5 % Metanol.

Se mostró 11 bandas (Figura 3.7) las cuales se rasparon, y el gel de sílice se eliminó por filtración, después se llevó a rota vapor, las fracciones fueron llevadas a pruebas para la citotoxicidad por medio del método MTS.

Figura 3.7: Bandas presentes en la TLC preparativa.



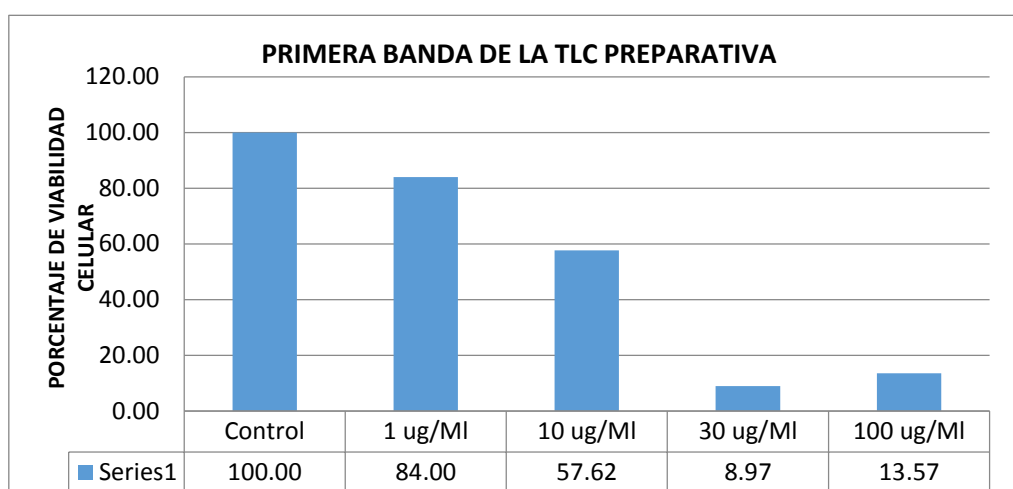
Fuente: Elaboración propia.

3.4.1 Evaluación de la viabilidad celular de las células PC-3 sobre las bandas obtenida de la TLC preparativa.

Después de probar todas las fracciones por medio del ensayo de citotoxicidad por medio del método MTS, se encontró que solamente la primera fracción (Figura 3.8) presenta citotoxicidad significativa y fue

esta misma la que se llevó a un posterior ensayo de purificación e identificación por RMN.

Figura 3.8: Tercer fraccionamiento de las bandas de la TLC preparativa guiadas por MTS.



Fuente: Elaboración propia.

3.5 Propuestas estructurales de las ACG aisladas de *Annona muricata*.

De las tres ACG aisladas de *Annona muricata*, se describen enseguida.

3.5.1 Análisis de los espectros de RMN ^1H y de ^{13}C y discusión en el uso de criterios de desplazamiento químico para la asignación de configuración relativa.

Los espectros de RMN ^1H de las ACG son prácticamente indistinguibles, habiendo solo pequeñas variaciones en los desplazamientos químicos entre sus señales, denotando con ello su similitud estructural. En consecuencia, sólo se describirán los detalles espectrales del espectro de la Figura 3.9, perteneciente a la ACG que proviene de *Annona muricata*, debido a que los espectros restantes poseen las mismas características generales de

desplazamientos químicos y multiplicidades.

De campo bajo hacia campo alto, aparece en 7.19 ppm una cuarteto ancho ($J = 1.5$ Hz) perteneciente a un protón vinílico en posición 4 de un sistema conjugado con acoplamiento alílico equivalente con tres protones; su desplazamiento químico y su multiplicidad (en este caso acopla con un grupo CH_2 y un CH confirman la presencia de la γ -lactona- α , -insaturada descrita anteriormente. Hacia 5.03 ppm muestra un cuarteto de cuartetos ($J = 7.2, 1.5$ Hz) originada por el protón base de oxígeno de la lactona, el cual presenta acoplamiento vecinal con el grupo Me y con el protón vinílico, así como acoplamiento homoalílico con el metileno en C-3 (Figura 3.10).

En la región de bases de oxígeno, de 3.30 a 3.85 ppm, aparecen 4 grupos de señales que integran, de campo bajo a campo alto, para 1, 2, 1 y 2 protones, respectivamente.

En todos los casos las señales que integran para 1 protón son señales anchas que no aportan información de conectividad por acoplamiento escalar, mientras que las otras señales aparecen como cuarteto (2F2) y quintetos (*Annona Muricata*) anchos denotando un acoplamiento equivalente ($J = 6.8$ Hz para el que aparece alrededor de 3.7 ppm, y $J = 5.5$ Hz para el cercano a 3.3 ppm) con tres y cuatro hidrógenos, respectivamente (Figura 3.11).

3.5.2 Determinación estructural y discusión de las ACG aisladas de *Annona muricata*

Dadas las características estructurales de las ACG, su determinación estructural debe hacerse con sumo cuidado debido a que las variaciones espectrales pueden ser mínimas entre estructuras diferentes. A pesar de que sus estructuras son aparentemente simples, en virtud de sus largas cadenas no

ramificadas, su complejidad deriva fundamentalmente de las amplias posibilidades de isomería posicional derivada de la presencia de grupos funcionales o sustituyentes a lo largo de la cadena. Esta complejidad se ve severamente acentuada debido a la presencia de centros estereogénicos, incrementando con ello el reto de una elucidación estructural inequívoca; esto explica que la información estereoquímica proporcionada se limite sólo a la configuración relativa en la gran mayoría de la ACG descrita actualmente.

Para extraer información de configuración absoluta se tiene la opción de aplicar el método extendido de Mosher⁷¹ pero éste adolece de varias limitaciones debido a las dificultades de interpretar los resultados de desplazamientos químicos inducidos si no se tiene la certeza en la asignación inequívoca del espectro de RMN correspondiente. No obstante, los avances más notables en este sentido han sido gracias a las síntesis estereoselectivas logradas exitosamente en los últimos años,^{72,73} ya que el control estereoquímico logrado en las transformaciones clave genera certidumbre al conocer de manera inequívoca la estereoquímica absoluta del intermediario o producto final. La información estereoquímica así generada se está tomando como referencia para extrapolarla en el proceso de elucidación estructural de nuevas ACG naturales⁷⁵.

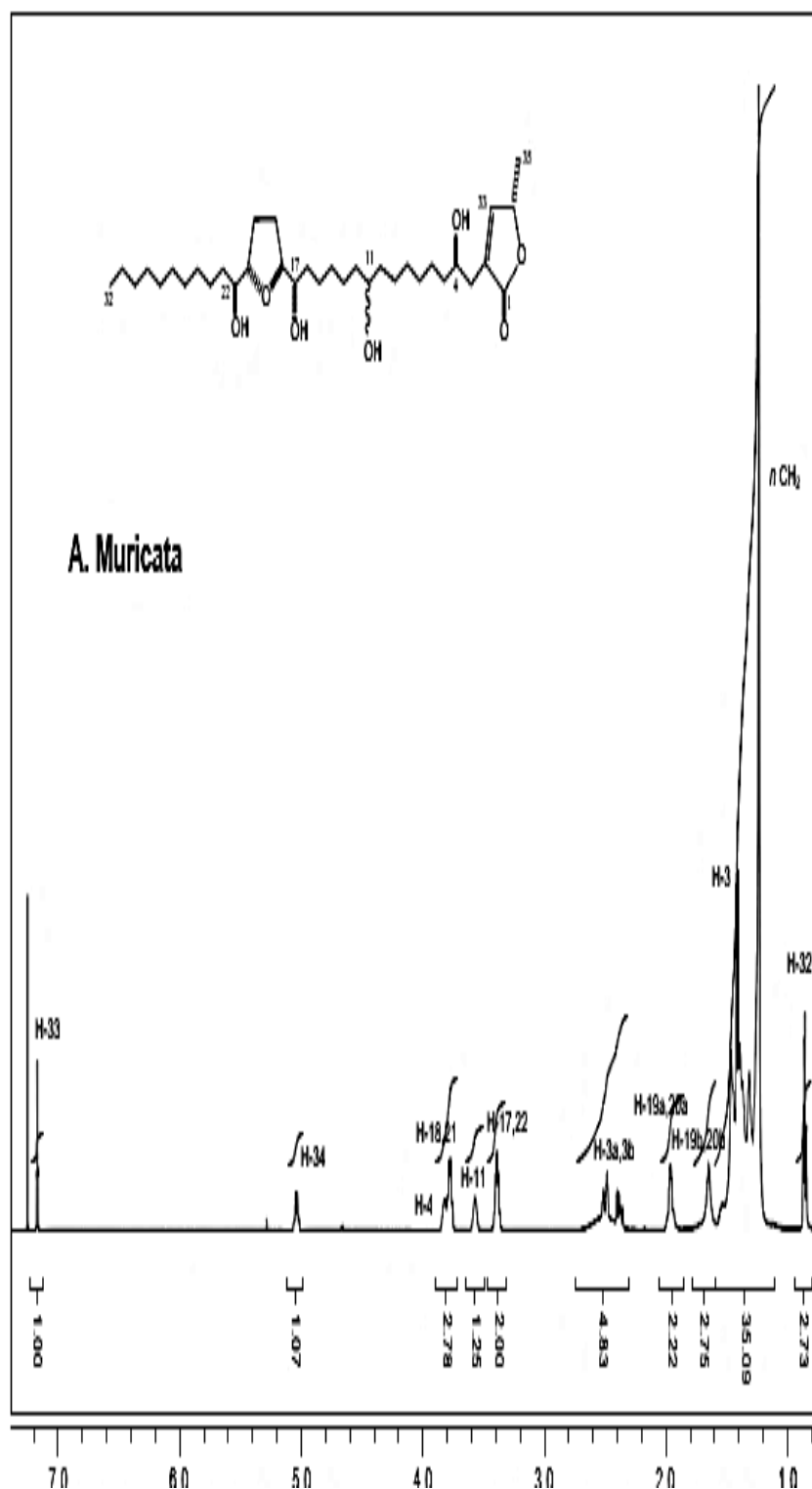
Por otro lado, debido a la consistencia cerosa de las ACG es muy difícil obtener cristales adecuados para su estudio por difracción de rayos-X, de tal manera que esta técnica está prácticamente marginada como una herramienta útil en el estudio estructural de ACG.

La herramienta analítica más útil para la determinación estructural de ACG es la Resonancia Magnética Nuclear (RMN). En las frecuencias de hidrógeno (^1H) y de carbono (^{13}C), brinda la

posibilidad de conocer el tipo de sustituyentes y grupos funcionales presentes en la estructura, y con un análisis cuidadoso de las integraciones en la frecuencia de ^1H , en combinación con algunas técnicas en la frecuencia de ^{13}C (APT, DEPT), es posible obtener el peso molecular de la sustancia en estudio. Por supuesto que también es una herramienta de elección para extraer información estereoquímica relativa y, como se mencionó anteriormente, aunque con ciertas reservas, información estereoquímica absoluta. Adicionalmente, donde hay más limitaciones para aplicar esta técnica es definitivamente en la isomería posicional, ya que habiendo un buen número de grupos metileno (CH_2) adyacentes a cierto sustituyente o grupo funcional la información de conectividad que comúnmente es resuelta por interacciones escalares (constantes de acoplamiento) o dipolares (efecto nOe) se diluye por el aglomeramiento en desplazamientos químicos de los grupos CH_2 mencionados.

En definitiva, la combinación de esta información con la obtenida mediante la aplicación de las técnicas adecuadas de RMN hace posible que la elucidación estructural de ACG sea una tarea confiable⁷⁹.

Figura 3. 9: Espectro de RMN ^1H y ^{13}C de la ACG aislada de *Annona muricata*



Fuente: Elaboración propia.

Figura 3.10: Ubicación de los H y C y su similitud con el compuesto Rolledecin C¹⁵.

Rollidecin C (1)		
Position	¹ H	¹³ C
1		174.5
2		131.2
3	2.40m, 2.53m	33.3
4	3.84m	69.9
5	1.20–1.50m	37.4
6	1.20–1.50m	25.4
7–9 (1); 7–11 (2)	1.20–1.50m	29.1–29.7
10 (1); 12 (2)	1.20–1.50m	26.1
11 (1); 13 (2)	1.20–1.50m	35.8
12 (1); 14 (2)	3.92–3.98m	80.1
13 (1); 15 (2)	2.04m, 1.50m	32.2
14 (1); 16 (2)	2.04m, 1.50m	28.6 ^a
15 (1); 17 (2)	3.92–3.98m	80.7
16 (1); 18 (2)	3.92–3.98m	81.5
17, 18 (1); 19, 20 (2)	1.80–1.95m	28.5, ^a 28.4 ^a
19 (1); 21 (2)	3.92–3.98m	82.5
20 (1); 22 (2)	3.36m	74.7
21 (1); 23 (2)	1.20–1.50m	34.5
22 (1); 24 (2)	1.20–1.50m	25.8
23–29 (1); 25–31 (2)	1.20–1.50m	29.1–29.7
30 (1); 32 (2)	1.20–1.50m	31.9
31 (1); 33 (2)	1.20–1.50m	22.6
32 (1); 34 (2)	0.88t (<i>J</i> = 7.0)	14.0
33 (1); 35 (2)	7.19m	151.7
34 (1); 36 (2)	5.06m	78.0
35 (1); 37 (2)	1.43d (<i>J</i> = 6.9)	19.1

Figura 3.11: ACG encontrada.

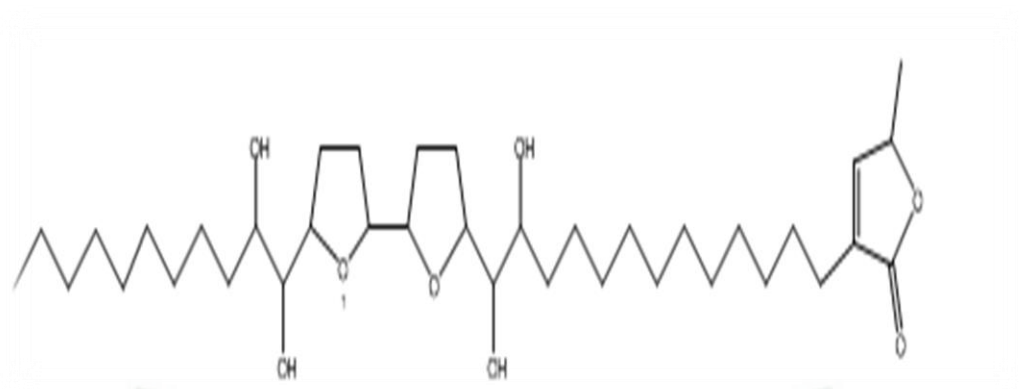
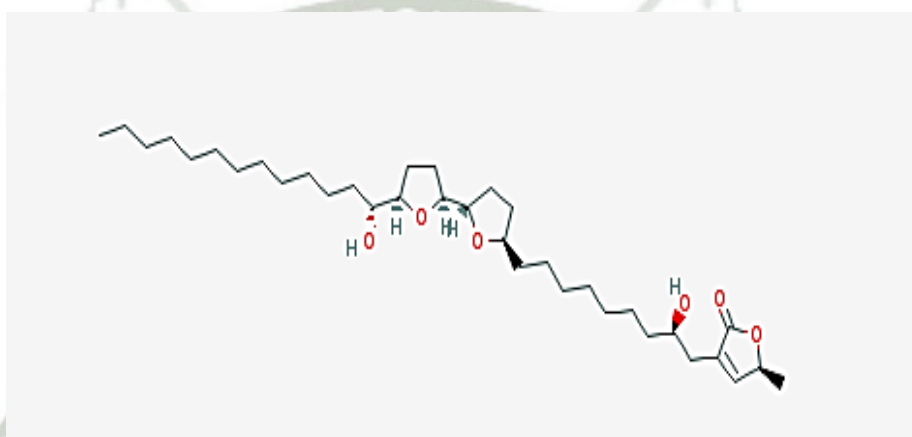


Figura 3.12 “Rolledecin C” encontrada por Zhen-Ming Gu, 1997¹⁵.



Fuente: Banco de datos de “Pub Chem”, (open chemistry data base)

Figura 3. 13: Localización de Carbonos según el espectro de RMN

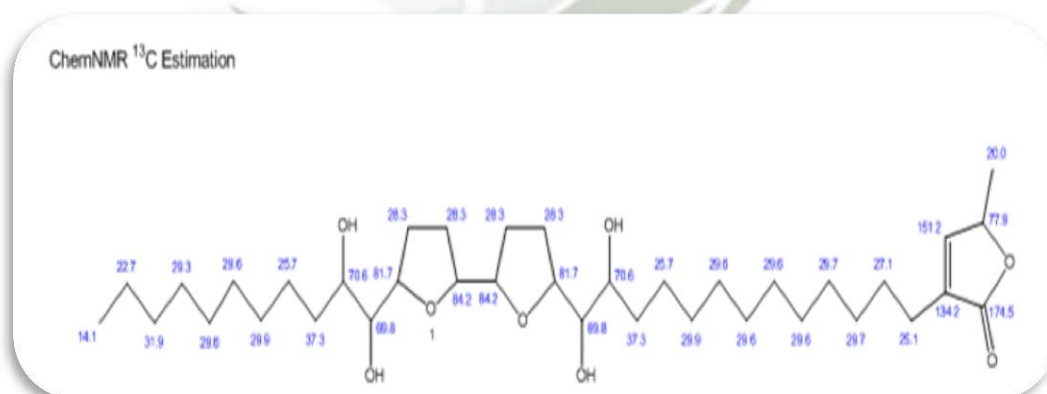
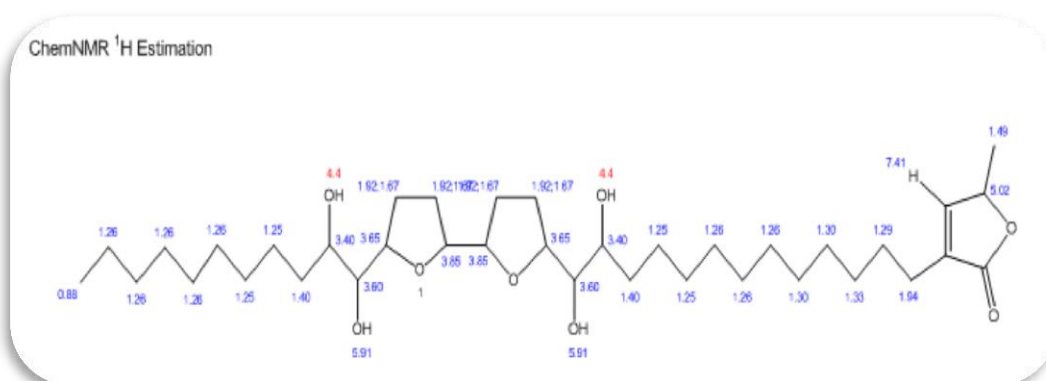


Figura 3. 14: Localización de Hidrógenos según el espectro de RMN



3.6 Medición de la actividad de las caspasas efectoras -3/7.

De las 10,000 células PC-3 que se sembraron en un plato blanco de 96 pocillos (ver hoja de protocolo Anexo A.4.1.) por un periodo de tiempo de 24 horas midiendo la actividad luminiscente con intervalos de 3, 6, 12 y 24 horas luego de ser tratado con 10 mg/ml del extracto que se encontró más citotóxico.

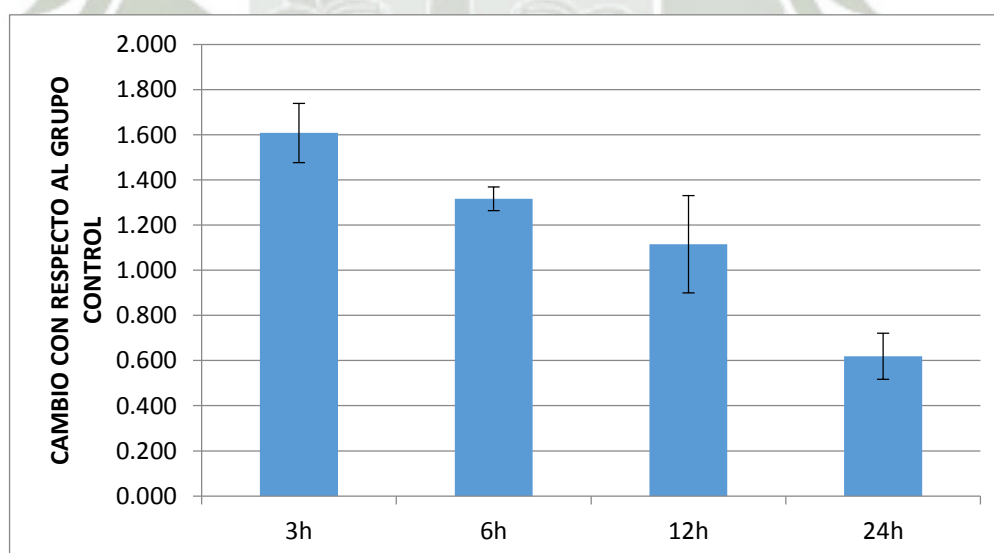
Se usó para esta evaluación DMSO como vehículo y control dado que a una concentración mayor del 1% el DMSO tiene la capacidad de producir muerte a las células según bibliografía y como funciona bien como vehículo a una concentración menor del 1%.

Los resultados para este ensayo demostraron que las Caspasas 3 y 7 comenzaron a tener una mayor presencia de actividad con respecto a la variación al grupo control que se entiendo por FOLD CHANGE por su metodología en las siglas del idioma ingles de esta manera se obtuvo una serie de resultados al pasar de las 24 horas de evaluación, los resultados luego de ser llevados a tablas se tabularon en un gráfico de barras el cual podemos apreciar en la Figura 3.15 donde se muestra que:

- A las 3 horas de iniciado el ensayo se tuvo un valor de 1.6 veces mayor al grupo control de DMSO.
- A las 6 horas de iniciado el ensayo se encontró un valor de 1.3 veces mayor al grupo control de DMSO.
- A las 12 horas de iniciado el ensayo teniendo un valor de 1.2 veces mayor al grupo control de DMSO.
- A las 24 horas de iniciado el ensayo teniendo un valor de 0.5 veces mayor al grupo control de DMSO.

Estas variaciones con respecto al grupo control nos hacen denotar que la actividad de las caspasas están disminuyendo dado a que hay menor cantidad de células PC-3 viables que produzcan caspasas, es por ello que por medio de este ensayo podemos apreciar que el extracto final obtenido esta desencadenando un proceso de apoptosis en las células PC-3 mas no un proceso de necrosis. (Figura 3.15)

Figura 3.15: Diferencia de “FOLD CHANGE” mayor que el grupo control



Fuente: Elaboración propia.

Lo que nos muestra este grafico es la variación de la actividad de las caspasas que en un principio fue de 1.60 de actividad y fue bajando dado a que no habían más

caspasas en las células pues estas estaban siendo muertas por nuestro extracto los cual nos da un indicador fuerte de apoptosis.



CAPITULO IV

CONCLUSIONES

PRIMERA: Se desarrolló un método para la aislar acetogeninas (ACG) por medio de extracciones guiadas por MTS.

SEGUNDA: Se identificó una ACG tetrahidroxilada presente en las hojas de *Annona muricata*. De acuerdo a sus datos de RMN, esta acetogenina podría ser epimérica con la Rolledecin C, compuesto previamente encontrado por Lu Zeng y Zheng-Ming gu en 1997.

TERCERA: La ACG evaluada en un estudio *in vitro* indujo daño citotóxico en las células de cáncer de próstata PC-3 por medio de los ensayos de MTS.

CUARTA: La ACG evaluada presentó un efecto quimioterapéutico inhibiendo hasta un 90% el desarrollo de las células de cáncer de próstata.

QUINTA: La Actividad de las Caspasas efectoras -3/7 resulto ser aumentada a medida que el extracto era aplicado a diferentes concentraciones de manera proporcional, lo que es indicativo a una presencia de apoptosis celular y descartando la posibilidad de estar frente a un proceso de necrosis celular.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. A. Queiroz, E., Roblot, F., Duret, P., Figadère, B., Gouyette, A., Laprévote, O., Serani, L., Hocquemiller, R. (2000) Syntesis, Spectroscopy, and Cytotoxicity of Glycosylated Acetogenin Derivatives as Promising Molecules for Cancer Therapy.
2. B.Tulp M., Bohlin, L. (2004) Drug Discovery Today *Annona Muricata*. 9: 250-258.
3. Cassady, J. M., Baird, W. M., Chang Ching-Jer. (1990) Natural Products as a Source of Potential Cancer Chemotherapeutic and Chemopreventive Agents. *J. Nat. Prod.* 53: 23- 41
4. B, Márquez, A. C., Lara, O. F., Esquivel, R. B., Mata E. R. (1999) Plantas Medicinales de México II Composición, uso y Actividad Biológica. Ed. UNAM, México, D.F. 49-51.
5. González, M. (2013). Chirimoya (*Annona cherimola* Miller), frutal tropical y subtropical de valores promisorios. Febrero 07, 2015.
6. González, A. (2014). Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas de las amazonas. Febrero 07, 2015, de Universidad Nacional de Colombia.
7. Castaño, M., Zapata, J. (2012). Cultivos Celulares. Febrero 09, 2015, de Biogénesis.
8. Cell Biolabs, INC. (2011). A549/GFP Cell Line. Enero 10, 2016, de Cell Biolabs, INC.
9. Jong Keun Son, Dal Hwan Kim, Hee Woo. (2003) Two New Epimeric Pairs of Acetogenins Bearing a Carbonyl Group from *Annona cherimolia* Seeds. *J. Nat. Prod.* 66: 1369-1372
10. A. Queiroz, E., Roblot, F., Duret, P., Figadère, B., Gouyette, A., Laprévote, O., Serani, L., Hocquemiller, R. (2000) Syntesis, Spectroscopy, and

Cytotoxicity of Glycosylated Acetogenin Derivatives as Promising Molecules for Cancer Therapy.

11. B.Tulp M., Bohlin, L. (2004) Drug Discovery Today *Annona Muricata*. 9: 250-258.
12. Cassady, J. M., Baird, W. M., Chang Ching-Jer. (1990) Natural Products as a Source of Potential Cancer Chemotherapeutic and Chemopreventive Agents. *J. Nat. Prod.* 53: 23- 41
13. B, Márquez, A. C., Lara, O. F., Esquivel, R. B., Mata E. R. (1999) Plantas Medicinales de México II Composición, uso y Actividad Biológica. Ed. UNAM, México, D.F. 49-51.
14. González, M. (2013). Chirimoya (*Annona cherimola* Miller), frutal tropical y subtropical de valores promisorios. Febrero 07, 2015.
15. González, A. (2014). Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas de las amazonas. Febrero 07, 2015, de Universidad Nacional de Colombia.
16. Castaño, M., Zapata, J. (2012). Cultivos Celulares. Febrero 09, 2015, de Biogénesis.
17. Cell Biolabs, INC. (2011). A549/GFP Cell Line. Enero 10, 2016, de Cell Biolabs, INC.
18. Jong Keun Son, Dal Hwan Kim, Hee Woo. (2003) Two New Epimeric Pairs of Acetogenins Bearing a Carbonyl Group from *Annona cherimolia* Seeds. *J. Nat. Prod.* 66: 1369-1372
19. Hall James, Pino Alejandro, Kelley Charles, Bedregal Steven, (2016) Isolation of an anti-tumor compound from the leaves of *Annona muricata* and pharmacological characterization in PC-3 cell (2016). *The PHASEB Journal*.
20. Dal Hwan Kim, Eun Sook Ma, Kui Duk Suk, Jong Keun Son, Jong Soon Lee, Mi Hee Woo. (2001) Annonalin and Annocherimolin, New Cytotoxic Annonaceous Acetogenins from *Annona cherimolia* Seeds. *J. Nat. Prod.* 64: 502-506.
21. Chen Chung-Yi, Chang Fang-Rong, Pan Wen-Bin, Wu Yang-Chang. (2001) Four alkaloids from *Annona cherimola*. *Phytochemistry*.56: 753-757

22. Chen Chung-Yi, Chang Fang-Rong and Wu Yang-Chang. (1998)
Cherininaine, a Novel Dimeric Amide from the Stems of *Annona cherimola*. *Tetrahedron Lett.* 39: 407-410
23. Chen Chung-Yi, Chang Fang-Rong and Wu Yang-Chang. (1997)
Cherimoline, a Novel Alkaloid from the Stems of *Annona cherimola*.
Tetrahedron Lett. 38: 6247- 6248
- 24.
25. Lu Zeng, Qing Ye, Nicholas H. Oberlies, Guoen Shi, Zhe-Ming Gu, Kan He
and Jerry L. McLaughlin (1997) Recent Advances in Annonaceous
Acetogenins, *Natural Products*. 13, 275-306.
26. Chih-Chuang Liaw, Fang-Rong Chang, Chih-Yuan Lin, Chi-Jung Chou,
Hui-Fen Chiu, Ming-Jung Wu, and Yang-Chang Wu. (2002) New Cytotoxic
Monotetrahydrofuran Annonaceous Acetogenins from *Annona muricata*. *J.*
Nat. Prod. 65: 470-475
27. Gleye, C., Laurens, A., Hocquemiller, R., Cave, A. (1997) Isolation of
Montecristin, a Key metabolite in Biogenesis of Acetogenins from *Annona*
muricata and Its Structure elucidation by Using Tandem Mass
Spectrometry. *J. Org. Chem.* 62: 510-513
28. Geum-soog, K., Lu Zeng, Feras, A., Lingling, L. R., Feng-E, Wu,
McLaughlin, J. L., Sastrodihardjo, S. (1998) Two New Mono-
Tetrahydrofuran Ring Acetogenins, Annomuricin E and Muricapentocin,
from the Leaves of *Annona muricata*. *J. Nat. Prod.* 61: 432-436
- 29.
30. Gleye, C., Duret, P., Laurens, A., Hocquemiller, R., Cave, A. (1998) cis-
Monotetrahydrofuran Acetogenins from the Roots of *Annona muricata*. *J.*
Nat. Prod. 61: 576-579
31. Zeng, L., Wu, F., Oberlies, N., McLaughlin, J., (1996) Five New
Monotetrahydrofuran Ring Acetogenins from the Leaves of *Annona*
muricata. *J. Nat. Prod.* 59: 1035-1042
32. Rieser, M. (1996) Five Novel Mono-tetrahydrofuran Ring Acetogenins from
the Seeds of *Annona muricata*. *J. Nat. Prod.* 59: 100-108

33. Chang, F., Wu, F. (2001) Novel Cytotoxic Annonaceous Acetogenins from *Annona muricata*. J. Nat. Prod. 64: 925-931
34. Jirovetz, L., Buchbauer, G., Ngassoum, M. (1998) Essential Oil Compounds of the *Annona muricata* Fresh Fruit Pulp from Cameroon. J. Agric. Food Chem. 46: 3719-3720
35. Cave, A., Figadère, B., Laurens, A., and Cortes, D. (1997) Acetogenins from Annonaceae. Progress in the chemistry of Organic Natural Products. Springer- Verlay, New-York. 81-287.
36. Qingy, E., Lu Zeng, Yan Zhang, Geng-Xian Zhao, McLaughlin, J. L. (1995) Longicin and goniothalamycinone: novel bioactive monotetrahydrofuran acetogenins from *Asimina*. J. Nat. Prod. 58: 1398-1406
37. Wu, F., Wo Geng-Xian, Zeng Lu, Zhang Yang, Schwedler, J. T. (1995) McLaughlin J. L., Additional bioactive acetogenins, annomutacin and (2, *d-trans* and *cis*)- 10-R-annonacin- a –ones from de leaves of *Annona muricata*. J. Nat. Prod. 58: 1430-1437
38. Matthew, J., Rieser, M. J., Gu Zhe-Ming., Fang Xin-Ping, Zeng L., Wood, K. V., McLaughlin, J.L. (1996) Five Novel Mono-tetrahydrofuran Ring Acetogenins from the Seeds of *Annona muricata*. J. Nat. Prod. 59: 100-108
39. Liu Xiao-Xi, Alali, F. Q., Pilarinou, E., McLaughlin, J. L. (1998) Glacins A and B: Two Novel Bioactive Mono-tetrahydrofuran Acetogenins from *Annona glabra*. J. Nat. Prod. 61: 620-624
40. Liaw Chih-Chuang, Chang Fang-Rong, Chen Yuan-Yng, Chiu Hui-Fen, Wu Ming- Jung, Wu Yang-Chang. (1999) New Annonaceous Acetogenins from *Rollinia mucosa*. J. Nat. Prod. 62: 1613-1617
41. McCloud, T. G., Smith, D. L., Chang, C. J., Cassady, J. L. (1987) Annonacine, a novel, biologically active polyketide from *Annona desicora*. Experimentia, 43: 4010-4015
42. Kim, E. J., Tian, F., Woo, M. (2000) Asitrocin, (2,4)-*cis*- and *trans*-Asitrocinones: Novel Bioactive Mono-tetrahydrofuran Acetogenins from *Asimina triloba* seeds. J. Nat. Prod. 63: 1503-1506

43. Zafra-Polo, M. C., Figadére, B., Gallardo, T., Tormo, J., Cortes, D. (1998) Natural Acetogenins from annonaceae, synthesis and mechanism of action. *Phytochemistry*. 48: 1087-1117
44. Esposti, M. D., Ghell, A., Ratta, M., Cortes, D. (1994) Estronell E., Natural substances (acetogenins) from the family Annonaceae are powerful inhibitors of mitochondrial NADH dehydrogenase (Complex I). *J. Biochem.* 301: 161-167.
45. Gallardo, T., Zafra-Polo, M. C., Tormo, J., González, C., Franck, X., Esstornell, E., Cortes, D. (2000) Semisynthesis of Antitumoral Acetogenins: SAR of Functionalized Alkyl-Chain Bis-Tetrahydrofuranic Acetogenins, Specific Inhibitors of Mitochondrial. *J. Med. Chem.* 43: 4793-4800
46. Oberlies, N., Jones, J., Corbett, T., Fotopoulos, S., McLaughlin, J. (1995) Tumor cell growth inhibition by several Annonaceous acetogenins in an in vitro disk diffusion assay. *Cancer Lett.* 96: 55-62
47. Zeng, B., Wu, Y., Jaing S., Yu Q., Yao Z., Liu Z., Li H., Li Y., Chen X., Wu Y. (2003) Studies on Mimicry of Naturally Occurring Annonaceous Acetogenins: Non-THF Analogues Leading to Remarkable Selective Cytotoxicity against Human Tumor Cells. *Chem. Eur.* 9: 282-290
48. Fang X. P., Rieser M. J., Gu M., Zhao, G., McLaughlin, J. (1993) *Phytochemistry Anal.* 4: 27-67
49. Miyoshi, H., Ohshima, M., Shimada, H., Akagi, T., Iwamura, H., McLaughlin, J. Essential structural factors of annonaceous acetogenins as potent inhibitors of mitochondrial complex I. *Bioch. Bioph. Acta.* 1365: 443-452
50. Motoyama, T., Yabunaka, H., Miyoshi, H. (2002) Essential Structural Factors of Acetogenins, Potent Inhibitors of Mitochondrial Complex I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12: 2089-2092
51. Yabunaka, H., Abe, M., Kenmochi, A., Hamada, T., Nishioka, T., Miyoshi, H. (2003) Synthesis and Inhibitory Activity of Ubiquinone- Acetogenin Hybrid Inhibitor with Bovine Mitochondrial Complex I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13: 2385-2388

52. Nakanishi, Y., Chang, F., Liaw, C., Wu, Y., Bastow, K. F., Lee, K. (2003)
Acetogenins as Selective Inhibitors of the Human Ovarian 1A9 Tumor Cell
Line. J. Med. Chem. 46: 3185-3188
53. Chang, F., Wu, Y. (2001) Novel Cytotoxic Annonaceous Acetogenins
from *Annona muricata*. J. Nat. Prod. 64: 925-931
54. Tormo, J. R., Estornell, E., Gallardo, T., Gonzalez, M. C., Cavé, A., Granell,
S., Cortes, D., Zafra-Polo, M. C. (2001) γ -Lactone-Functionalized
Antitumoral Acetogenins are the Most Potent Inhibitors of Mitochondrial
Complex I. Bioorg. Med. Chem. Lett. 11: 681-684
55. Santos, L. P., Pinto, G. B., Takahashi, J. A., Silva, M. A. (2003) Biological
screening of Annonaceous Brazilian Medicinal Plants using *Artemia salina* (
Brine Shrimp Test). Phytomedicine. 10: 209-211
56. Chang, F., Liaw, C., Lin, C., Chou, C., Chiu, H., Wu, Y. (2003) New
Adjacent Bis- Tetrahydrofuran Annonaceous Acetogenins from *Annona
muricata*. Planta Med. 69: 241-246
57. Chih, H., Chiu, H., Tang, K., Chang, F., Wu, Y. (2001) Bullatacin, a potent
antitumor annonaceous acetogenina, inhibits proliferation of human
hepatocarcinoma cell line 2.2.15 by apoptosis induction. Life Sci. 69: 1321-
1331
58. Hu, Y., Martin, J., Le Leu, R., Young, G. P. (2002) The colon response to
genotoxic carcinogens in the rat: regulation by dietary fibre. Carcinogenesis.
23: 1131-1137
59. De Flora, S., Ferguson, L. R. (2005) Overview of mechanisms of cancer
chemopreventive agents. Mutat. Res. 591: 8-15
60. Bird, P. R. (1995) Role of aberrant crypt foci in understanding the
pathogenesis of colon cancer. Cancer Lett. 93: 55-71
61. Yasuhiro, Y., Mori. H. (2003) Pre-cancerous lesions for colorectal cancers in
rodents: a new concept. Carcinogenesis. 6: 1015-1019
62. Bird, R, P. (1987) Observation and quantification of aberrant crypts in the
murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary finding. Cancer
Lett. 37: 147- 151

63. Pretlow, T. P., Cheter, C., O`Riordan, M. A. (1994) Abberant crypt foci and colon tumor in F344 rats have similar increases in proliferative activity. *Int. J. Cancer.* 56: 599-602
64. Roncucci, L., Stamp, D., Medline, A., Cullen, J. B., Bruce, W. R. (1991) Identification of quantification of aberrant crypt foci and microadenomas in the human colon. *Hum. Pathol.* 22: 2887-294
65. Sohn, O. S., Fiala, E. S., Requeijo, S. P., Weisburger, J. H., González, F. J. (2001) Differential effect of CYP2E1 status on the metabolic activation of the colon carcinogens azoxymethane and methylazoximethanol. *Cancer Res.* 61: 8425- 8440
66. Brusick, D., *Genetic Toxicology in Toxicology*, Academic Press, 1999, 127-149.
67. Shmid, W. The micronucleus Test for cytogenetic Analysis. 31-48
68. Krishna, G., Fiedler, R., Theiss, J. (1992) Simultaneous evaluation of clastogenicity, aneugenicity and toxicity in the mouse micronucleus assay using immunofluorescence. *Mut. Res.* 282: 159-167
69. Heddle, J. (1973) A Rapid in Vivo Test For Chromosomal Damage, *Mut. Res.* 18: 187-189
70. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257.
71. Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, Zhivotovsky B, Blagosklonny MV, Malorni W, Knight RA et al. 2005. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2: 1463-1467.
72. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR et al. 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 16: 3-11.
73. Kroemer G, Levine B. 2008. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 1004-1010. Kroemer G, Martin SJ. 2005. Caspase-Independent cell death. *Nat Med* 11: 725-730.

74. Heddle, J. A., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J. T., Newell, G., Salamone, M. (1983) The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mut. Res.* 123: 61-118.
75. Fadok VA, Bratton DL, Frasch SC, Warner ML, Henson PM. 1998. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ* 5: 551-562.
76. Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA et al. 1995. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376: 37- 43.
77. Mavournin, K., Blakey, D., Ciminom, M., Salamone, M., Heddle, J. (1990) The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mut. Res.* 239: 29-80
78. Sykiotis, G. P.; Papavassiliou, A. G. (2006) Apoptosis: the suicide solution in cancer treatment and chemoprevention. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 15: 575-577
79. Bignold, L. P. (2003) The mutator phenotype theory of carcinogenesis and the complex histopathology of tumors: Support for the theory from the independent occurrence of nuclear abnormality, loss of specialization and invasiveness among occasional neoplastic lesions. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 60: 883-891
80. Lorke, D. (1985) A New Approach to Practical Acute Toxicity Testing. *Arch Toxicol.* 54: 275-287
81. Dale, J. A.; Mosher, H. S. (1973) Nuclear magnetic resonance enantiomer reagents. Cofigurational correlations via nuclear magnetic resonance chemical shifts of diastereomeric mandelates, O-methylmandelate, and α -methoxy- α -trifluoromethylphenylacetate (MTPA) esters, *J. Am. Chem. Soc.*, 95, 512-519.

Anexos

Anexo 1: Absorbancias y cálculos de los fraccionamientos iniciales

A.1.1 Absorbancias del residuo del extracto metanólico

Figura A.1.1 Imagen de la bitácora de experimentación

<u>Software Versión</u>	2.00.18
Plate Number	Plate 4
Date	26/05/2015
Time	04:42:19 p.m.
Reader Type:	Synergy
Reader Serial Number:	264036
Reading Type	Reader
<u>Procedure Details</u>	
Plate Type	96 WELL PLATE
Read	Absorbance Endpoint
	Full Plate
	Wavelengths: 490
	Read Speed: Normal

Hoja del protocolo

Tabla A.1.1.1 Lectura de Absorbancias para el extracto metanólico y promedio del Blanco

	BLANCO		CONTROL +		1µg/ML	3µg/mL	10µg/mL	30µg/mL	100µg/mL
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	0.044	0.045	0.045	0.045	0.046	0.044	0.045	0.044	0.045
B	0.05	0.121	1.428	1.508	1.422	1.317	1.197	1.162	1.084
C	0.046	0.124	1.44	1.421	1.344	1.163	1.086	0.942	1.215
D	0.049	0.123	1.436	1.463	1.539	1.23	1.267	1.295	1.053
E	0.046	0.048	0.046	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.046
F	0.044	0.046	0.045	0.045	0.046	0.046	0.047	0.045	0.047
G	0.045	0.046	0.046	0.046	0.044	0.046	0.046	0.046	0.046
H	0.044	0.045	0.046	0.044	0.045	0.045	0.047	0.044	0.045
		0.122666667							

Tabla A.1.1.2. Resumen de absorbancias por concentración para el extracto metanólico

CONTROL	1.428	1.44	1.436
1 µg/mL	1.422	1.344	1.539
3 µg/mL	1.317	1.163	1.23
10 µg/mL	1.197	1.086	1.267
30 µg/mL	1.162	0.942	1.295
100 µg/mL	1.084	1.215	1.053

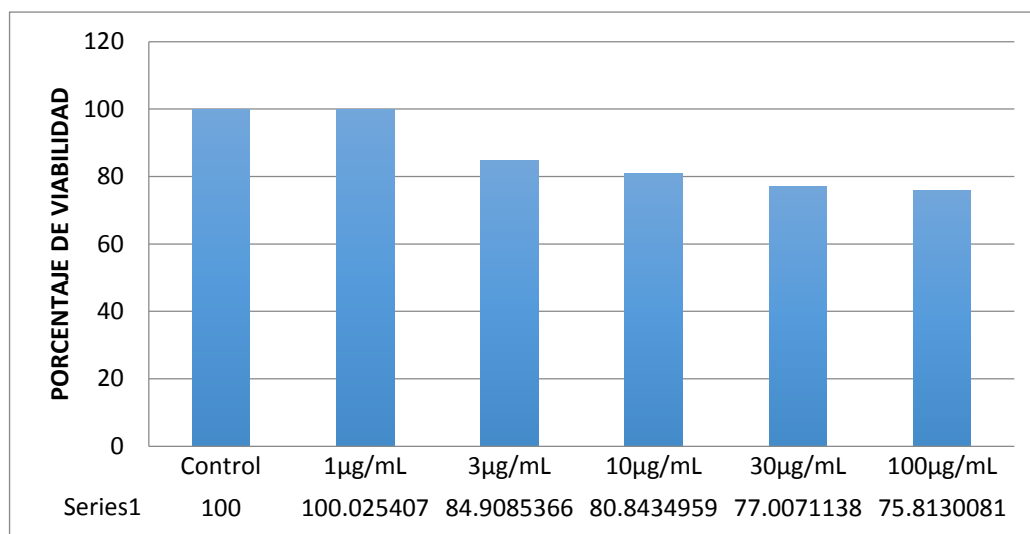
Tabla A.1.1.3. Diferencias de absorbancias menos el blanco y promedio total de controles positivos (PROM T)

DIF -					
BLANCO	1.305333	1.317333	1.313333	PROM	1.312
	1.299333	1.221333	1.416333		
	1.194333	1.040333	1.107333		
	1.074333	0.963333	1.144333		
	1.039333	0.819333	1.172333		
	0.961333	1.092333	0.930333		

Tabla A.1.1.4. Porcentajes de viabilidad

PORCENTAJES DE VIABILIDAD				PROM	DESV ST
Control	99.49186992	100.4065	100.101626	100	0.465709
1 µL	99.03455285	93.08943	107.9522358	100.025407	7.480781
3 µL	91.03150407	79.2937	84.4004065	84.9085366	5.885377
10 µL	81.8851626	73.4248	87.22052846	80.8434959	6.956605
30 µL	79.21747967	62.44919	89.3546748	77.0071138	13.58825
100 µL	73.27235772	83.25711	70.90955285	75.8130081	6.554139

Figura A.1.1.2 Gráfico de viabilidad celular por MTS para el residuo metanólico



A.1.2. Absorbancias del extracto de Hexano

Figura A.1.2.1. Imagen de la bitácora de experimentación

<u>Software Version</u>	2.00.18
Plate Number	Plate 1
Date	26/05/2015
Time	04:29:13 p.m.
Reader Type:	Synergy
Reader Serial Number:	264036
Reading Type	Reader
<u>Procedure Details</u>	
Plate Type	96 WELL PLATE
Read	Absorbance Endpoint
	Full Plate
	Wavelengths: 490
	Read Speed: Normal
<u>Results</u>	
Actual Temperature:	22

Hoja del protocolo

Tabla A.1.2.1 Lectura de Absorbancias para el extracto de hexano y promedio del Blanco

		BLANCO	CONTROL +	C -	1µg/mL	3µg/mL	10µg/mL	30µg/mL	100 µg/mL
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	0.045	0.044	0.045	0.044	0.044	0.044	0.044	0.045	0.045
B	0.046	0.122	1.681	1.506	1.669	1.352	1.328	1.321	1.466
C	0.045	0.12	1.505	2.357	2.592	1.344	1.3	1.45	1.232
D	0.045	0.125	1.606	1.64	1.663	1.342	1.424	1.42	1.542
E	0.045	0.044	0.045	0.045	0.044	0.046	0.045	0.048	0.047
F	0.044	0.044	0.044	0.045	0.045	0.045	0.044	0.045	0.044
G	0.044	0.045	0.044	0.045	0.043	0.044	0.044	0.044	0.045
H	0.044	0.044	0.046	0.045	0.045	0.045	0.044	0.044	0.044

Tabla A.1.2.2. Resumen de absorbancias por concentración para el extracto de hexano

CONTROL	1.681	1.505	1.606
1 µg/mL	1.669	1.592	1.663
3 µg/mL	1.352	1.344	1.342
10 µg/mL	1.328	1.3	1.424
30 µg/mL	1.321	1.45	1.42
100 µg/mL	1.466	1.232	1.542

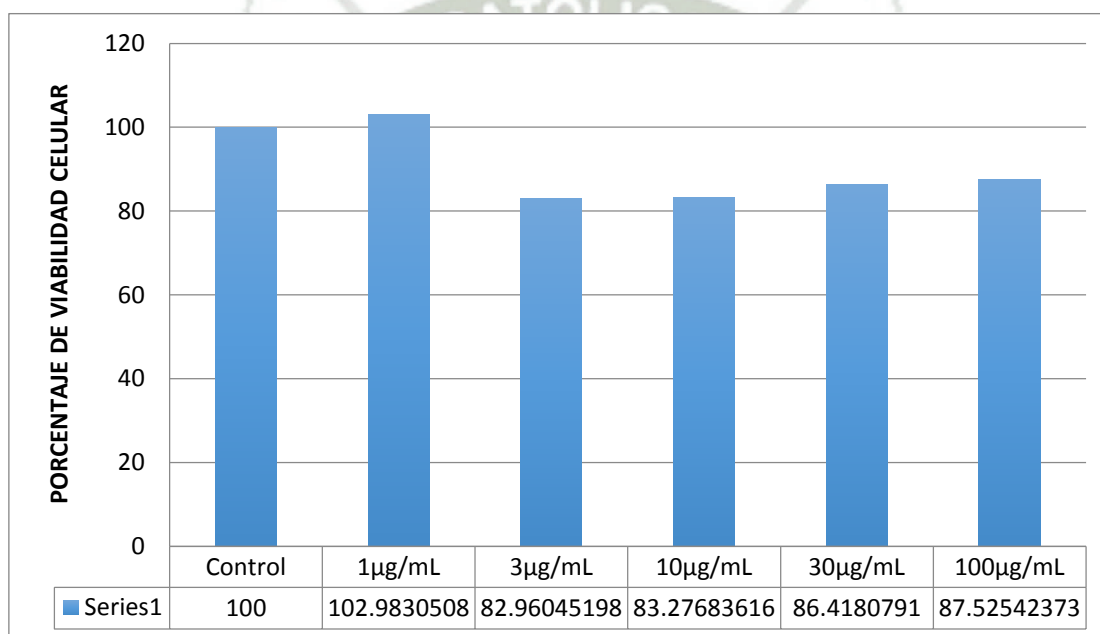
Tabla A.1.2.3. Diferencias de absorbancias menos el blanco y promedio total de controles positivos (PROM T)

Dif - BLANC	1.558667	1.382667	1.483667	PROM T	1.475
	1.546667	1.469667	1.540667		
	1.229667	1.221667	1.219667		
	1.205667	1.177667	1.301667		
	1.198667	1.327667	1.297667		
	1.343667	1.109667	1.419667		

Tabla A.1.2.4. Porcentajes de viabilidad celular

PORCENTAJES DE VIABILIDAD				PROM	DESV ST
Control	105.672316	93.74011	100.587571	100	5.987762
1 μ L	104.858757	99.63842	104.451977	102.983051	2.903669
3 μ L	83.3672316	82.82486	82.6892655	82.960452	0.358746
10 μ L	81.740113	79.84181	88.2485876	83.2768362	4.409039
30 μ L	81.2655367	90.0113	87.9774011	86.4180791	4.576648
100 μ L	91.0960452	75.23164	96.2485876	87.5254237	10.954

Figura A.1.2.2 Gráfico de viabilidad celular por MTS para el extracto de Hexano



A.1.3. Absorbancias del extracto de Acuoso

Figura A.1.3.1. Imagen de la bitácora de experimentación

Software Version	2.00.18
Plate Number	Plate 3
Date	26/05/2015
Time	04:39:08 p.m.
Reader Type:	Synergy
Reader Serial Number:	264036
Reading Type	Reader

Procedure Details

Plate Type	96 WELL PLATE
Read	Absorbance Endpoint
	Full Plate
	Wavelengths: 490
	Read Speed: Normal

Hoja del protocolo

Tabla A.1.3.1 Lectura de Absorbancias para el extracto acuoso y promedio del Blanco

		BLANCO	CONTROL +		1µg/ML	3µg/mL	10µg/mL	30µg/mL	100µg/mL
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	0.044	0.06	0.043	0.043	0.043	0.044	0.044	0.044	0.045
B	0.044	0.112	1.348	1.22	1.315	1.397	1.161	1.179	1.193
C	0.045	0.111	1.047	1.131	1.136	1.136	0.96	1.106	1.097
D	0.045	0.113	1.088	0.918	1.124	1.263	0.892	0.984	1.241
E	0.044	0.044	0.044	0.045	0.044	0.044	0.045	0.044	0.045
F	0.043	0.044	0.044	0.045	0.044	0.045	0.044	0.044	0.044
G	0.047	0.044	0.045	0.044	0.044	0.046	0.043	0.045	0.044
H	0.044	0.045	0.045	0.045	0.044	0.044	0.044	0.044	0.046
		0.112							

Tabla A.1.3.2. Resumen de absorbancias por concentración para el extracto acuoso

CONTROL	1.48	1.594	1.826
1 µg/mL	1.612	1.496	1.668
3 µg/mL	1.424	1.564	1.622
10 µg/mL	1.527	1.563	1.706
30 µg/mL	1.309	1.13	1.331
100 µg/mL	1.216	1.169	1.238

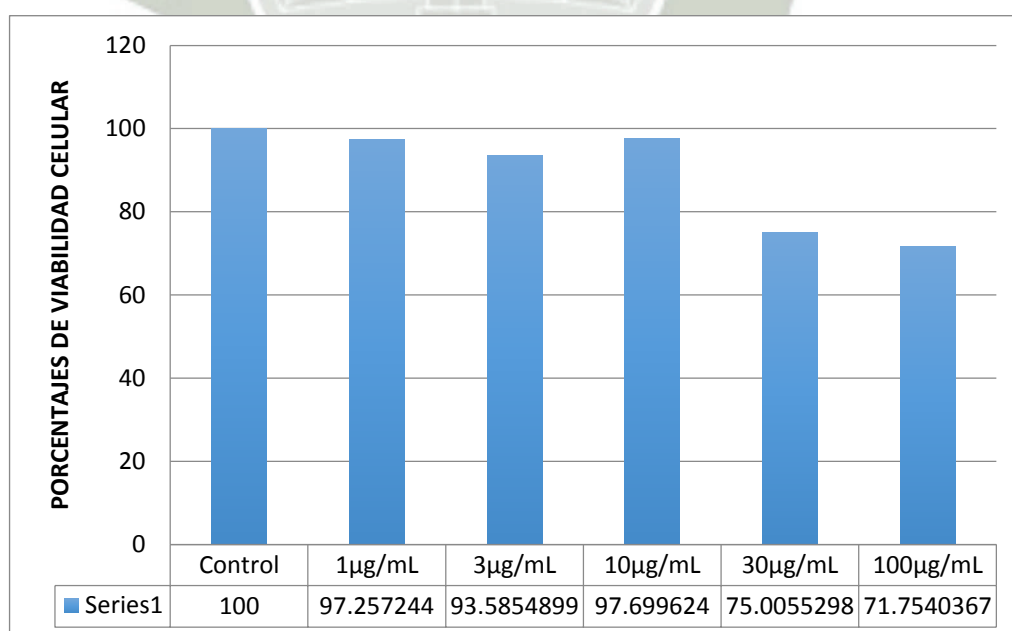
Tabla A.1.3.3. Diferencias de absorbancias menos el blanco y promedio total de controles positivos (PROM T)

Dif – BLANCO	1.353667	1.467667	1.699667	PROM T	1.507
	1.485667	1.369667	1.541667		
	1.297667	1.437667	1.495667		
	1.400667	1.436667	1.579667		
	1.182667	1.003667	1.204667		
	1.089667	1.042667	1.111667		

Tabla A.1.3.4. Porcentajes de viabilidad

PORCENTAJES DE VIABILIDAD				PROM	DESV ST
Control	89.8252599	97.38996	112.7847821	100	11.70018
1 µL	98.58438399	90.88697	102.300376	97.25724397	5.821291
3 µL	86.10926786	95.39925	99.24795399	93.58548994	6.754521
10 µL	92.94403893	95.33289	104.821942	97.69962398	6.282692
30 µL	78.47821278	66.60031	79.9380668	75.00552975	7.31564
100 µL	72.30701172	69.18823	73.76686574	71.75403672	2.338869

Figura A.1.3.2 Gráfico de viabilidad celular por MTS para el extracto acuoso



A.1.4. Absorbancias del extracto de Acuoso

Figura A.1.4.1. Imagen de la bitácora de experimentación

Software Version	2.00.18
Plate Number	Plate 2
Date	26/05/2015
Time	04:34:05 p.m.
Reader Type:	Synergy
Reader Serial Number:	264036
Reading Type	Reader
<u>Procedure Details</u>	
Plate Type	96 WELL PLATE
Read	Absorbance Endpoint
	Full Plate
	Wavelengths: 490
	Read Speed: Normal
<u>Result</u>	
Actual Temperature	22
Hoja del protocolo	

Tabla A.1.4.1 Lectura de Absorbancias para el extracto acuoso y promedio del Blanc

	BLANCO		CONTROL +	C -	1 µg/mL	3 µg/mL	10 µg/mL	30 µg/mL	100 µg/mL
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	0.047	0.044	0.044	0.044	0.044	0.045	0.045	0.045	0.045
B	0.049	0.118	1.456	1.484	1.157	0.924	0.536	0.21	0.321
C	0.052	0.12	1.29	1.424	0.919	0.944	0.478	0.184	0.302
D	0.046	0.116	1.144	1.412	0.82	0.924	0.461	0.193	0.287
E	0.049	0.046	0.047	0.047	0.045	0.045	0.047	0.044	0.046
F	0.045	0.044	0.047	0.046	0.047	0.046	0.044	0.046	0.045
G	0.045	0.045	0.045	0.048	0.051	0.045	0.046	0.045	0.046
H	0.046	0.046	0.048	0.046	0.052	0.05	0.045	0.046	0.047

Tabla A.1.4.2. Resumen de absorbancias por concentración para el extracto metanólico

CONTROL	1.456	1.29	1.144
1 µg/mL	1.157	0.919	0.82
3 µg/mL	0.924	0.944	0.924
10 µg/mL	0.536	0.478	0.461
30 µg/mL	0.21	0.184	0.193
100 µg/mL	0.321	0.302	0.287

Tabla A.1.4.3. Diferencias de absorbancias menos el blanco y promedio total de controles positivos (PROM T)

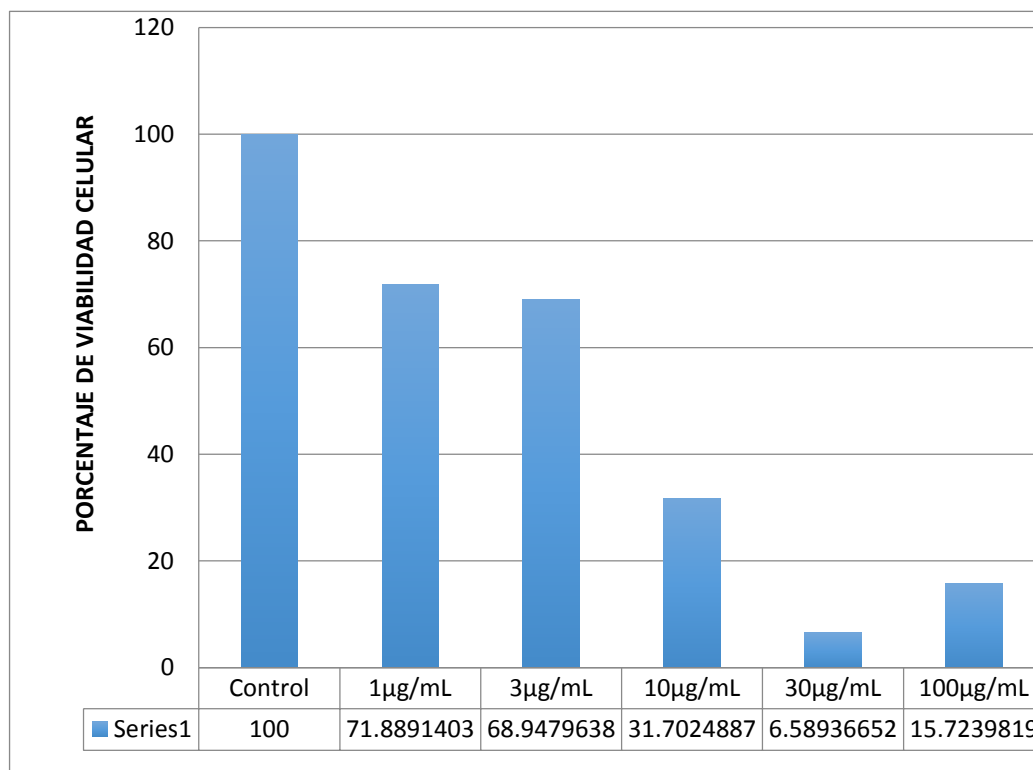
	PROM			
DIF - BL				T
	1.338	1.172	1.026	1.178667
	1.039	0.801	0.702	
	0.806	0.826	0.806	
	0.418	0.36	0.343	
	0.092	0.066	0.075	
	0.203	0.184	0.169	

Tabla A.1.4.4. Porcentajes de viabilidad celular

PORCENTAJES DE VIABILIDAD				PROM	DESV ST
Control	113.5181	99.43439	87.0475113	100	10.81397
1 µL	88.1504525	67.95814	59.5588235	71.8891403	11.99888
3 µL	68.3823529	70.07919	68.3823529	68.9479638	0.799895
10 µL	35.4638009	30.54299	29.1006787	31.7024887	2.724049
30 µL	7.80542986	5.599548	6.36312217	6.58936652	0.914647

100 μ L	17.2228507	15.61086	14.3382353	15.7239819	1.180353
-------------	------------	----------	------------	------------	----------

Figura A.1.4.2 Gráfico de viabilidad celular por MTS para el extracto metanólico



Anexo 2:

Absorbancias de las 36 fracciones resultantes luego del fraccionamiento por TLC AMBERLITE XAD-2

Anexo 2.1. Pool de fracciones de 1-4

Tabla A.2.1.1 Primera prueba para el pool 1-4

		BLANCO	CONTROL	30 µg/mL	10 µg/mL	3 µg/mL	1 µg/mL
B	0.044	0.119	0.947	0.821	0.91	0.715	0.446
C	0.052	0.127	1.166	0.981	0.832	0.756	0.459
D	0.048	0.121	1.046	0.905	0.811	0.738	0.499

Tabla A.2.1.2 Segunda Prueba para el pool 1-4

		BLANCO	CONTROL	30 µg/mL	10 µg/mL	3 µg/mL	1 µg/mL
B	0.044	0.123	1.189	1.015	1.078	0.865	0.547
C	0.073	0.15	1.152	0.968	0.928	0.929	0.51
D	0.065	0.134	1.174	1.018	0.91	0.751	0.518

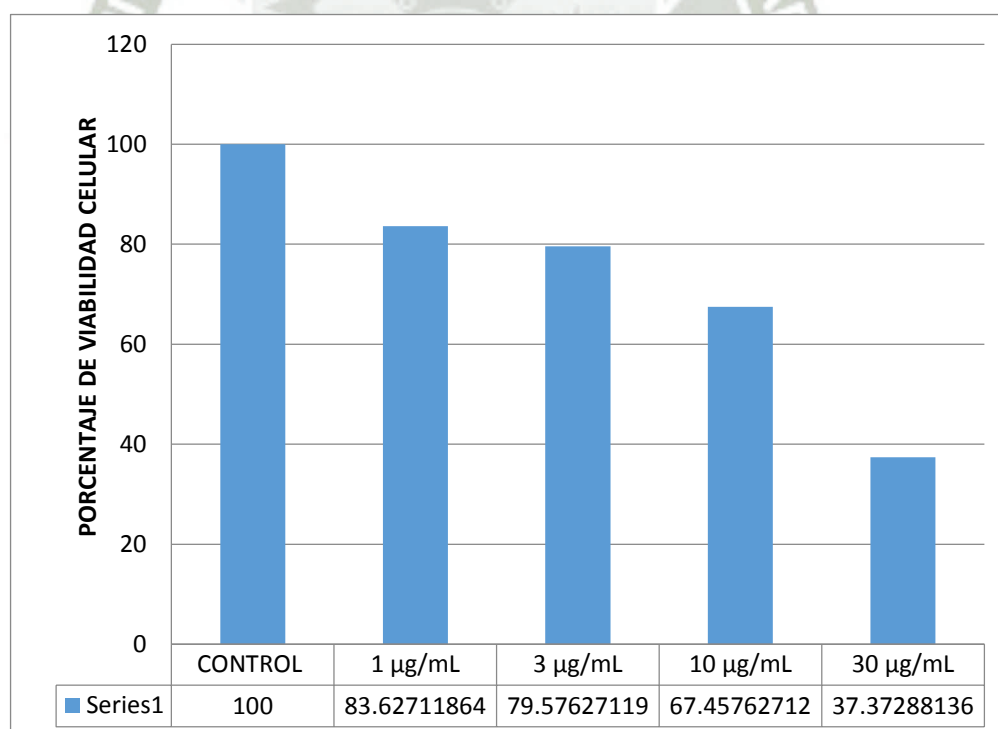
Tabla A.2.1.3 Cálculos para hallar el porcentaje de viabilidad celular del pool 1-4 y promedio del blanco

Dif - BL	0.818	0.692	0.781	0.586	0.317
	1.037	0.852	0.703	0.627	0.33
	0.917	0.776	0.682	0.609	0.37
	1.06	0.886	0.949	0.736	0.418
	1.023	0.839	0.799	0.8	0.381
	1.045	0.889	0.781	0.622	0.389
PROM	0.983333				
Blanco					

Tabla A.2.1.4 Porcentajes de viabilidad celular para el pool 1-4

PORCENTAJES DE VIABILIDAD					
	Control	1 µg/mL	3 µg/mL	10 µg/mL	30 µg/mL
Prueba 1	83.18644	70.37288	79.42373	59.59322	32.23729
Prueba 2	105.4576	86.64407	71.49153	63.76271	33.55932
Prueba 3	93.25424	78.91525	69.35593	61.9322	37.62712
Prueba 4	107.7966	90.10169	96.50847	74.84746	42.50847
Prueba 5	104.0339	85.32203	81.25424	81.35593	38.74576
Prueba 6	106.2712	90.40678	79.42373	63.25424	39.55932
PROM	100	83.62712	79.57627	67.45763	37.37288
DESV ST.	9.74037	7.716672	9.585198	8.619426	3.847644

Figura A.2.1. Gráfico de viabilidad Celular para las fracciones 1-4



Anexo 2.2. Pool de fracciones de 5-8

Tabla A.2.2.1 Primera prueba para el pool 5-8

		BLANCO	CONTROL	30 µg/mL	10 µg/mL	3 µg/mL	1 µg/mL
E	0.044	0.125	1.072	0.898	0.944	0.541	0.223
F	0.043	0.122	1.093	0.96	0.975	0.532	0.23
G	0.045	0.126	1.109	0.937	0.873	0.476	0.225

	BLANCO	CONTROL	30 µg/mL	10 µg/mL	3 µg/mL	1 µg/mL	
E	0.07	0.149	1.287	0.979	0.985	0.841	0.263
F	0.064	0.139	1.201	0.979	0.997	0.811	0.235
G	0.045	0.133	1.363	0.933	0.984	0.567	0.228

Tabla A.2.2.2 Primera prueba para el pool 5-8

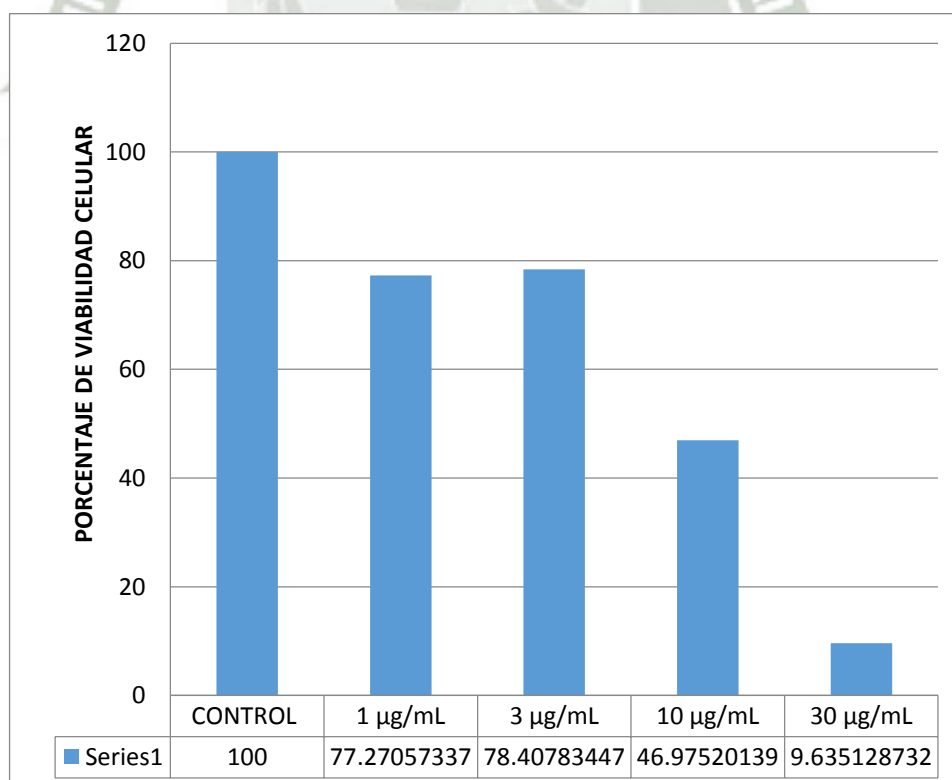
Tabla A.2.2.3 Cálculos para hallar el porcentaje de viabilidad celular del pool 5-8 y promedio del blanco

Dif - BL	0.939667	0.765667	0.811667	0.408667	0.090667
	0.960667	0.827667	0.842667	0.399667	0.097667
	0.976667	0.804667	0.740667	0.343667	0.092667
	1.154667	0.846667	0.852667	0.708667	0.130667
	1.068667	0.846667	0.864667	0.678667	0.102667
	1.230667	0.800667	0.851667	0.434667	0.095667
P. C+	1.055167				

Tabla A.2.2.4 Porcentajes de viabilidad para el pool 1-4

PORCENTAJES DE VIABILIDAD					
	Control	1 µg/mL	3 µg/mL	10 µg/mL	30 µg/mL
Prueba 1	89.05386	72.56358	76.92308	38.73006	8.592639
Prueba 2	91.04407	78.43943	79.861	37.87711	9.256042
Prueba 3	92.56042	76.25967	70.19428	32.56989	8.782183
Prueba 4	109.4298	80.24009	80.80872	67.16159	12.38351
Prueba 5	101.2794	80.24009	81.94598	64.31843	9.7299
Prueba 6	116.6324	75.88059	80.71395	41.19412	9.066498
PROM	100	77.27057	78.40783	46.9752	9.635129
DESV ST.	11.15858	2.970254	4.367597	14.83219	1.403134

Figura A.2.2. Gráfico de viabilidad Celular para las fracciones 5-8



Anexo 2.3. Pool de fracciones de 9-13

Tabla A.2.3.1 Primera prueba para el pool 9-13

	BLANCO	CONTROL	30 µg/mL	10 µg/mL	3 µg/mL	1 µg/mL
B	0.045	0.121	0.983	0.914	0.745	0.507
C	0.047	0.125	1.097	0.982	0.858	0.594
D	0.045	0.12	1.033	0.922	0.86	0.568

Tabla A.2.3.2 Primera prueba para el pool 9-13

	BLANCO	CONTROL	30 µg/mL	10 µg/mL	3 µg/mL	1 µg/mL
B	0.044	0.118	1.318	0.952	0.893	0.614
C	0.053	0.124	1.245	0.934	0.92	0.514
D	0.049	0.116	1.215	0.975	0.809	0.571

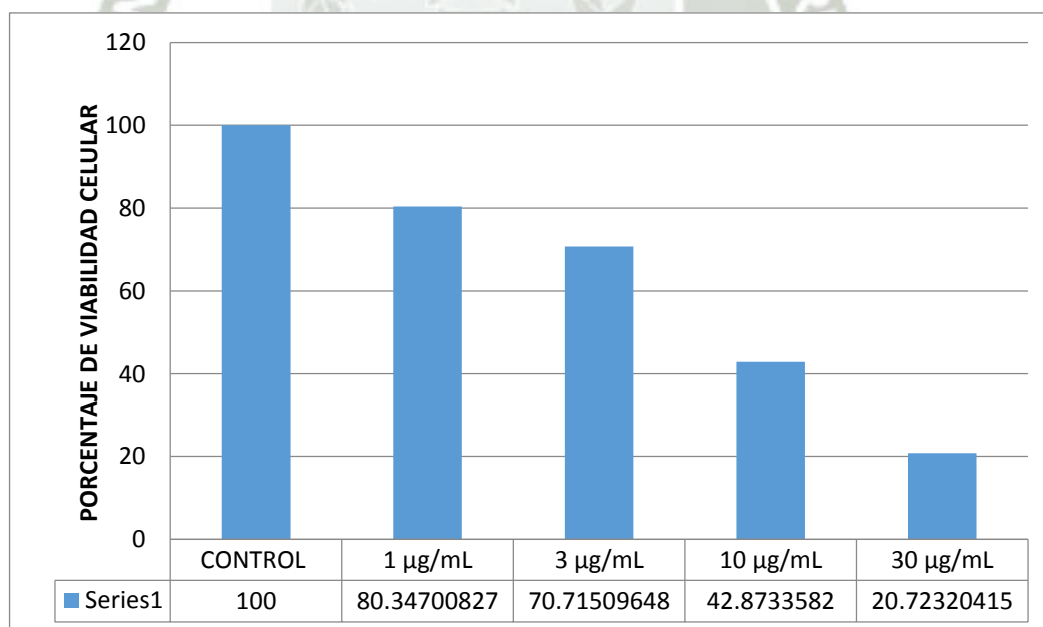
Tabla A.2.3.3 Cálculos para hallar el porcentaje de viabilidad celular del pool 9-13 y promedio del blanco

Dif - BL	0.862333	0.793333	0.624333	0.386333	0.176333
	0.976333	0.861333	0.737333	0.473333	0.188333
	0.912333	0.801333	0.739333	0.447333	0.251333
	1.197333	0.831333	0.772333	0.493333	0.227333
	1.124333	0.813333	0.799333	0.393333	0.208333
	1.094333	0.854333	0.688333	0.450333	0.226333
PROM					
BL	1.027833				

Tabla A.2.3.4 Porcentajes de viabilidad celular para el pool 9-13

PORCENTAJES DE VIABILIDAD					
	Control	1 µg/mL	3 µg/mL	10 µg/mL	30 µg/mL
Prueba 1	83.89817	77.18502	60.74266	37.58716	17.15583
Prueba 2	94.98946	83.80088	71.73666	46.05156	18.32333
Prueba 3	88.76277	77.96335	71.93125	43.52197	24.45273
Prueba 4	116.491	80.88211	75.14188	47.99741	22.11772
Prueba 5	109.3887	79.13086	77.76877	38.2682	20.26917
Prueba 6	106.4699	83.11983	66.96935	43.81385	22.02043
PROM	100	80.34701	70.7151	42.87336	20.7232
DESV ST.	12.74841	2.722613	6.08857	4.166856	2.691785

Figura A.2.3. Gráfico de viabilidad Celular para las fracciones 9-13



Anexo 2.4. Pool de fracciones de 14-20.

Tabla A.2.4.1. Primera prueba para el pool 14-20.

BLANCO CONTROL 30 µg/mL 10 µg/mL 3 µg/mL 1 µg/mL							
E	0.044	0.119	0.992	0.878	0.783	0.26	0.193
F	0.043	0.119	0.943	0.932	0.727	0.318	0.172
G	0.044	0.12	1.041	0.907	0.706	0.311	0.179

Tabla A.2.4.2. Primera prueba para el pool 14-20.

		BLANCO	CONTROL	30 µg/mL	10 µg/mL	3 µg/mL	1 µg/mL
E	0.045	0.115	1.228	0.971	0.838	0.39	0.197
F	0.044	0.115	1.406	0.966	0.894	0.397	0.172
G	0.044	0.116	1.338	1.01	0.854	0.382	0.195

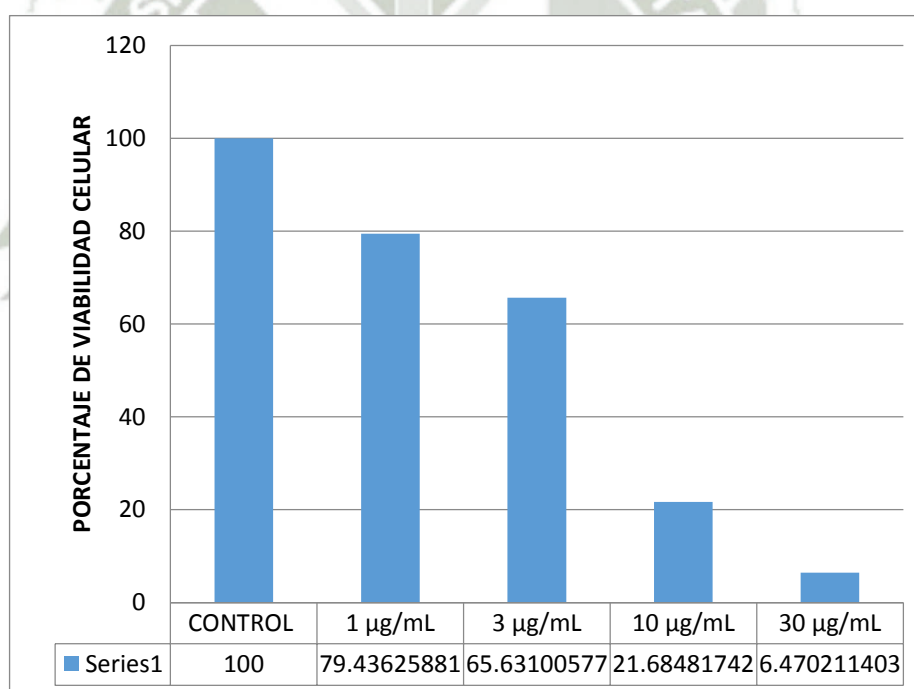
Tabla A.2.4.3 Cálculos para hallar el porcentaje de viabilidad del pool 14-20 y promedio del blanco.

Dif - BL	0.874667	0.760667	0.665667	0.142667	0.075667
	0.825667	0.814667	0.609667	0.200667	0.054667
	0.923667	0.789667	0.588667	0.193667	0.061667
	1.110667	0.853667	0.720667	0.272667	0.079667
	1.288667	0.848667	0.776667	0.279667	0.054667
	1.220667	0.892667	0.736667	0.264667	0.077667
PROM					
BL	1.040667				

Tabla A.2.4.4 Porcentajes de viabilidad celular para el pool 14-20.

PORCENTAJES DE VIABILIDAD					
	Control	1 $\mu\text{g/mL}$	3 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	30 $\mu\text{g/mL}$
Prueba 1	84.04869	73.09417	63.96541	13.70916	7.27098
Prueba 2	79.34017	78.28315	58.58424	19.28251	5.253043
Prueba 3	88.75721	75.88085	56.5663	18.60987	5.925689
Prueba 4	106.7265	82.03075	69.25048	26.20115	7.655349
Prueba 5	123.8309	81.55029	74.63165	26.8738	5.253043
Prueba 6	117.2966	85.77835	70.78796	25.43242	7.463165
PROM	100	73.16916	65.00885	22.08273	7.242878
DESV ST.	14.72982	4.733787	11.36379	4.137058	0.679213

Figura A.2.4. Gráfico de viabilidad Celular para las fracciones 14-20.



Anexo 2.5. Pool de fracciones de 21-26.

Tabla A.2.5.1 Primera prueba para el pool 21-26.}

		BLANCO	CONTROL	30 µg/mL	10 µg/mL	3 µg/mL	1 µg/mL
B	0.045	0.123	1.058	0.801	0.76	0.335	0.192
C	0.047	0.124	1.01	0.858	0.727	0.358	0.186
D	0.045	0.123	0.999	0.881	0.71	0.289	0.198

Tabla A.2.5.2. Primera prueba para el pool 21-26.

	BLANCO	CONTROL	30 µg/mL	10 µg/mL	3 µg/mL	1 µg/mL	
B	0.045	0.116	1.325	0.888	0.891	0.382	0.207
C	0.053	0.122	1.324	0.888	0.984	0.408	0.193
D	0.05	0.114	1.219	0.952	0.689	0.322	0.196

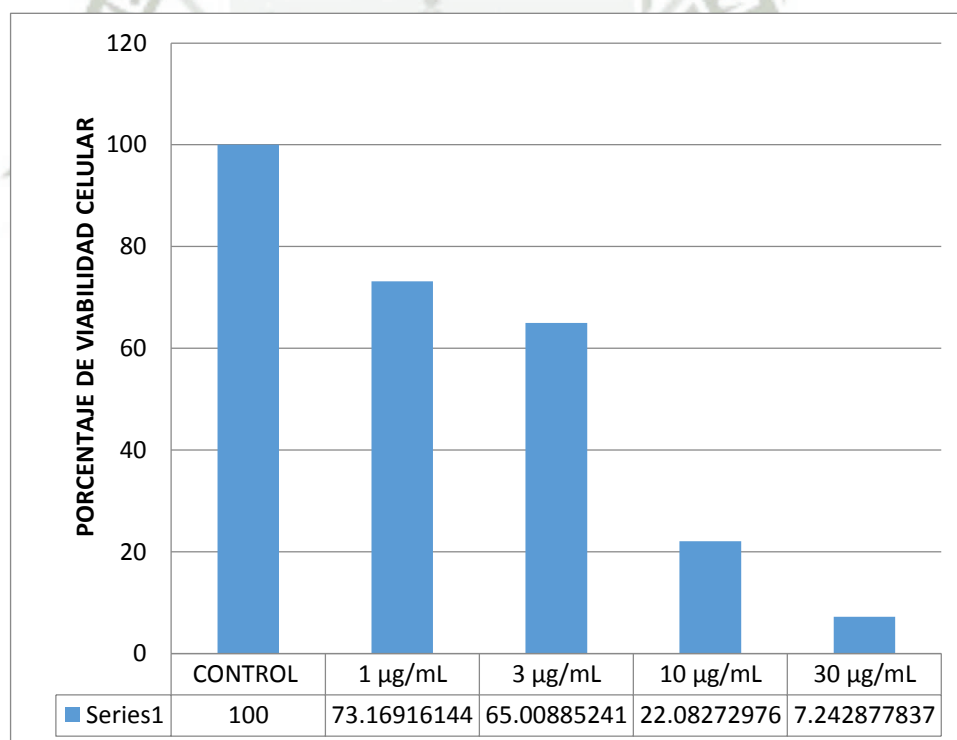
Tabla A.2.5.3 Cálculos para hallar el porcentaje de viabilidad del pool 21-26 y promedio del blanco.

Dif - BL	0.937667	0.680667	0.639667	0.214667	0.071667
	0.889667	0.737667	0.606667	0.237667	0.065667
	0.878667	0.760667	0.589667	0.168667	0.077667
	1.204667	0.767667	0.770667	0.261667	0.086667
	1.203667	0.767667	0.863667	0.287667	0.072667
	1.098667	0.831667	0.568667	0.201667	0.075667
P. C+	1.0355				

Tabla A.2.5.4 Porcentajes de viabilidad celular para el pool 21-26.

PORCENTAJES DE VIABILIDAD					
	Control	1 µg/mL	3 µg/mL	10 µg/mL	30 µg/mL
Prueba 1	90.55207	65.73314	61.7737	20.73073	6.920972
Prueba 2	85.91663	71.23773	58.58683	22.95188	6.341542
Prueba 3	84.85434	73.45888	56.94512	16.28843	7.500402
Prueba 4	116.3367	74.13488	74.42459	25.2696	8.369548
Prueba 5	116.2401	74.13488	83.40576	27.78046	7.017544
Prueba 6	106.1001	80.31547	54.91711	19.47529	7.307259
PROM	100	73.16916	65.00885	22.08273	7.242878
DESV ST.	14.72982	4.733787	11.36379	4.137058	0.679213

Figura A.2.5. Gráfico de viabilidad Celular para las fracciones 21-26.



Anexo 2.6. Pool de fracciones de 27-30.

Tabla A.2.5.1 Primera prueba para el pool 27-30.

BLANCO CONTROL 30 µg/mL 10 µg/mL 3 µg/mL 1 µg/mL							
E	0.045	0.121	0.947	0.941	0.712	0.356	0.195
F	0.045	0.122	1.143	0.954	0.75	0.335	0.181
G	0.044	0.121	1.057	0.917	0.742	0.328	0.185

Tabla A.2.6.2. Segunda prueba para el pool 27-30.

		BLANCO	CONTROL	30 µg/mL	10 µg/mL	3 µg/mL	1 µg/mL
E	0.045	0.118	1.079	0.944	0.635	0.295	0.186
F	0.044	0.118	1.284	1.074	0.896	0.374	0.219
G	0.044	0.116	1.271	1.009	0.94	0.413	0.197

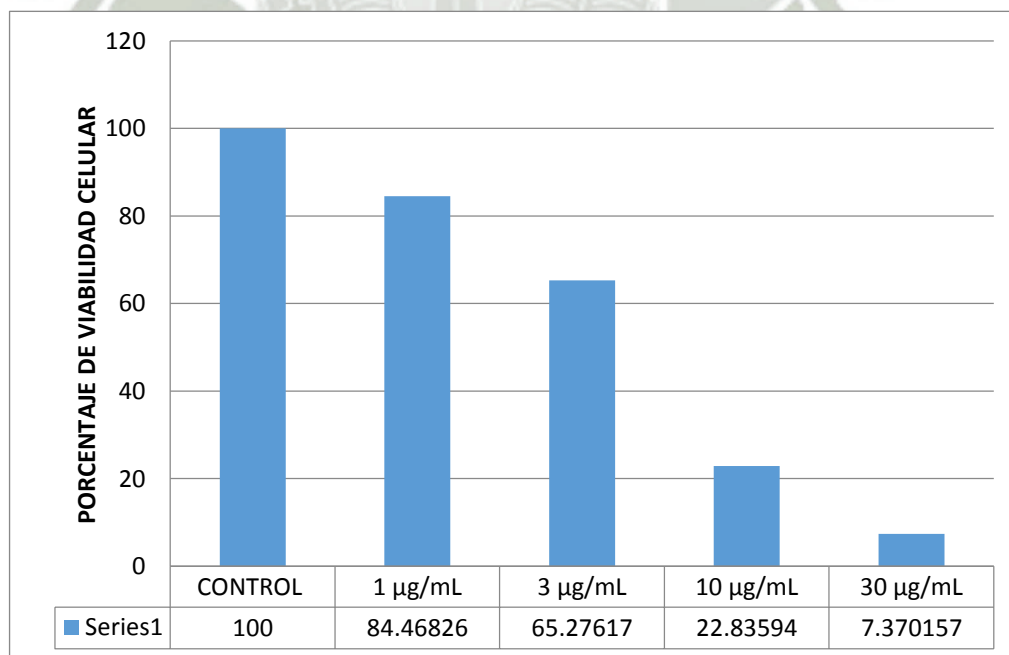
Tabla A.2.6.3 Cálculos para hallar el porcentaje de viabilidad celular del pool 27-30 y promedio

Dif - BL	0.827667	0.821667	0.592667	0.236667	0.075667
	1.023667	0.834667	0.630667	0.215667	0.061667
	0.937667	0.797667	0.622667	0.208667	0.065667
	0.959667	0.824667	0.515667	0.175667	0.066667
	1.164667	0.954667	0.776667	0.254667	0.099667
	1.151667	0.889667	0.820667	0.293667	0.077667
P. C+	1.010833				

Tabla A.2.6.4 Porcentajes de viabilidad celular para el pool 27-30.

PORCENTAJES DE VIABILIDAD					
	Control	1 µg/mL	3 µg/mL	10 µg/mL	30 µg/mL
Prueba 1	81.87964	81.28607	58.63149	23.41303	7.485573
Prueba 2	101.2696	82.57214	62.39077	21.33553	6.100577
Prueba 3	92.76175	78.91179	61.59934	20.64303	6.49629
Prueba 4	94.93817	81.58285	51.01401	17.3784	6.595218
Prueba 5	115.2185	94.44353	76.8343	25.19373	9.859852
Prueba 6	113.9324	88.01319	81.18714	29.05194	7.68343
PROM	100	84.46826	65.27617	22.83594	7.370157
DESV ST.	12.91269	5.74446	11.45561	4.034245	1.362795

Figura A.2.6. Gráfico de viabilidad Celular para las fracciones 27-30.



Anexo 2.7. Pool de fracciones de 31-36.

Tabla A.2.5.1 Primera prueba para el pool 31-36.

BLANCO CONTROL 30 µg/mL 10 µg/mL 3 µg/mL 1 µg/mL							
B	0.044	0.124	1.069	1.231	1.316	1.3	1.2311
C	0.047	0.126	1.181	1.178	1.291	1.257	1.238
D	0.045	0.124	1.042	1.209	1.1176	1.254	1.238

Tabla A.2.7.2. Segunda prueba para el pool 31-36.

BLANCO CONTROL 30 µg/mL 10 µg/mL 3 µg/mL 1 µg/mL							
E	0.046	0.137	1.217	1.231	1.316	1.3	1.231
F	0.044	0.133	1.23	1.178	1.29	1.257	1.238
G	0.044	0.13	1.222	1.209	1.176	1.254	1.228

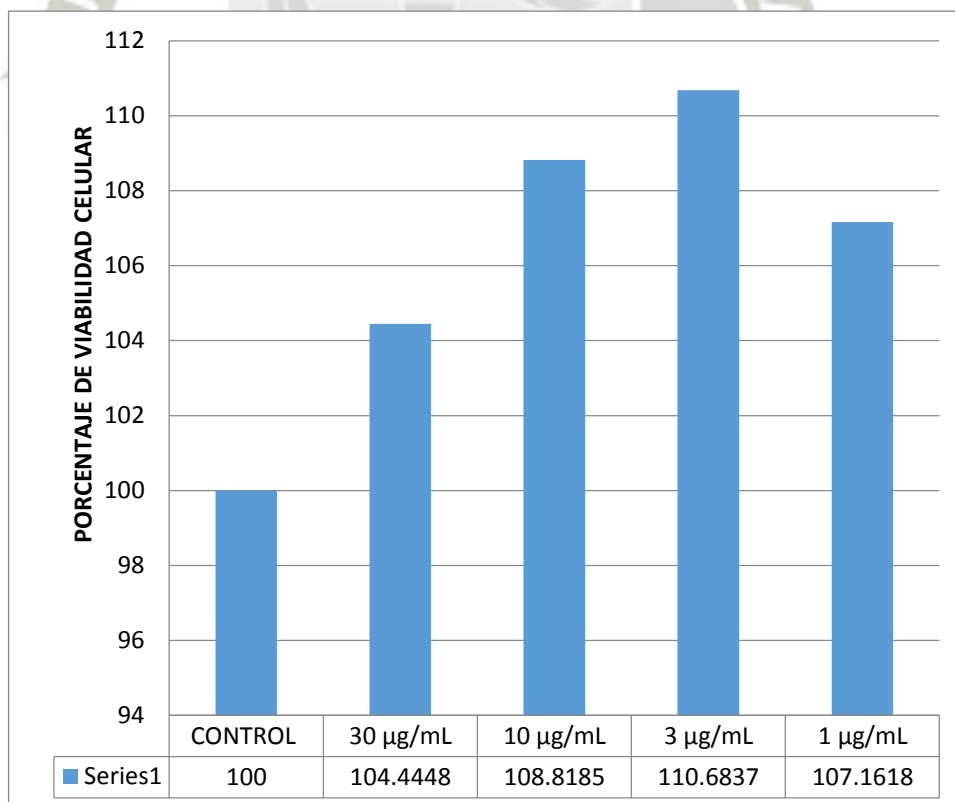
Tabla A.2.7.3 Cálculos para hallar el porcentaje de viabilidad celular del pool 31-36 y promedio

Dif - BL	0.94	1.102	1.187	1.171	1.1021
	1.052	1.049	1.162	1.128	1.109
	0.913	1.08	0.9886	1.125	1.109
	1.088	1.102	1.187	1.171	1.102
	1.101	1.049	1.161	1.128	1.109
	1.093	1.08	1.047	1.125	1.099
P. BL	1.031167				

Tabla A.2.7.4 Porcentajes de viabilidad para el pool 31-36.

PORCENTAJES DE VIABILIDAD					
	Control	1 µg/mL	3 µg/mL	10 µg/mL	30 µg/mL
Prueba 1	91.15888	106.8692	115.1123	113.5607	106.8789
Prueba 2	102.0204	101.7294	112.6879	109.3907	107.5481
Prueba 3	88.54049	104.7357	95.87199	109.0997	107.5481
Prueba 4	105.5116	106.8692	115.1123	113.5607	106.8692
Prueba 5	106.7723	101.7294	112.5909	109.3907	107.5481
Prueba 6	105.9964	104.7357	101.5355	109.0997	106.5783
PROM	100	104.4448	108.8185	110.6837	107.1618
DESV ST.	8.071751	2.309613	8.112737	2.23231	0.43674

Figura A.2.7. Gráfico de viabilidad Celular para las fracciones 31-36



Anexo 3: Absorbancias de las 11 fracciones resultantes luego del fraccionamiento por TLC PREPARATIVA (Preparative TLC).

Tabla A.3.1. Pruebas 1, 2,3 para la fracción 1 de la TLC preparativa.

	BLANCO	CONTROL	1 µg/mL	3 µg/mL	10 µg/mL	30 µg/mL
1	0.118	1.416	1.166	0.795	0.241	0.263
	0.12	1.149	0.981	0.679	0.207	0.268
	0.115	1.075	0.967	0.773	0.2	0.268
2	0.132	0.944	0.913	0.589	0.221	0.219
	0.128	0.959	0.747	0.529	0.194	0.226
	0.136	0.719	0.529	0.323	0.187	0.225
3	0.137	0.999	0.933	0.533	0.258	0.176
	0.143	1.129	0.9	0.61	0.237	0.176
	0.14	1.045	0.872	0.614	0.197	0.176

Tabla A.3.2. Pruebas 1, 2,3 para la fracción 2 de la TLC preparativa.

	30 µg/mL	10 µg/mL	3 µg/mL	1 µg/mL	CONTROL	BLANCO
P1 F2	0.421	0.762	1.068	0.998	1.184	0.116
	0.372	0.869	1.179	1.166	1.223	0.129
	0.328	0.79	1.016	1.035	0.946	0.116
P2	0.29	0.803	0.837	0.862	0.524	0.131
	0.24	0.543	0.791	0.824	0.443	0.119
	0.202	0.478	0.615	0.729	0.462	0.131
P3	0.552	0.905	1.115	1.115	1.057	0.141
	0.61	0.903	1.095	1.114	0.993	0.138
	0.536	0.84	0.988	1.034	1.029	0.14

Tabla A.3.3 Pruebas 1, 2,3 para la fracción 3 de la TLC preparativa.

	BLANCO	CONTROL	1 µg/mL	3 µg/mL	10 µg/mL	30 µg/mL
P1 F3	0.12	1.151	0.864	0.855	0.784	0.488
	0.122	1.174	0.84	0.883	0.814	0.505
	0.118	1.106	0.725	0.787	0.751	0.462
P2	0.132	0.817	0.539	0.705	0.638	0.392
	0.13	0.876	0.622	0.797	0.786	0.458
	0.128	0.835	0.496	0.698	0.61	0.433
P3	0.139	0.872	0.673	0.719	0.611	0.497
	0.146	1.084	0.685	0.806	0.753	0.476
	0.139	0.891	0.607	0.775	0.764	0.588

Tabla A.3.4 Pruebas 1, 2,3 para la fracción 4 de la TLC preparativa.

	30 µg/mL	10 µg/mL	3 µg/mL	1 µg/mL	CONTROL	BLANCO
P1 F4	1.164	1.176	1.242	1.242	0.922	0.123
	1.181	1.216	1.269	1.291	0.916	0.124
	1.143	1.21	1.072	1.21	1.053	0.125
P2	0.855	0.942	0.891	1.061	0.877	0.14
	0.694	0.934	0.78	0.988	0.971	0.141
	0.924	1.006	0.83	1.027	0.97	0.138
P3	0.938	1.2	1.063	1.16	1.027	0.134
	1.018	1.176	1.137	1.183	1.042	0.136
	1.028	1.018	0.909	1.011	0.806	0.136

Tabla A.3.5. Pruebas 1, 2,3 para la fracción 5 de la TLC preparativa.

	BLANCO	CONTROL	1 µg/mL	3 µg/mL	10 µg/mL	30 µg/mL
P1 F5	0.125	1.277	1.188	1.266	1.183	0.822
	0.125	1.193	1.18	1.372	1.145	0.833
	0.122	1.093	1.111	1.175	1.251	0.841
P2	0.131	1.17	1.012	1.02	1.059	0.932
	0.13	0.992	0.95	0.954	0.997	0.85
	0.124	0.996	1.064	1.065	0.944	0.876
P3	0.141	0.973	0.971	1.046	0.993	0.907
	0.15	1.068	1.068	1.077	1.022	0.911
	0.142	0.951	0.989	1.055	1.272	0.93

Tabla A.3.6. Pruebas 1, 2,3 para la fracción 6 de la TLC preparativa

	30 µg/mL	10 µg/mL	3 µg/mL	1 µg/mL	CONTROL	BLANCO
P1 F6	1.15	0.964	1.192	1.118	1.084	0.127
	1.143	0.827	1.261	1.204	1.094	0.127
	0.975	0.717	0.951	1.039	1.082	0.125
P2	0.98	1.004	1.01	0.613	1.105	0.136
	0.959	1.038	0.942	0.591	0.92	0.139
	0.982	1.033	0.939	0.668	0.921	0.133
P3	1.08	1.273	1.006	0.633	1.04	0.144
	0.977	1.059	1.012	0.699	0.896	0.145
	0.911	1.023	0.883	0.626	0.973	0.144

Tabla A.3.7. Pruebas 1, 2,3 para la fracción 7 de la TLC preparativa.

	BLANCO	CONTROL	1 µg/mL	3 µg/mL	10 µg/mL	30 µg/mL
P1 F7	0.117	1.101	0.611	0.688	0.768	0.975
	0.129	1.081	0.63	0.684	0.87	1.077
	0.119	1.03	0.662	0.882	0.975	1.058

P2	0.14	1.058	0.784	0.733	0.737	1.004
	0.14	0.972	0.641	0.693	0.781	0.742
	0.138	0.964	0.65	0.741	0.642	1.037

P3	0.143	1.053	0.724	0.584	0.626	0.666
	0.142	1.039	0.714	0.736	0.671	0.978
	0.141	0.919	0.638	0.652	0.894	0.89

Tabla A.3.8. Pruebas 1, 2,3 para la fracción 8 de la TLC preparativa.

	30 µg/mL	10 µg/mL	3 µg/mL	1 µg/mL	CONTROL	BLANCO
P1 F8	1.045	1.094	0.988	1.134	0.992	0.126
	0.977	1.026	1.025	1.131	0.989	0.13
	0.996	0.997	1.001	1.005	0.844	0.13

P2	0.14	1.058	0.784	0.733	0.737	1.004
	0.14	0.972	0.641	0.693	0.781	0.742
	0.138	0.964	0.65	0.741	0.642	1.037

P3	1.053	1.033	1.156	1.281	1.076	0.143
	1.076	1.107	1.074	1.075	1.107	0.139
	1.021	1.1	1.065	1.145	1.083	0.142

Tabla A.3.9. Pruebas 1, 2,3 para la fracción 9 de la TLC preparativa.

	BLANCO	CONTROL	1 µg/mL	3 µg/mL	10 µg/mL	30 µg/mL
P1 F9	0.121	1.332	1.228	0.79	0.914	1.135
	0.127	1.016	1.226	0.774	0.934	1.053
	0.117	0.949	1.202	0.717	0.834	1.005

P2	0.141	1.153	1.237	0.812	0.98	0.929
	0.139	0.96	1.045	0.822	0.916	1.08
	0.143	1.047	1.222	0.897	0.906	1.122
P3	0.148	1.074	1.174	0.765	0.854	1.015
	0.145	1.016	1.126	0.616	0.749	1.003
	0.144	0.969	1.078	0.602	0.695	1.01

Tabla A.3.10. Pruebas 1, 2,3 para la fracción 11 de la TLC preparativa.

		BLANCO	CONTROL	1 µg/mL	3 µg/mL	10 µg/mL	30 µg/mL
P1	F11	0.124	0.88	1.095	1.07	1.268	1.22
		0.13	0.968	1.171	1.202	1.188	1.215
		0.13	0.907	1.208	0.984	1.03	1.188
P2		0.147	0.941	1.027	1.156	1.153	0.996
		0.148	0.913	1.147	1.131	1.16	1.069
		0.15	0.963	1.109	1.084	1.22	0.954
P3		0.138	0.781	0.955	0.881	0.951	0.926
		0.138	0.754	0.874	0.821	0.858	0.794
		0.14	0.689	0.825	0.719	0.772	0.829

Tabla A.3.11. Pruebas 1, 2,3 para la fracción 10 de la TLC preparativa.

	30 µg/mL	10 µg/mL	3 µg/mL	1 µg/mL	CONTROL	BLANCO
P1 F 10	1.195	1.172	1.258	1.196	0.748	0.128
	1.159	1.249	1.272	1.276	1.104	0.128

1.079	1.125	1.226	1.19	0.932	0.13
-------	-------	-------	------	-------	------

P2	1.121	0.942	0.962	1.158	1.133	0.133
	1.136	0.744	1.042	1.101	1.008	0.134
	1.031	1.083	1.117	1.116	1.086	0.135

P3	0.978	1.018	1.145	1.127	1.072	0.147
	0.937	1.01	1.176	1.225	1.031	0.143
	0.991	1.026	1.026	1.084	0.892	0.141

Anexo 4: Resultados de las pruebas de luminiscencia a las caspasas -3/7

A.4.1. Luminiscencias medidoras de actividad de Caspasas -3/7.

Figura A.4.1. Imagen de la bitácora de experimentación.

Software Version	2.05.5
Experiment File Path:	
Protocol File Path:	
Plate Number	Plate 1
Date	30/06/2015
Time	
Reader Type:	Synergy HT
Reader Serial Number:	1405237
Reading Type	Reader

Procedure Details

Plate Type	Costar 96 flat bottom
Set Temperature	Setpoint 37°C
	Preheat before moving to next step
Read	Luminescence Endpoint
	Full Plate

Integration Time: 1.0 (SS.s)

Filter Set 1

Emission: Hole

Optics: Top, Gain: 135

Read Speed: Normal

Read Height: 1 mm

Hoja de protocolo

Tabla A.4.1 Primera prueba de Luminiscencia a las Caspasas a 3, 6, 12 y 24 horas de tratamiento.

PRUEBA 1			
	CONTROL -	LUMINESCENCIA	CONTROL +
3h	629	69059	116061
	602	79071	99699
		74065	107880
6h	941	138997	188302
	805	120508	143758
		129752.5	166030
12h A	903	142305	166886
	645	101760	112242
		122032.5	139564
12h B	885	173214	265866
	574	103440	123698
		138327	194782
24h A	567	114278	90124
	708	113392	79108
		113835	84616

24h B	527	128225	97469	0.760
	534	152673	85461	0.560
		140449	91465	0.651

Tabla A.4.2 Segunda y tercera prueba de Luminiscencia a las Caspasas a 3, 6,12 y 24 horas de tratamiento.

PRUEBA 2				
	CONTROL	LUMINESCENCIA		PROM
3h A	603	35330	53109	1.503
	533	38381	70903	1.847
		36855.5	62006	1.682
3h B	713	32387	48116	1.486
	556	35685	66555	1.865
		34036	57335.5	1.685
6h	725	49734	80476	1.618
	496	72484	84912	1.171
		61109	82694	1.353
12h A	748	57061	53117	0.931
	682	55012	52072	0.947
		56036.5	52594.5	0.939
12h B	559	58534	56773	0.970
	741	56858	54995	0.967
		57696	55884	0.969
24h A	559	85260	50289	0.590
	789	70959	39097	0.551
		78109.5	44693	0.572
24h B	628	100454	45423	0.452
	499	61768	36983	0.599
		81111	41203	0.508

Tabla A.4.3 Resumen del FOLD CHANGE entre las 3, 6, 12 y 24 horas

TIEMPO	PROM FOLD CHANGE	DESV EST.
3h	1.608	0.13101847
6h	1.316	0.05206519
12h	1.115	0.21548783
24h	0.619	0.10167091

Entiéndase FOLD CHANGE como la diferencia en veces que el promedio de absorbancias de luminiscencia supero al promedio del grupo control

Figura A.4.1 Grafico de barras correspondiente a la variación en el “Fold Change” sobre el grupo control

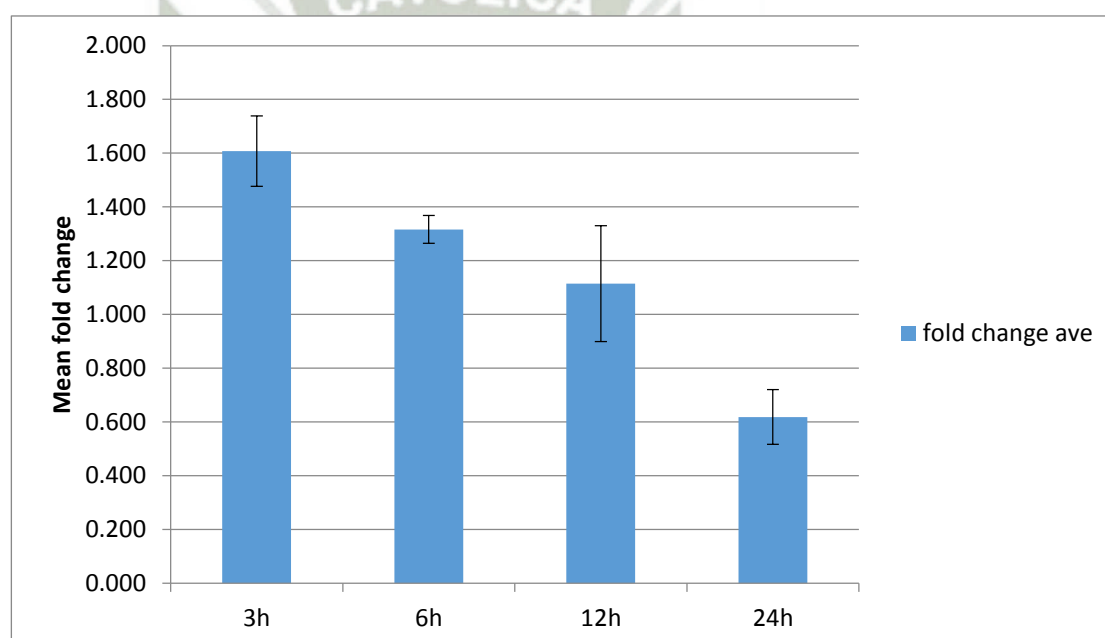
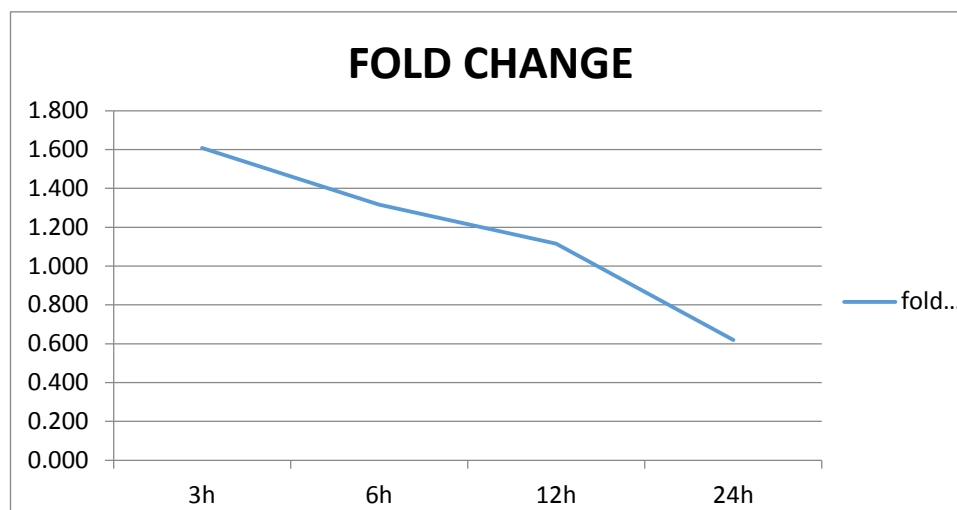


Figura A.4.2 Grafico lineal correspondiente a la variación en el “Fold Change” sobre el grupo control.



Lo que nos muestra este grafico es la variación de la actividad de las caspasas que en un principio fue de 1.60 de actividad y fue bajando dado a que no habían más caspasas en las células pues estas estaban siendo muertas por nuestro extracto los cual nos da un indicador fuerte de apoptosis.