

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



“EFECTO DEL 1-(3'-(1-(2-(4-MORFOLINIL) ETIL)1H-PIRAZOL -3-IL)-3-BIFENILIL) ETANONA-ANTAGONISTA LRH-1 SOBRE CELULAS ADENOCARCINOMAS ASCITIS METASTASICAS PANCREATICAS HUMANAS (ASPC-1)”

Tesis presentada por el Bachiller:
MENDIGURE FERNANDEZ, ANA MIRIAN

Para optar el título profesional de:
QUIMICO FARMACEUTICO

Asesor:
Q.F. KARIN VERA LOPEZ

AREQUIPA – PERÚ

2016



DEDICATORIA

Con todo mi amor a Dios por ser mi confidente y quién supo guiarme por el buen camino, dándome fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los obstáculos que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

A mis padres Juan y Jesusa que son mi motivación e inspiración, ya que supieron sentar en mi las bases de responsabilidad y deseos de superación, cuyos esfuerzos son infinitos y su amor invaluable.

A mis hermanos por creer en mí, por ser mi fuerza y recordarme siempre que rendirse no es parte de mí.



AGRADECIMIENTOS

De manera especial, agradecer a la Dra. Karin Vera López, por la dedicación, por el apoyo que ha brindado a este trabajo, por el respeto a mis sugerencias e ideas y por la dirección y el rigor que ha facilitado a las mismas. Gracias por la confianza que depositó en mí.

Un trabajo de investigación es siempre fruto de ideas, proyectos y esfuerzos previos que corresponden a otras personas. Al Dr. Alejandro Pino por la confianza y la oportunidad que me brindo, así como el material facilitado y las sugerencias recibidas. Mi agradecimiento a Devraj Kothari, por su orientación y atención a mis consultas sobre esta metodología.

Gracias a mis amigos, que siempre me han prestado un gran apoyo moral y humano, necesarios en los momentos difíciles de este trabajo y esta profesión.

ÍNDICE

GLOSARIO DE TERMINOS.....	1
RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	4
INTRODUCCIÓN.....	6
HIPÓTESIS.....	8
OBJETIVOS.....	9
CAPITULO I.....	10
MARCO TEÓRICO.....	10
1. CANCER DE PANCREAS.....	10
1.1. Epidemiología.....	11
1.2. Etiología y Patogénesis.....	12
1.2.1. Protooncogenes –Oncogenes.....	13
1.2.1.1. K-ras.....	14
1.2.1.2. Otros genes conocidos.....	14
1.2.1.3. Genes Supresores de Tumores.....	15
1.3. Factores de Riesgo.....	15
1.3.1. Factores Demográficos.....	15
1.3.1.1. Edad.....	16
1.3.1.2. Sexo.....	16
1.3.1.3. Origen Étnico.....	16
1.3.2. Factores Genéticos y Condiciones Médicas.....	17
1.3.2.1. Historia Familiar.....	17
1.3.2.2. Pancreatitis Hereditaria.....	18
1.3.2.3. La pancreatitis crónica.....	18
1.3.2.4. Cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis.....	19
1.3.2.5. La ataxia-telangiectasia.....	20
1.3.2.6. El síndrome de Peutz-Jeghers.....	20
1.3.2.7. Cáncer de mama Familiar.....	21
1.3.2.8. Mellitus diabética.....	21
1.3.2.9. Colectomía.....	22
1.3.3. Factores Ambientales y Estilo de Vida.....	22
1.3.3.1. Tabaquismo.....	22
1.3.3.2. Agentes cancerígenos ocupacionales.....	23
1.3.3.3. Dieta.....	24
1.4. Clínica.....	25
1.5. Estadificación.....	26
1.5.1. Tumor (T).....	26
1.5.2. Ganglio (N).....	27
1.5.3. Metástasis (M).....	27
1.5.4. Agrupación de los estadios del cáncer.....	28
1.6. Diagnóstico.....	29
1.6.1. Ultrasonografía (US).....	29
1.6.2. La tomografía computarizada helicoidal (CT).....	29
1.6.3. Colangiopancreatografía Retrógrada Endoscópica (ERCP).....	30
1.6.4. Imagen por Resonancia Magnética (MRI).....	30
1.6.5. La ecografía endoscópica (EUS).....	31
1.6.6. La tomografía por emisión de positrones (PET).....	31
1.7. Terapia o Tratamiento.....	32
1.7.1. Intervención Quirúrgica.....	32
1.7.1.1. Tumores resecables.....	32
1.7.1.2. Tumores resecables de limite.....	33
1.7.1.3. Los tumores no resecables.....	33
1.7.2. Quimioterapia.....	34
1.7.3. Radioterapia.....	35
1.7.3.1. Rayos X-Knife.....	35
1.7.3.2. Radioterapia conformacional en tres dimensiones.....	35
1.7.3.3. Radioterapia de intensidad modulada.....	36

1.7.3.4. Radioterapia de Precisión.....	36
1.7.3.5. Inconvenientes de la Radioterapia	36
1.7.4. Otras terapias	37
1.7.4.1. Terapia de intervención.....	37
1.7.4.1.1. La terapia transvascular	37
1.7.4.1.2. Terapia de punción percutánea.....	37
1.7.4.1.3. Inconvenientes de la terapia de intervención	38
1.7.4.2. Inmunoterapia	38
1.7.4.2.1. Citoquina inmunoterapia	38
1.7.4.2.2. Inconvenientes de la Inmunoterapia	39
2. RECEPTOR LRH-1	39
3. ANTAGONISTA DEL RECEPTOR LRH-1	40
4. CULTIVO CELULAR	41
4.1. Fundamento.....	41
4.1.1. Cultivos Primarios	42
4.1.2. Línea Celular.....	43
4.1.3. Cepas Celulares.....	43
4.1.4. Pasaje	43
4.2. Células ASPC-1	43
5. MUERTE CELULAR	44
6. APOPTOSIS	44
6.1. La vía extrínseca	46
6.2. La vía intrínseca	46
7. ENSAYOS EN LÍNEAS CELULARES	48
7.1. Ensayo de Viabilidad	48
7.2. Caspasas.....	49
7.3. Lactato Deshidrogenasa	49
CAPITULO II	51
MATERIALES Y MÉTODOS	51
1. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS	51
1.1. Material Biológico	51
1.2. Equipos	53
1.3. Reactivos.....	54
2. MÉTODOS	55
2.1. Soluciones a distintas concentraciones del Antagonista LRH-1.....	55
2.2. Cultivo celular.....	57
2.2.1. Preparación del Medio	57
2.2.2. Obtención del primer pasaje celular	58
2.3. Método de exclusión celular	58
2.3.1. Obtención de la suspensión de células.....	58
2.3.2. Cambio de Medio.....	59
2.3.3. Ensayo de Exclusión celular	59
2.4. Diseño Experimental.....	59
2.4.1. Viabilidad Celular frente al tratamiento	59
2.4.2. Determinación de la actividad de Caspasas-3/7	61
2.4.3. Determinación de la citotoxicidad	61
2.5. Métodos estadísticos	62
CAPITULO III	63
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
1. Cultivo Celular.....	63
2. Exclusión celular y porcentaje de células viables en la suspensión celular	65
3. Análisis de la Determinación de la Viabilidad Celular frente al tratamiento	66
4. Análisis de la Determinación de la Activación de Caspasas	75
5. Análisis de la Determinación de la Citotoxicidad	79
CONCLUSIONES	82
SUGERENCIAS	83
BIBLIOGRAFÍA	84
ANEXOS	93

GLOSARIO DE TERMINOS

- **LRH-1** : Receptor del Hígado Homólogo-1
- **ASPC-1** : Células adenocarcinomas ascitis metastasicas pancreáticas humanas
- **LDH** : Lactato Deshidrogenasa
- **ADN** : Ácido Desoxirribonucleico
- **RPMI** : Roswell Park Memorial Institute Medium
- **MTS** : [3-(4,5-dimetil-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio
- **AFP** : Alfafetoproteína
- **PJS** : Síndrome de Peutz-Jeghers
- **TPMI** : Tumor papilar mucinoso intraductal
- **RR** : Riesgo relativo
- **IC** : Intervalo de confianza
- **US** : Ultrasonografía
- **CT** : Tomografía computarizada
- **MDCT** : Multi-detector de tomografía computarizada
- **ERCP** : Colangiopancreatografía Retrógrada Endoscópica
- **MR** : Resonancia Magnética
- **MRI** : Imagen por Resonancia Magnética
- **EUS** : Ecografía endoscópica
- **PET** : Tomografía por emisión de positrones
- **FDG** : Fluorodeoxiglucosa
- **mRNA** : Ácido ribonucleico mensajero
- **CEA** : Antígeno carcinoembrionario
- **NADH** : Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
- **TNF** : Factor de necrosis tumoral
- **IAP** : Proteínas inhibidoras de la apoptosis
- **Apaf-1** : Proteína factor 1 activador de la proteasa apoptótica
- **PES** : Etosulfato de fenazina
- **EDTA** : Ácido etilendiaminotetraacético
- **DMSO** : Dimetil sulfoxido
- **PBS** : Buffer fosfato salino
- **FBS** : Suero bobino fetal
- **CB** : Cabina de bioseguridad
- **CRCD** : Cámara de recuento celular desechable
- **RR** : Riesgo relativo



RESUMEN

Con una mortalidad extremadamente alta, el cáncer de páncreas (CP) es una de las enfermedades más devastadoras a menudo con un mal pronóstico, incluso cuando se diagnostica temprano. Un incremento de la resistencia a las quimioterapias actuales en el adenocarcinoma pancreático justifica la necesidad de tratamientos más eficaces.

Los estudios han demostrado que el receptor homólogo-1 del hígado (LRH-1) es una proteína sobreexpresada en múltiples casos de cánceres gastrointestinales, tales como el adenocarcinoma de páncreas. La sobreexpresión del LRH-1 hace que sea un objetivo ideal para el fármaco y se dé su inhibición. Con el fin de inhibir efectivamente el receptor, la investigación y desarrollo de medicamentos debe ser enfocado al diseño apropiado de un antagonista LRH-1 como un nuevo tratamiento específico para el cáncer de páncreas.

Con los tratamientos bajo las diferentes concentraciones de la droga, el Antagonista LRH-1 utilizado en este estudio mostró que el fármaco tenía la capacidad de alterar la viabilidad celular en el adenocarcinoma de páncreas. La reducción de la viabilidad

celular es apoyada por la estadística de significancia, el cual indicó una diferencia significativa en la viabilidad entre el control y los grupos de tratamiento ($p < 0.05$).

Este experimento se centró en la comprensión de la viabilidad de las células ASPC-1 a las 24 horas tras ser expuestas al Antagonista LRH-1 en las siguientes concentraciones: 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1.5, 3, 5, 10, 20, 30, 40 y 100 μM . Para determinar los efectos sobre la viabilidad celular, se realizó un ensayo de proliferación celular MTS. Esta tesis tiene como objetivo explorar la relación entre las diferentes concentraciones del antagonista LRH-1 y su papel en las células ASPC-1 del CP.

Para establecer un perfil adecuado del medicamento, es importante entender los efectos bioquímicos y fisiológicos de la droga. La cantidad de actividad de las caspasas y la citotoxicidad celular se midieron para evaluar los niveles de citotoxicidad y el daño de la membrana celular influenciado por la droga.

En este experimento, el Antagonista LRH-1 puede ser un componente importante responsable de la activación de las caspasas y aún más de la inactivación o activación del sustrato. Estas acciones promueven una cascada de eventos dentro de la célula que finalmente resulta de la demolición controlada de los componentes celulares.

El ensayo Caspase-3/7 luminescence kit se utilizó para ayudar a detectar y cuantificar el nivel de destrucción celular.

LDH es una enzima bastante estable. Se utiliza comúnmente para determinar la presencia de tejido o daño celular y la toxicidad. En el estudio, las células pueden someterse a la necrosis, en el que pierden integridad de la membrana y mueren como resultado de la lisis celular. Sin embargo, los resultados revelaron que el Antagonista LRH-1 no induce a la citotoxicidad o necrosis.



ABSTRACT

With an extremely high mortality, pancreatic cancer (PC) is one of the most devastating malignancies often with a poor prognosis, even when diagnosed early. An increasing resistance to current chemotherapies in pancreatic adenocarcinoma warrants the need for more effective treatments.

Studies have shown that liver receptor homolog-1 (LRH-1) is a protein which is overexpressed in multiple cases of gastrointestinal cancers, such as pancreatic adenocarcinomas. The overexpression of LRH-1 makes it an ideal drug target for inhibition. In order to effectively inhibit the receptor, drug research and development should be dedicated to designing an appropriate antagonist for LRH-1 as a new specific therapy for pancreatic cancer.

With treatments under difference concentrations of the drug, the LRH-1 Antagonist in this study showed that the drug had the ability to disrupt cell viability of pancreatic adenocarcinomas. The reduction in cell viability is supported by statistical significance, which indicated there was significant difference in viability between control and treatment groups ($p < 0.05$).

This experiment was focused on understanding the viability of ASPC-1 cells at 24 hours after exposure to LRH-1 Antagonist at the following concentrations: 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1.5, 3, 5, 10, 20, 30, 40 and 100 μM . To determine the effects on cell viability, an MTS cell proliferation assay was performed. This thesis aims to explore the relationship between different concentrations of LRH-1 Antagonist and its role in ASPC-1 cells PC.

To establish a proper drug profile, it is important to understand both the biochemical and physiological effects of the drug. The amount of Caspase activity and cell cytotoxicity were measured to assess the level of cytotoxic and cell membrane damage influenced by the drug.

In this experiment, the LRH-1 Antagonist may be a major component responsible for the activation of caspases and further inactivation or activation of substrate. These actions promote a cascade of events within the cell which ultimately results in controlled demolition of cellular components. A Caspase-3/7 luminescence assay kit was utilized to help detect and quantify the level of cellular destruction.

LDH is a fairly stable enzyme. It is commonly used to determine the presence of tissue or cell damage and toxicity. In the study, the cells may undergo necrosis, in which they lose membrane integrity and die rapidly as a result of cell lysis. However, the results revealed that LRH-1 Antagonist does not induce cytotoxicity or necrosis.





INTRODUCCIÓN

El cáncer de páncreas es una de las neoplasias humanas más letales, el 40% de los pacientes tienen enfermedad metastásica y otros 40% se encuentran en etapas avanzadas. El 20% restante de los pacientes están indicados para una cirugía en base a un estudio de imagen preoperatoria, logrando una supervivencia de 5 años del 6% de los pacientes sometidos a una intervención quirúrgica.^{1, 2}

Es la segunda neoplasia más común con tumores gastrointestinales y la cuarta causa principal de muertes relacionadas con el cáncer en hombres y mujeres de todos los grupos de edad en los países desarrollados. A pesar de los avances en los tratamientos multimodales, la tasa de incidencia de cáncer de páncreas todavía se aproxima a su tasa de mortalidad.²

En el 2014, la incidencia de cáncer de páncreas se estimó en 46 420 casos con más de 38 000 muertes.^{2, 3} La resección quirúrgica es la única opción potencialmente curativa para los tumores en el cáncer de páncreas. Desafortunadamente, menos del 20% son elegibles y de esos, 30 a 50% se encontró que no pueden ser extraídos intraoperatoriamente.⁴ El fracaso local sigue siendo un componente importante de

progresión de la enfermedad, que a menudo puede conducir a síntomas del dolor, obstrucción y otras morbilidades que pueden disminuir considerablemente la calidad de vida de los pacientes. En una reciente serie de autopsias, se mostró que el 30% de los paciente con cáncer de páncreas murió con enfermedad localmente destructiva y sólo una mínima con una enfermedad sistémica.⁵

Estudios previos determinaron que el factor desencadenante del cáncer pancreático, se trataría de un receptor huérfano nuclear denominado receptor homólogo del hígado 1 (LRH-1) o receptor nuclear de la subfamilia 5 grupo A miembro 2 (NR5A2) cuya función es compartida entre la embriogénesis pancreática y oncogénica.⁶

El receptor LRH-1 se encuentra sobre alterado en el cáncer pancreático, provocando de esta manera su sobreexpresión y la inmediata proliferación celular, esta sobreexpresión está asociada al incremento de ciertas proteínas como las cíclicas D1 y E1, las cuales son partícipes en la división celular.⁷

De acuerdo a esta problemática, el presente trabajo busca establecer el efecto *in vitro* del 1-(3'-(1-(2-(4-morfolinil)etil)1H-pirazol-3-il)-3-bifenilil)etanona, usualmente llamado “Antagonista LRH-1” sobre células adenocarcinomas ascitis metástasis pancreáticas humanas ASPC-1. Los datos obtenidos serán de gran ayuda para el futuro establecimiento de políticas y valores de referencia a un tratamiento opcional pudiendo ser una alternativa terapéutica a futuro.



HIPÓTESIS

Se conoce que existen antecedentes investigativos que indican que la sobreexpresión del receptor LRH-1 es un factor desencadenante del cáncer pancreático, es probable que el efecto del Antagonista LRH-1 pueda inhibir la viabilidad de las células ASPC-1 presentes en el cáncer pancreático pudiendo ser una alternativa de tratamiento a futuro.

OBJETIVOS

1. Corroborar el efecto del 1-(3'-(1-(2-(4-morfolinil)etil)1h-pirazol-3il)-3bifenilil) etanona-Antagonista LRH-1 sobre células adenocarcinomas ascitis metastásicas pancreáticas humanas ASPC-1.
2. Determinar la viabilidad de las células ASPC-1 frente a diferentes concentraciones del Antagonista LRH-1.
3. Determinar la activación de apoptosis de las células ASPC-1 en presencia del Antagonista LRH-1.
4. Determinar la citotoxicidad de las células ASPC-1 en presencia del Antagonista LRH-1.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1. CÁNCER DE PÁNCREAS

El cáncer de páncreas es una enfermedad en la cual se da la aparición de células anómalas en los tejidos del páncreas, órgano que está situado detrás del estómago, cuya función es producir enzimas digestivas e insulina.⁸ El páncreas está compuesto de dos tipos diferentes de tejido, con funciones distintas: el páncreas exocrino (que segrega enzimas al tubo digestivo que contribuyen a descomponer las grasas y proteínas) y el páncreas endocrino (que segrega glucagón e insulina al flujo sanguíneo para controlar las concentraciones de azúcar en la sangre).⁹

En más del 80% de los casos, el cáncer de páncreas aparece en el páncreas exocrino siendo el más habitual y conocido como adenocarcinoma del páncreas. Alrededor del 75% de todos los cánceres del páncreas exocrino ocurren en la cabeza o el cuello del páncreas, 15 al 20% en el cuerpo y 5 al 10% en la cola del páncreas. Por lo tanto, casi

todos los estudios epidemiológicos de cáncer de páncreas se refieren en general a neoplasias de tipo exocrino.^{9, 10}

El cáncer de páncreas aparece como la cuarta causa principal de muerte en relación al cáncer. Sin embargo, su pronóstico no se ha mejorado en los últimos 40 años, es decir continúa teniendo un pronóstico ominoso en el momento de su diagnóstico, ya que la incidencia de cáncer de páncreas ha ido en aumento, posiblemente debido a la prevalencia de la obesidad, envejecimiento de la población, y otros factores de mortalidad desconocidos.¹¹

El aumento de la incidencia del cáncer pancreático se debe también en parte a la mayor supervivencia reportada de la población en las últimas décadas, ya que el cáncer de páncreas es una enfermedad de los adultos mayores y de los hábitos de sedentarismo, pero también gracias a la mayor detección por las nuevas técnicas de diagnóstico. En la mayoría de pacientes el diagnóstico se efectúa en fases tardías de su evolución, por lo que el cáncer de páncreas representa un problema diagnóstico y terapéutico. Por consiguiente, las resecciones en los estadios tempranos como opciones terapéuticas resultan muy limitadas siendo menos del 20% de los pacientes candidatos a una resección tumoral curativa, por ello es imprescindible el tratar de detectar estas neoplasias en un estadio inicial.^{9, 10, 12}

1.1. Epidemiología

La incidencia de cáncer de páncreas ha mostrado un incremento gradual desde 1930 hasta 2010, periodo a partir del cual se ha afianzado. No obstante, la incidencia por sexo, se observa una estabilización en varones, mientras que en mujeres se aprecia un aumento de la incidencia en los últimos 35 años.² Sin embargo, el cáncer de páncreas sigue presentando una incidencia mayor en varones que en mujeres, con una proporción 1.3/1.¹³

El cáncer de páncreas es poco habitual en personas menores a 45 años, su incidencia se incrementa paulatinamente a partir de esta edad.¹⁴ Las neoplasias pancreáticas son

los tumores que presentan la tasa de supervivencia global más baja a los 5 años.⁷ República Checa tuvo la tasa más alta de cáncer de páncreas en 2012, seguido por Eslovaquia y Armenia. Alrededor del 55% de los casos de cáncer de páncreas se produjo en los países más desarrollados.¹⁵

En 2015, se estimó que habría 367 411 nuevos casos y 359 335 muertes a nivel del mundo. El cáncer de páncreas equivale al 4% de todas las muertes por cáncer, siendo además el tipo más agresivo, 80% de los pacientes han avanzado localmente a un cáncer pancreático metastásico en el momento del diagnóstico. El tiempo medio de supervivencia para estos pacientes es de 4 meses y con la enfermedad metastásica es sólo de 2 a 3 meses. Por desgracia, la tasa de supervivencia general de los pacientes con cáncer pancreático no ha mejorado en las últimas dos décadas.¹⁶ En los Estados Unidos se estimó 48 960 casos diagnosticados de cáncer pancreático (24 840 en hombres y 24 120 en mujeres) y 40 560 muertes producidas por esta patología (20 710 en hombres y 19 850 en mujeres en el 2015). Las tasas de mortalidad son muy próximas a la incidencia de casos debido al mal pronóstico de estos tumores.^{17, 18}

La incidencia más alta reportada se encuentra en los hombres afroamericanos de hasta 20 casos por 100 000 habitantes, mientras que la menor incidencia se encuentra en La India, Singapur y Kuwait de aproximadamente 1 caso por 100 000 habitantes.^{19, 20} La incidencia en Perú es de 3.1 casos por 100 000 habitantes, siendo la relación hombre/mujer de 1/1 con una edad media de 70 años. En un estudio realizado en nuestro país de un universo de 224 pacientes el 74% se presentó con enfermedad avanzada (estadio III/IV) y el 52% de 117 pacientes debutaron con enfermedad metastásica.¹⁰

1.2. Etiología y Patogénesis

En las últimas dos décadas gracias a la aplicación de técnicas modernas de la biología molecular para el estudio de los tumores en humanos, se ha demostrado que el cáncer es una enfermedad genética. Las alteraciones estructurales en el ADN genómico (mutación puntual, el reordenamiento del gen, y la supresión de genes), que dan lugar

a alteraciones en las secuencias de codificación de proteínas o en su expresión, han estado encontrados en cada neoplasia humana estudiada. El hallazgo de estas alteraciones genéticas en cánceres invasivos y en sus lesiones precursoras histológicamente identificables neoplásicas, es coherente con la teoría de que la progresión neoplásica es el resultado de la evolución clonal de las poblaciones celulares que acompaña a una selección de mutaciones, puesto a que las mutaciones se encuentran dentro del crecimiento regulador de genes. Las células neoplásicas son capaces de convertirse con el tiempo a un predominante subclon pese a su crecimiento en virtud de lo que sería la limitación de condiciones, y algunos cambios genéticos.^{8, 21}

La preponderancia de la evidencia sugiere que los genes que están mutados con frecuencia en tumores primarios se han seleccionado durante el proceso de la tumorigénesis, por consecuencia de las alteraciones que confiere un mayor potencial de crecimiento para las células tumorales. En el caso de un oncogén, el aumento del potencial de crecimiento es causado por el efecto dominante en el producto del gen mutante. En el caso de un gen supresor de tumores, se da por la pérdida del efecto regulador negativo. En el caso de genes de reparación del ADN, la pérdida de eficacia de la reparación del ADN conduce a mutaciones de los oncogenes y de los genes supresores de tumores. En general, más de una vía de reglamentación tiene que estar deshabilitado en una célula con el fin de conferir un fenotipo maligno completo, y esto se ha denominado como proceso de "Multigolpe" o "múltiples etapas" de la tumorigénesis.²²

La delección o mutación de la secuencia de codificación de un gen es un evento irreversible que cambia fundamentalmente la función de ese gen en la célula tumoral.⁸

1.2.1. Protooncogenes –Oncogenes

Los protooncogenes son genes incluidos en el genoma humano que tienen por función regular el crecimiento y la diferenciación celular, así como codificar los factores de transcripción que estimulan la expresión de otros genes de función

semejante. Sus proteínas son expresadas en diferentes periodos del ciclo y son imprescindibles para su regulación. En relación, el término protooncogén puede ser confuso, ya que implica de forma errónea que estos genes existen con el único fin de expresar un fenotipo tumoral. No obstante, su función esencial es la regulación del ciclo celular. Determinados cambios estructurales y/o funcionales en los protooncogenes contribuyen a la malignización de la estirpe celular, convirtiéndolos en oncogenes. Las alteraciones en el genoma celular que afectan a la expresión o la función de genes que controlan el crecimiento y la diferenciación celular se considera que son la principal causa de cáncer. En definitiva, los oncogenes tienen la actividad biológica de sobreexpresarse por mutación. El oncogén más estudiado ha sido el oncogén K-ras.^{8, 23}

1.2.1.1. K-ras

K-ras es un miembro de la familia guanina, proteína de unión a nucleótidos asociados a la membrana que participan en la transducción de señales de los efectores que promueven el crecimiento de la superficie celular.⁸

La mutación del gen ras es la más frecuente en el adenocarcinoma ductal del páncreas, con una incidencia de 75 a 95%.²⁴ Las mutaciones, principalmente en el codón 12 del gen K-ras, ocurren a frecuencia mucho más alta que las se encuentra en cualquier otro tipo de tumor,²³ lo que sugiere que las mutaciones en el gen K-ras desempeñan un papel importante en la carcinogénesis pancreática.²⁵

1.2.1.2. Otros genes conocidos

No hay ninguna prueba convincente de que la genética de otro oncogén esté involucrada en la tumorigénesis del páncreas. Un solo caso de la amplificación del gen MYC se ha informado en un páncreas de carcinoma primaria,²⁶ pero esto no se ha confirmado.

Un área del genoma que contiene el oncogén AKT2 putativo (una proteína – serina/ treonina quinasa) se ha informado ser frecuentemente amplificado, como se ve en 2 de 18 líneas celulares de páncreas (PANC1 y ASPC1) y 1 de 10 muestras de tumores primarios mediante hibridación Southern blot y la fluorescencia de hibridación in situ. La amplificación del oncogén AKT2 se ha confirmado por otros estudios.²⁷

1.2.1.3. Genes Supresores de Tumores

Los supresores de tumor son genes normales que desaceleran la división celular, reparan los errores de DNA, o dicen a las células cuando morir (un proceso conocido como apoptosis o muerte celular programada), cuando los genes supresores de tumor no funcionan adecuadamente, las células pueden crecer fuera de control, lo que puede conducir a cualquier tipo de cáncer.²⁸

Inhiben el crecimiento y la proliferación en su forma normal. Durante el proceso tumoral se suelen inactivar por mutación puntual o delección y, en general, se requiere la inactivación de los dos alelos (son recesivos).⁸

Cuando algo va mal con el gen, tal como una mutación, la división celular puede salir de control. Una diferencia importante entre los oncogenes y genes supresores de tumores es que los oncogenes resultan de la activación de protooncogenes. Los genes supresores de tumor, pueden causar cáncer cuando se inactivan (desactivado).^{8, 24, 28}

Los genes más comúnmente mutados en el cáncer humano incluyen los genes p53 y p16.⁸

1.3. Factores de Riesgo

1.3.1. Factores Demográficos

1.3.1.1. Edad

El factor de riesgo demográfico más importante en el cáncer de páncreas es la edad avanzada; esta afección se diagnostica en su mayor parte entre los 60 y los 80 años de edad,⁹ su aparición es extraña antes de los 40 años.^{29, 30}

La edad adulta, es el factor independiente que explica mejor el riesgo de cáncer de páncreas en la población, ésta enfermedad es muy poco frecuente en pacientes menores de 30 años, con una incidencia de 0.1 x 100 000 casos la cual aumenta a 200 x 100 000 casos en pacientes mayores de 80 años.¹²

El diagnóstico de la edad media es de 71 años en los Estados Unidos y 72 años en Inglaterra. Un estudio epidemiológico de China en 2012 mostró que en 6 572 700 personas se habían diagnosticado con cáncer de páncreas y aproximadamente 538 900 personas tuvieron un diagnóstico efectuada antes de la edad de 50 años.¹⁶

1.3.1.2. Sexo

Los hombres tienen más probabilidades de desarrollar cáncer de páncreas que las mujeres en un 30% a 50%. Esto puede ser debido, al menos en parte, a un mayor consumo de tabaco en los hombres, lo que plantea el riesgo de cáncer de páncreas. La diferencia en el riesgo de cáncer de páncreas fue más pronunciada en el pasado (cuando el consumo de tabaco era mucho más común en hombres que en las mujeres), pero la diferencia se ha reducido en los últimos años.³¹ El cáncer de páncreas es ligeramente más común entre los hombres, posiblemente debido a factores de riesgo ambientales u ocupacionales así como el estilo de vida.^{32, 33}

1.3.1.3. Origen Étnico

Por varias décadas, en los Estados Unidos la incidencia de cáncer de páncreas ha sido consistentemente mayor en la raza negra que en la de los blancos. En el año 2002, el cáncer de páncreas ocupó el quinto lugar en la mortalidad por cáncer de EE.UU. entre

negros y blancos, lo que representa casi 30 000 muertes. En 1995-1999, el promedio anual de las tasas de incidencia por edad fueron 16.6 /100 000 para la raza negra y 10.7 /100 000 para la raza blanca.³⁴

Durante el año 2004 hasta el 2008, las tasas de incidencia de cáncer de páncreas (por 100 000 habitantes) eran las más altas entre los hombres (21.3) y mujeres (17.6) de raza negra en relación a los hombres (16.8) y mujeres (12.8) de raza blanca. La disparidad racial en la incidencia del cáncer de páncreas se ha explicado en parte por el aumento de consumo de cigarrillos y diabetes mellitus entre los hombres negros frente a hombres blancos, el consumo excesivo de alcohol y el índice de masa corporal elevado entre las mujeres negras en comparación con las mujeres blancas.³⁵

Las altas tasas de cáncer de páncreas han sido detectadas en las poblaciones negras de América Latina y también en la población de Maorí en comparación con la población blanca correspondiente, cuyas razones son desconocidas.³⁶

1.3.2. Factores Genéticos y Condiciones Médicas

1.3.2.1. Historia Familiar

En algunas de las familias, el alto riesgo se debe a un síndrome hereditario. En otras familias, el gen que causa el aumento del riesgo no se conoce.³¹

El primer síndrome hereditario fue publicado por MacDermott y Kramer en 1973, que describieron una familia en la que 4 de 6 hermanos tenían cáncer de páncreas. Estos estudios iniciales fueron seguidos por rigurosas investigaciones de casos y controles así como de cohortes observacionales.³⁷ Ghadirian encontró que del 7.8% de todos pacientes con cáncer de páncreas sólo el 0.6% de los controles tenían una historia familiar de cáncer de páncreas, una diferencia de 13 veces y sin diferencias en los factores de riesgo ambientales entre los 2 grupos. Los individuos en Estados Unidos (Atlanta, Detroit, y Nueva Jersey) con un pariente que padece de cáncer de páncreas de primer grado tienen un mayor riesgo de desarrollar cáncer de páncreas.³⁸

1.3.2.2. Pancreatitis Hereditaria

Es una forma rara de pancreatitis hereditaria que se asemeja fenotípicamente a otras formas de pancreatitis excepto por su inicio a temprana edad, historia familiar y el aumento significativo en el riesgo de cáncer de páncreas. Es una enfermedad autosómica dominante con aproximadamente 80% de penetrancia, y la mayoría de los pacientes desarrollan síntomas antes de los 20 años de edad. Los pacientes con pancreatitis hereditaria tienen un alto riesgo de desarrollar cáncer de páncreas.³⁹ Varias investigaciones sugieren que una historia de pancreatitis puede aumentar el riesgo de cáncer de páncreas.^{40, 41}

La evidencia actual sugiere que algunas formas de pancreatitis crónica, en particular la pancreatitis hereditaria, puede desempeñar un papel en la etiología del cáncer de páncreas.⁴² La pancreatitis hereditaria representa 3-6% de todos los casos de pancreatitis, y un mayor riesgo de cáncer de páncreas con esta condición es muy común. Por ejemplo, en un estudio de 21 linajes, 20% desarrolló cáncer de páncreas. Una cohorte histórica de 246 pacientes con pancreatitis hereditaria mostró que el riesgo acumulativo de desarrollar cáncer de páncreas a la edad de 70 años es de alrededor 40%. Esto aumenta a 75% con la transmisión paterna de pancreatitis hereditaria.⁴³ Se ha sugerido que la pancreatitis hereditaria se debe a las deficiencias de enzimas pancreáticas,⁴⁴ enfermedad de Lindau,⁴⁵ la neurofibromatosis, y cáncer colorrectal no hereditario, que pueden desempeñar un papel en desarrollo de cáncer de páncreas.³²

1.3.2.3. La pancreatitis crónica

Se ha abordado la relación de la pancreatitis crónica con el cáncer de páncreas, pero no se ha aclarado por estudios epidemiológicos. La pancreatitis crónica es una inflamación a largo plazo del páncreas. Esta condición está vinculada con un aumento del riesgo de cáncer de páncreas (especialmente en los fumadores). Un pequeño número de casos de pancreatitis crónica se debe a una mutación genética heredada.⁴⁶

La pancreatitis crónica es un proceso inflamatorio progresivo destructivo que termina en la destrucción total del páncreas y resulta de la mala absorción de nutrientes de la dieta, diabetes mellitus y asociada al dolor severo e implacable. Sin embargo aún persiste la incertidumbre de que la pancreatitis crónica conduce al cáncer de páncreas, debido a que el cáncer de páncreas en sí causa una reacción desmoplásica que se asemeja a la pancreatitis crónica.⁴⁷

El cáncer pancreático también puede causar la obstrucción del conducto pancreático que causa atrofia distal pancreática y fibrosis pancreática crónica parecida.⁴⁸ Esta observación se ha apoyado a través de múltiples estudios epidemiológicos en la pancreatitis crónica, debido a que se muestra un aumento del riesgo de cáncer de páncreas. Sin embargo, la relación entre la pancreatitis crónica y el cáncer de páncreas es más claro en estudios de pacientes con inicio de pancreatitis crónica en la infancia causada por factores genéticos tales como mutaciones en PRSS1 y CFTR o en la pancreatitis tropical, que es un trastorno complejo asociado con mutaciones en el gen SPINK1. Por la temprana edad de aparición de la enfermedad y el uso poco frecuente de alcohol, estos pacientes proporcionan una información valiosa sobre la relación entre la inflamación pancreática prolongada y el desarrollo cáncer de páncreas.⁴⁶

1.3.2.4. Cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis

También conocido como síndrome de Lynch, casi siempre es causada por un defecto en los genes MLH1 o MSH2. Los cambios en otros genes como MLH3, MSH6, TGBR2, PMS1 y PMS2 también pueden causar ese síndrome.⁴⁹ Entre 147 familias con la línea germinal de mutaciones en genes MMR, se encontró que el riesgo de desarrollar cáncer de páncreas aumentó en comparación con la población en general. El riesgo acumulado de desarrollar cáncer de páncreas fue 3.68% a la edad de 70 años, con casos de familias con el síndrome de Lynch que ocurre a una edad más temprana que en casos esporádicos.⁴⁹

1.3.2.5. La ataxia-telangiectasia

Es una extraña enfermedad autosómica recesiva caracterizada por una amplia gama de manifestaciones patológicas como: progresiva ataxia cerebelosa, telangiectasia, la sensibilidad a la radiación ionizante, aumento del riesgo de cáncer, la inmunodeficiencia, la atrofia del timo, elevada alfa- fetoproteína (AFP) y, más en raras ocasiones, el hipogonadismo.⁵⁰

1.3.2.6. El síndrome de Peutz-Jeghers

El síndrome de Peutz-Jeghers (PJS), es causada por defectos en los genes STK11/LKB1. El 80% de los pacientes con PSJ tiene una línea germinal de mutación de STK11/LKB1. Este síndrome también está vinculado con pólipos en el tracto digestivo y otros tipos de cáncer.³⁸

Peutz-Jeghers (PSJ) es una enfermedad autosómica-dominante, enfermedad hereditaria caracterizada por pólipos hamartomatoso del tracto gastrointestinal y máculas pigmentadas de los labios y mucosa. Una variedad de cánceres se han asociado con PJS, incluyendo gastrointestinal, ginecológico, de pulmón, de mama y de páncreas.^{51, 52}

Los pacientes con PJS tienen 132 veces mayor riesgo de desarrollar el cáncer páncreas, el cual puede progresar a través de un tumor papilar mucinoso intraductal (TPMI). Además, la inactivación de genes STK11/ LKB1 se ve con más frecuencia en TPMIs esporádicos que se dan en el adenocarcinoma ductal convencional.

Además, el PJS es a menudo asociada con lesiones glandulares mucinosos fuera del intestino, estos son metaplasia o hiperplasia. No está claro si hay algo en común entre el epitelio glandular intestinal y lesiones extra intestinales.⁵³

1.3.2.7. Cáncer de mama Familiar

El cáncer de mama es causado por la mutación en el gen BRCA2. Stratton y colaboradores, informaron recientemente la identificación del gen BRCA2 susceptible en el cáncer de mama,⁵⁴ ayudado por la identificación previa de una deleción homocigótica en el locus BRCA2 en un carcinoma de páncreas.⁵⁵ La secuencia que codifica BRCA2 es 10.4kb y contiene 26 exones, pero la naturaleza de su función de supresor de tumor es desconocido.⁵⁶ En algunas familias con cáncer de mama BRCA2, se han observado la mutación de portadores de carcinoma de páncreas.⁵⁷

1.3.2.8. Mellitus diabética

El cáncer de páncreas es el más común en personas quienes padecen de diabetes, cuya razón es desconocida. El riesgo principalmente se encuentra en las personas con diabetes tipo 2. Este tipo de diabetes es el más frecuente e inicia en la adultez y está a menudo relacionado con el sobrepeso u obesidad.³¹

La diabetes mellitus es un síntoma temprano del cáncer de páncreas y algunos estudios epidemiológicos han descrito la asociación de diabetes mellitus mayoritariamente no insulino dependiente, y el cáncer de páncreas, aunque sigue siendo un tema de controversia. En un meta-análisis reciente en el que se analizaron 36 estudios epidemiológicos,⁵⁸ se comunicó una modesta asociación entre diabetes mellitus tipo 2 y el cáncer de páncreas, además se comprobó que los pacientes diabéticos diagnosticados en los 4 años anteriores de diagnóstico de cáncer de páncreas tenían un riesgo de 50% superior que los pacientes diagnosticados en 5 o más años antes. Un estudio reciente ha mostrado que la diabetes está presente en el 40% de los pacientes con cáncer de páncreas y es frecuente su diagnóstico durante los 2 últimos años antes del diagnóstico de cáncer, hecho que apoya que en estos casos la diabetes estaría inducida por el cáncer de páncreas.⁵⁹

La prevalencia de la diabetes mellitus en el cáncer de páncreas varía considerablemente en la literatura, dependiendo de la metodología utilizada para

identificar a los pacientes con diabetes mellitus y los criterios utilizados para diagnosticar en ellos el cáncer de páncreas.^{29,59}

1.3.2.9. Colecistectomía

Estudios recientes de pacientes hospitalizados para una colecistectomía, especialmente aquellos diagnosticados con cálculos biliares, el riesgo de padecer de un cáncer de las vías biliares extrahepáticas se redujeron mientras que los riesgos de obtener de un cáncer de páncreas se elevaron. La colecistectomía también parece aumentar el riesgo.⁶⁰

La explicación probable para estos hallazgos se debería a la elevación de los niveles de colecistoquinina circulante, dado que se ha determinado que esta hormona de forma exógena induce a la estimulación del crecimiento de líneas celulares de adenocarcinoma pancreático.⁶¹

1.3.3. Factores Ambientales y Estilo de Vida

1.3.3.1. Tabaquismo

Los fumadores de cigarrillos experimentaron un 70% más de riesgo de cáncer de páncreas en comparación con los no fumadores.⁶²

Los hombres tienen un 30% a 50% de incidencia más alta de cáncer de páncreas que las mujeres.⁶³ En estudio anteriores se hizo un análisis a los ex fumadores que habían interrumpido el consumo de tabaco en los últimos 2 años, el RR (riesgo relativo) de cáncer de páncreas se redujo en un 48 % comparado con los fumadores vigentes.⁶⁴ En Estados Unidos se ha estimado que el cese del tabaquismo eliminaría un 15% de casos de cáncer de páncreas.⁶⁵

Gran parte del aumento de la incidencia de cáncer de páncreas durante la segunda mitad del siglo 20 vino del aumento de la exposición al tabaco. Al entrar en el siglo

21, hay evidencia que la epidemia de cáncer relacionado con el tabaquismo empieza a declinar en los hombres de Estados Unidos, y tal vez en Europa. Por desgracia, en otras zonas del mundo, como China, el tabaquismo se está incrementando, lo que conducirá a un gran aumento de riesgo de cáncer de páncreas.³⁶

Asimismo, la asociación de tabaquismo con una historia familiar de cáncer pancreático cuadruplica el riesgo. En pacientes con pancreatitis hereditaria, el tabaquismo dobla el riesgo de cáncer pancreático, y aparece unos 20 años antes que en los no fumadores. La incidencia de cáncer de páncreas se eleva tras la aparición de otras neoplasias malignas relacionadas con el tabaquismo, como el cáncer de pulmón y el cáncer vesical en las mujeres; sin embargo, en los hombres existe un descenso notable del riesgo de cáncer pancreático después de un linfoma y un incremento tras un cáncer de próstata.²⁹

1.3.3.2. Agentes cancerígenos ocupacionales

El riesgo de padecer de un cáncer pancreático es más pronunciado en países industrializados debido a la manipulación de diversos agentes tóxicos tales como, hidrocarburos, insecticidas, entre otros. Para prevenir las neoplasias ocupacionales se requiere determinar los agentes que contribuyen al desarrollo de un tipo cáncer en el lugar de trabajo, lo cuales pueden ser: químicos (compuestos o mezclas tales como materias primas, productos principales o intermedios, subproductos, aditivos, agentes usados en procesos y operaciones, incluyendo en residuos), físicos (energías, radiaciones, polvos y fibras), o biológicos e infecciosos (bacterias, virus, hongos y parásitos).⁶⁶

El efecto de las exposiciones laborales se valoró en un meta-análisis con 92 estudios incluidos⁶⁷, los cuales revelaron que los disolventes en base a hidrocarburos clorados y productos afines tenían un RR de 1.4 (IC del 95%: 1.0–1.8), mientras que en el caso del níquel y sus compuestos el RR era de 1.9 (IC del 95%: 1.2–3.2).^{66,67}

Por otro lado, existen pequeños riesgos asociados a otros agentes causantes del cáncer de páncreas tales como compuestos de cromo, hidrocarburos aromáticos policíclicos, insecticidas, organoclorados, polvo de sílice y asbesto. En un segundo meta-análisis de 14 estudios epidemiológicos en el cual valoraron el riesgo en profesiones expuestas al formol, los embalsamadores, anatomistas y anatomopatólogos presentaban un RR de 1.3 (IC del 95%: 1.0–1.7).²⁹

1.3.3.3. Dieta

En diversos estudios experimentales evidenciaron que las grasas y las proteínas actúan como promotores de la carcinogénesis pancreática, dándose la mayor incidencia de neoplasias pancreáticas en poblaciones orientales, dieta que incluye gran ingesta de grasas y alimentos ahumados.^{13, 36}

Respecto al consumo de los tipos de carne tales como las carnes rojas, los resultados de los estudios de cohorte fueron poco contundentes.⁶⁸ Dado que las carnes rojas tienen un alto contenido de colesterol y está asociado a N-nitrosaminas exógenas cuya asociación es relevante en el cáncer de páncreas.⁶⁹ Con respecto a las carnes blancas, no se ha observado ninguna asociación.²⁹

En relación a la hiperglucemia y a la hiperinsulinemia en el desarrollo de cáncer de páncreas, el consumo frecuente de azúcar y alto contenido de alimentos azucarados pueden aumentar el riesgo de cáncer de páncreas mediante la inducción de la hiperglucemia postprandial, el aumento de la demanda de insulina, y disminución de la sensibilidad a la insulina.⁷⁰ La dieta rica en carbohidratos podría ejercer un efecto cancerígeno sobre el páncreas al aumentar la glucemia y la insulinemia en ayunas, aunque algunas investigaciones no han observado esta asociación.²⁹

Es muy frecuente las asociaciones del consumo de frutas y vegetales con la disminución del riesgo de cáncer de páncreas, sin embargo, no existen estudios afirmando dicha premisa o si los hay son pocos contundentes. No obstante, existe un estudio de cohorte sueco donde se observó una asociación inversa significativa con el

consumo de verduras crucíferas como la col, probablemente por poseer inhibidores de la carcinogénesis.^{29, 71}

Algunos estudios hacen mención al folato dietético (importante en la síntesis y reparación del DNA) por poseer efecto protector, cooperando con la reducción del riesgo de cáncer de páncreas en los individuos que consumían la concentración más alta de folato dado que en su deficiencia se da una inestabilidad cromosómica.^{29, 72, 73}

Algunas descripciones del consumo de café, té verde y el alcohol, asociadas al cáncer de páncreas fueron estudiadas hace más de dos décadas, pero no existe suficiente evidencia para corroborarlo.⁷⁴

1.4. Clínica

La sintomatología en el cáncer de páncreas es poco específica y depende de la localización del tumor y de la compresión o infiltración de estructuras vecinas. En frecuentes ocasiones el cáncer de páncreas se detecta en una etapa avanzada, la realización de un diagnóstico precoz es indefinido.⁷⁵

Es decir, el cáncer de páncreas generalmente se desarrolla sin síntomas tempranos. Sin embargo el dolor abdominal leve que tiende a irradiarse a la espalda (se da por infiltración tumoral de los plexos celíaco y/o mesentérico) y la pérdida de peso se puede incluir como síntomas característicos de este tipo de cáncer y poco común el desarrollo de la diabetes.¹⁷

La localización de tumores cerca del conducto biliar, tales como en el caso de la cabeza pancreática se manifiesta habitualmente por la aparición de ictericia (coloración amarillenta de la piel y ojos) por bloqueo o compresión del colédoco intrapancreático.^{17, 75} Suele ser progresiva e indolora. Es frecuente que se acompañe de prurito, coluria y acolia, indicios para procurar diagnosticarlo en una temprana etapa.¹⁴ Los signos de enfermedad en estadio avanzado puede incluir dolor abdominal intenso, náuseas y vómitos.¹⁷ Si el crecimiento tumoral infiltra el duodeno, puede

provocar síntomas debido a la dificultad de paso (vómitos) o por erosión de estructuras vasculares (hemorragia).⁷⁵

La frecuencia de la presentación de los síntomas en 1 175 pacientes con adenocarcinoma del páncreas fue: 2/3 con ictericia indolora, pérdida de peso, y alrededor de 1/3 con dolor abdominal, colestasis obstructiva que podría conducir a una orina oscura, heces de color claro y prurito.⁷⁶ La obstrucción del conducto pancreático o invasión perineural también causa dolor, pero ésta es menos específica y mal localizada.⁷⁷

1.5. Estadificación

Se han tomado como referencia los estadios establecidos por el Comité Conjunto Americano del Cáncer basados en la clasificación TNM edición del 2010.⁷⁸

1.5.1. Tumor (T)

Mediante el sistema TNM, se utiliza la “T” más una letra o número (0 a 4) para describir el tamaño y la ubicación del tumor. Esto facilita a que el médico desarrolle el mejor plan de tratamiento para cada paciente.

Tumor	Descripción
TX	El tumor primario no puede ser valorado
TO	Sin evidencia de lesión tumoral
Tis	Se refiere al carcinoma in situ, que es el cáncer muy precoz que no se ha diseminado.
T1	El tumor solo se encuentra en el páncreas y mide 2 centímetros (cm) como máximo.
T2	El tumor solo se encuentra en el páncreas y mide más de 2 cm.
T3	El tumor se extiende fuera del páncreas, pero no compromete las arterias o venas principales que se encuentran cerca de él.

T4	El tumor se extiende fuera del páncreas, hacia las arterias o venas principales que se encuentran cerca de él. El tumor T4 no se puede extirpar por completo con una cirugía.
----	---

1.5.2. Ganglio (N)

La “N” en el sistema TNM corresponde a la abreviación para ganglio linfático. Los ganglios linfáticos son órganos minúsculos con forma de frijol ubicados en todo el cuerpo que, al formar parte del sistema inmunitario del cuerpo, ayudan a combatir las infecciones y las enfermedades.

Ganglio	Descripción
NX	No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales.
N0	No se encontró presencia de cáncer en los ganglios linfáticos regionales.
N1	El cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos regionales

1.5.3. Metástasis (M)

La “M” del sistema TNM indica si el cáncer se ha diseminado a otras partes del cuerpo, lo que se conoce como metástasis a distancia.

Ganglio	Descripción
MX	No se puede evaluar la metástasis distante.
M0	El cáncer no se ha diseminado a otras partes del cuerpo.
M1	El cáncer se ha diseminado a otras partes del cuerpo, incluidos los ganglios linfáticos distantes. El cáncer de páncreas se disemina con mayor frecuencia al hígado, el revestimiento de la cavidad abdominal llamado peritoneo y los pulmones.

1.5.4. Agrupación de los estadios del cáncer

Los médicos dan el estadio del cáncer combinando las clasificaciones T, N y M.

Estadio	Descripción
Estadio 0	Se refiere al cáncer in situ; el cáncer aún no ha invadido el área fuera del conducto en el que se originó (Tis, N0, M0).
Estadio IA	El tumor mide hasta 2 cm o menos y está en el páncreas. No se ha diseminado a los ganglios linfáticos u otras partes del cuerpo (T1, N0, M0).
Estadio IB	El tumor que afecta al páncreas mide más de 2 cm. No se ha diseminado a los ganglios linfáticos u otras partes del cuerpo (T2, N0, M0).
Estadio IIA	El tumor se extiende fuera del páncreas, pero no afecta a las arterias o venas cercanas. No se ha diseminado a ningún ganglio linfático u otras partes del cuerpo (T3, N0, M0).
Estadio IIB	El tumor, de cualquier tamaño, no se ha diseminado a las arterias o venas cercanas. Se ha diseminado a los ganglios linfáticos, pero no a otras partes del cuerpo (T1, T2 o T3; N1; M0).
Estadio III	El tumor se ha diseminado a las arterias, venas y/o ganglios linfáticos cercanos, pero no a otras partes del cuerpo (T4, N1, M0).
Estadio IV	Cualquier tumor que se ha diseminado a otras partes del cuerpo (cualquier T, cualquier N, M1).

1.6. Diagnóstico

Pese a los avances tecnológicos en los últimos años que tienen por objetivo lograr la detección de la enfermedad en una fase precoz, potencialmente curable y en pacientes asintomáticos, el diagnóstico ideal, aislado y precoz para el cáncer de páncreas no existe, es mas no existen estudios algunos que hayan demostrado lo contrario.²⁹

1.6.1. Ultrasonografía (US)

La US abdominal es a menudo el primer enfoque utilizado en tratar de identificar la causa del dolor abdominal o ictericia, ya que es no invasiva y es un método rentable. La dilatación del conducto del páncreas, y la dilatación del conducto biliar común en un US convencional son signos de la presencia de un tumor de páncreas.^{79, 80} La mayoría de tumores de páncreas incluyendo el adenocarcinoma de páncreas, la pancreatitis crónica y tumores de células endocrinas se revelan como un área hipoecoica en el páncreas. Es decir, no hay signos característicos de las diferentes lesiones pancreáticas. La precisión de la US convencional para el diagnóstico de tumores de páncreas es solamente 50-70%.⁸⁰

Se ha propuesto un US Doppler de contraste como una técnica valiosa para el diagnóstico de tumores de páncreas. Los signos característicos de los tumores de páncreas han sido reportados con el uso del US Doppler de contraste mejorado.⁸¹

1.6.2. La tomografía computarizada helicoidal (CT)

La CT es la exploración de imagen más utilizado ampliamente para la detección y estadificación del carcinoma de páncreas. La sensibilidad de la CT helicoidal en la revelación del carcinoma de páncreas es alta, oscilando entre el 89% y 97%.⁸¹

Varios informes concluyeron que la extensión local de cáncer de páncreas y la invasión de estructuras de los vasos adyacentes podrían ser bien representados con la CT helicoidal, con las principales limitaciones para la estadificación preoperatoria, como

la revelación insospechada de la metástasis hepática y una baja tasa reveladora de metástasis de los ganglios linfáticos.⁸²

El reciente desarrollo de la MDCT (multi-detector de tomografía computarizada) permite el uso de un colimador extremadamente delgado para la adquisición de escaneos de alta resolución durante varias fases de contraste. Por lo tanto, esta técnica puede ofrecer una mejora en la temprana detección y estadificación precisa de carcinoma de páncreas, la tecnología MDCT ha permitido la adquisición de excelentes imágenes tridimensionales.^{47, 82}

1.6.3. Colangiopancreatografía Retrógrada Endoscópica (ERCP)

La ERCP es un procedimiento que combina la endoscopia esofagogastroduodenal con las radiografías para tratar los problemas de los conductos biliares y pancreáticos. La ERCP se usa cuando se sospecha que los conductos pancreáticos y biliares de una persona podrían haberse estrechado.⁸³

La indicación de la ERCP preoperatoria para diagnóstico de cáncer de páncreas ha ido disminuyendo debido a los avances de la colangiopancreatografía de resonancia magnética (MR). El diagnóstico por ERCP puede ser utilizado como una ayuda adicional para diferenciar entre pancreatitis crónica y el cáncer.⁸¹

1.6.4. Imagen por Resonancia Magnética (MRI)

La capacidad de la MRI para el diagnóstico de carcinoma de páncreas ha mejorado de manera concertada con la tecnología y su aplicación. La MRI ofrece varios beneficios para formación de imágenes del páncreas.⁸⁴

MRI utiliza ondas de radio e imanes potentes para tomar imágenes de los órganos y las estructuras internas del cuerpo mediante la medición de su energía.^{81, 84}

De manera similar a una tomografía computarizada, la resonancia magnética toma varias fotos en rodajas finas del órgano, mientras que el paciente se acuesta sobre una mesa. Entonces, un ordenador combina todas las imágenes y crea una imagen de 3 dimensiones. Se ha informado que las imágenes de MR con gadolinio mejorado es superior a la CT helicoidal para la detección de lesiones pequeñas.⁸¹

1.6.5. La ecografía endoscópica (EUS)

Las características típicas de carcinoma de páncreas vistos por EUS incluyen una masa sólida homogénea con bordes irregulares que aparecen hipoeoicos comparados con los parénquimas pancreáticos normales. La EUS es altamente sensible en la detección de tumores pequeños y la invasión de estructuras vasculares grandes. Por lo tanto, es superior en la detección de pequeños tumores a la EUS espiral computarizada, resonancia magnética y la tomografía por emisión de positrones.^{85, 86}

Los principales inconvenientes de la técnica son la dependencia del operador y limitado campo de visualización para detectar la diseminación metastásica al hígado y al peritoneo.⁸¹

1.6.6. La tomografía por emisión de positrones (PET)

PET trabaja de la mano con la fluorodeoxiglucosa (FDG) análogo de la glucosa marcada radiactivamente, ha sido sugerido como una modalidad prometedora para la diferenciación no invasiva entre lesiones benignas y malignas. Aumentado la utilización de glucosa, debido a un mayor número de las proteínas de transporte de glucosa y el aumento de la hexoquinasa, la actividad de la fosfofructoquinasa se encuentra comúnmente en los tumores malignos.⁸⁷

Anteriores estudios informaron la sensibilidad y especificidad de la FDG-PET para detectar los tumores malignos de páncreas siendo 71-100% y 64%-90%, respectivamente. Existen ciertas limitaciones de la FDG-PET en el diagnóstico del carcinoma de páncreas. La pancreatitis crónica y aguda puede acumular FDG

obteniendo como resultado interpretaciones falsas positivas en las imágenes de PET.^{81, 87, 88}

1.7. Terapia o Tratamiento

La cirugía, la quimioterapia y radioterapia son las opciones de tratamiento que pueden extender la supervivencia y/o aliviar síntomas en muchos pacientes, pero rara vez producen una cura. Menos del 20% de los pacientes son candidatos para la cirugía debido a que el cáncer páncreas se detecta generalmente después de que se ha extendido más allá del páncreas.¹⁷

1.7.1. Intervención Quirúrgica

La cirugía ofrece la única posibilidad de supervivencia a largo plazo, sin embargo la mayoría (> 85%) de pacientes con cáncer de páncreas se presentan con enfermedad no resecable o simplemente metastásico.⁸⁹

Con los años se ha quedado claro que las indicaciones para la intervención quirúrgica se han ampliado considerablemente. Por lo general, los criterios actuales dictan posible la resección de los tumores en estadio I-A a II-B. Es práctico para clasificar los tumores de páncreas en una de tres categorías siguientes.⁹⁰

1.7.1.1. Tumores resecables

Básicamente son los tumores localizados en el páncreas. En este caso, no hay evidencia de afectación de la vena mesentérica superior de cualquier tipo. Un plano de disección indicado por una capa de grasa entre la arteria mesentérica superior, tronco celíaco, la arteria hepática y el páncreas tiene que ser identificado por tomografía computarizada, así como la participación ausente de la vena mesentérica superior y la vena porta.⁹¹ Estos pacientes deben proceder con la intervención quirúrgica.

1.7.1.2. Tumores resecables de limite

Hay un criterio dinámico para la resección de estos tumores, basados en la capacidad de centros especializados para llevar a cabo una compleja resección y reconstrucción arterial o venosa.⁹²

Estos tumores incluyen los que tienen (A) pinzamiento de la vena mesentérica superior - portal severa (unilateral o bilateral), (B) la participación de la arteria mesentérica superior - arteria celíaca, pero menos de 180°, (C) la participación de la arteria hepática con la posibilidad de reconstrucción, y (D) oclusión de la vena mesentérica superior o implicación con tratamiento del cáncer con la posibilidad de reconstrucción.⁹⁰

1.7.1.3. Los tumores no resecables

Estos son tumores en los que los ganglios linfáticos distantes o enfermedad extensa metastásica ha sido identificado. La participación de la vasculatura o ascitis maligna también consideran contraindicaciones para la resección (es decir, mayor trombosis venosa de la vena porta o arteria mesentérica superior) que se extiende por varios centímetros o encajamiento circunferencial de la arteria mesentérica superior.⁹¹

Estos pacientes son candidatos para intervenciones de quimioterapia, para la participación en ensayos clínicos, así como paliativos intervenciones dependiendo del grado de la enfermedad.^{90, 91}

Cuando el cáncer afecta a la cabeza del páncreas, el procedimiento de elección es una pancreaticoduodenectomía con la conservación del píloro.⁹

- Se extirpa la cabeza del páncreas.
- Se extirpan el conducto biliar, la vesícula biliar, el duodeno (primera porción del intestino delgado) y, además, parte del estómago (conservando la última porción del estómago y el píloro), porque reciben sangre de la misma arteria que la cabeza

del páncreas. Si se extirpara exclusivamente el páncreas, el flujo sanguíneo a estos órganos se vería afectado y se necrosarían

- El resto del páncreas, conducto biliar y estómago vuelven a unirse al intestino.

Cuando el cáncer afecta al cuerpo y la cabeza del páncreas, se realiza una pancreatectomía distal con esplenectomía:

- Se extirpan el cuerpo y la cabeza del páncreas (pancreatectomía distal).
- Se extirpa también el bazo (esplenectomía), puesto a que el bazo, el cuerpo y la cabeza del páncreas reciben sangre de la misma arteria. Si se extirparan exclusivamente el cuerpo y la cola del páncreas, el flujo sanguíneo del bazo se vería afectado y este se necrosaría.⁹

1.7.2. Quimioterapia

La quimioterapia continúa siendo uno de los principales tratamientos del cáncer de páncreas. El propósito de la quimioterapia sistémica es aliviar los síntomas, mejorar la calidad de vida y prolongar la supervivencia.⁹³

En el año 1997 Burris nos muestra su investigación con la gemcitabina considerando un gran avance, sin embargo no existía tratamiento adyuvante hasta el año 2006, año en donde Burris finaliza el estudio CONKO-001 (Charite Onkologie Clinical),^{94, 95} cuyos resultados obtenidos fueron estadísticamente significativos, demostrando así una mayor supervivencia, libre de recurrencia en el grupo tratado con gemcitabina frente al grupo control que se mantuvo en observación por algunos meses.⁹⁶ Sin duda es un medicamento bien tolerado y con escasos efectos secundarios.⁹⁴

Sin embargo, un nuevo medicamento logro demostrar una mayor supervivencia, lleva por nombre Folfirinox (5-fluorouracilo, oxaliplatin, irinotecan, leucovorin). Se realizaron estudios con 342 pacientes que demostraron la eficacia del Folfirinox frente a gemcitabina, incrementando la supervivencia de 6.8 meses a 11.1 meses, investigación dada por el grupo ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group).⁹⁷

Folfirinox se convierte en una alentadora promesa para el tratamiento adyuvante y neoadyuvante del cáncer de páncreas, mayoritariamente en pacientes menores de 76 años en una fase metastásica, sin patología isquémica cardíaca y con cifras de bilirrubina en rangos cercanos a lo normal. Los inconvenientes que presenta este medicamento es su elevada toxicidad, lo que ha llevado a reservarse para casos muy particulares y, sobre todo, en estado muy avanzado de la enfermedad, así como otros efectos secundarios que aparecen con menor frecuencia, sea el caso de la diarrea, náuseas, vómitos, neuropatías, trombocitopenia o neutropenia.⁹⁷

1.7.3. Radioterapia

En los últimos años, el desarrollo de técnicas de radioterapia, el conocimiento acerca de la localización del tumor y la dosis de radiación han proporcionado nuevo y eficaz tratamiento para el cáncer de páncreas.⁹³

1.7.3.1. Rayos X-Knife

Es un acelerador lineal de alta energía de rayos X a la región del tumor del paciente. Solamente algunos casos de cáncer pancreático tratado con este tipo de terapia han sido reportados. Los rayos X-Knife es una opción para el tratamiento de cáncer de páncreas, sobretodo en pacientes que se encuentran en una etapa inicial de esta enfermedad.⁹⁸

1.7.3.2. Radioterapia conformacional en tres dimensiones

El perfil de cada haz de radiación está conformado para ajustarse al perfil del objetivo a vista de una viga, cuando el volumen de tratamiento se ajusta a la forma del tumor, la toxicidad relativa de la radiación normal circundante reduce los tejidos, lo que facilita una dosis más alta de radiación al tumor, que cuando se utiliza técnicas convencionales. Esta técnica es más usado en la radioterapia.⁹⁵

Los estudios demostraron que alivia la ictericia en pacientes con carcinoma de la cabeza del páncreas, por lo tanto, la radioterapia conformada en 3 dimensiones para el cáncer de páncreas será el tema central de la investigación futura.^{93, 99}

1.7.3.3. Radioterapia de intensidad modulada

Esta técnica permite utilizar altas dosis de radiación que se concentran en las regiones dentro del tumor, así como reducir al mínimo la dosis a circundantes estructuras críticas normales.

La radiación más alta con una dosis eficaz y segura para los tumores, tienen menos efectos adversos o secundarios en comparación de las técnicas de la radioterapia convencional. Por lo tanto este tratamiento es radical y adecuado al mismo tiempo para el cáncer de páncreas local en una etapa temprana.¹⁰⁰

1.7.3.4. Radioterapia de Precisión

Método que ofrece una sola dosis de alta radiación específicamente en el área donde el tumor reside, mediante el uso de haces de rayos gamma altamente enfocados. En pacientes con cáncer de páncreas avanzado que están adecuados para la cirugía, la radioterapia estereotáctica, puede ayudar a controlar el crecimiento de un tumor, reducir la ictericia, aliviar síntomas, mejorar el apetito y mejoran la calidad de vida.¹⁰¹

1.7.3.5. Inconvenientes de la Radioterapia

La radioterapia es una opción de tratamiento para el cáncer de páncreas, pero solo en pacientes que no tienen órganos vitales comprometidos, es decir, disfunción en el corazón, hígado o riñón. Los pacientes con cáncer de páncreas que buscan la radioterapia, tienen tumores localmente avanzados no resecables, grandes y de forma irregular.⁹³

Definir la dosis de radiación es complejo en este tipo de tumores, ya que los tumores pancreáticos tienen una baja radio sensibilidad, con el fin de inhibir o matar a las células tumorales. No obstante, el páncreas está situado detrás del peritoneo y los órganos vitales, cerca de importantes vasos sanguíneos, como el estómago, los intestinos, el hígado, riñón, médula espinal, etc. Estos tejidos son muy sensibles a la radiación y existe riesgo de daño que conlleva a consecuencias graves. La aplicación de la radioterapia está limitado por el alto costo y operación difícil del equipo de radioterapia.⁹³

1.7.4. Otras terapias

1.7.4.1. Terapia de intervención

1.7.4.1.1. La terapia transvascular

Además de la perfusión regional de los medicamentos de quimioterapia, también se utilizan fuentes de radiación. Se implantan en el tumor para que emita haces de radiación. Los estudios mostraron que este método ha mejorado el efecto terapéutico con una tasa de efectividad total del 70%. Tras el uso de la inyección de fosforo coloidal¹⁰¹ en tumores sólidos, ayudaron a matar las células tumorales y reducen el flujo de sangre al tumor.¹⁰²

1.7.4.1.2. Terapia de punción percutánea

La inyección de etanol absoluto es eficaz y seguro ya que ha dado lugar a un mejor pronóstico del cáncer de páncreas en pacientes con tumores pequeños que no pueden tolerar cirugías, el alcohol es una terapia adyuvante que inhibe la progresión del tumor.¹⁰³ Para la disolución de un tumor se requiere la guía de la CT o tipo B de ultrasonido, y usar múltiples etapas de frecuencia de radio o la coagulación de microondas.¹⁰⁴ La disolución de un tumor o inyectar drogas en un tumor también podría ser realizado bajo la endoscopia.⁹³

1.7.4.1.3. Inconvenientes de la terapia de intervención

Llevar a cabo la terapia de intervención en pacientes con cáncer de páncreas tiende a ser muy difícil. La mayoría de los tumores de páncreas han decrecido el flujo de sangre, pero no se ha inhibido por completo, puesto a que los agentes embólicos no llegan al punto central o nido que deberían llegar permitiendo así la posible aparición de la circulación colateral cerca del tejido u órgano que se quiere radicar, lo cual hace más difícil de matar las células tumorales.⁹³

Hasta la actualidad, la relación entre la dosis de fármaco y el tamaño del tumor, no se ha estandarizado. La punción percutánea puede causar daños a los órganos normales y puede conducir a una hemorragia masiva si el ataque no es directo al nido. La perfusión de quimioterapia es mucho menos eficaz que la perfusión arterial más embolización.⁹³

1.7.4.2. Inmunoterapia

Comprende la terapia con anticuerpos puros y la terapia de anticuerpos conjugados. El primero es el uso de anticuerpos monoclonales para unirse específicamente a antígenos tumorales, que dan lugar a los anticuerpos mediados por células dependientes de la citotoxicidad. En la terapia de anticuerpos conjugados, tiene el propósito de hacer uso de anticuerpo monoclonales vinculado con fármacos, toxinas o pro fármacos, creando así una entidad para matar las células tumorales.⁹³

1.7.4.2.1. Citoquina inmunoterapia

En la terapia de citoquinas exógenas una citocina antitumoral se inserta en el tumor. La interleucina 12 (IL-12) es una importante citoquina anti-tumor. La inyección de adenovirus que codifica IL-12, induce la generación de los linfocitos T citotóxicos, causando daños a las células tumorales de varias maneras. Dar IL-2 a los pacientes con cáncer de páncreas por vía subcutánea antes de la cirugía mostró una mejora de la tasa de supervivencia de dos años en comparación con el grupo control. El gen de la IL-2 más interferón- γ pueden incrementar la cantidad total de CD4+, CD8+ linfocitos, e

inducir respuesta inmune anti-tumor. Esta terapia se conjuga con una toxina, un radionúclido, o medicamento de quimioterapia y actuar sobre las células tumorales que expresan el pertinente receptor de citoquina. Por otro lado, se menciona la IL-13, sin embargo, se expresa de forma diferente en diversos tipos de tumores y sus efectos no es consistente.^{105, 106}

1.7.4.2.2. Inconvenientes de la Inmunoterapia

Surgen debido a que los antígenos específicos de tumores pancreáticos aún no se han descubierto, la inmunoterapia antigénica carece de especificidad.⁹³

Así también, debido a que los mecanismos de escape inmune de los tumores se suman a los obstáculos para el éxito de la inmunoterapia. Los efectos de los anticuerpos monoclonales y citosinas no han sido completamente confirmados y altas dosis de ellos no puede ser tolerado por los pacientes.⁹³

2. RECEPTOR LRH-1

Previos estudios determinaron que el factor desencadenante del cáncer pancreático se trataría de un receptor nuclear huérfano denominado receptor homólogo del hígado 1 (LRH-1) o receptor nuclear de la subfamilia 5 grupo A miembro 2 (NR5A2)⁷ cuya función es compartida entre la embriogénesis pancreática y oncogénica. El receptor homólogo 1 es un receptor nuclear huérfano que regula la homeostasis del colesterol y la plasticidad celular en los tejidos derivados de la endodermis.⁶

Debido a su papel decisivo en la diferenciación celular, el receptor LRH-1 es vinculado a múltiples vías de desarrollo, incluyendo Hedgehog y la señalización de la Wnt/ β -catenina.⁶

Los objetivos transcripcionales establecidos del receptor LRH-1 emparejado con la β -catenina incluyen genes CCND1 y CCNE1, así como genes MYC conocidos para el

control de la diferenciación celular, el crecimiento, y la proliferación, ya que los genes mencionados codifican a las proteínas ciclinas D1 y E1.^{107, 108}

El receptor LRH-1 se encuentra sobre alterado en el cáncer pancreático, provocando de esta manera su sobreexpresión y la inmediata proliferación celular, esta sobreexpresión está asociado al incremento de las proteínas como la Cíclinas D1 y E1, las cuales son participes en la división celular y su efecto es potenciada por su interacción con β -catenina.¹⁰⁹

Una aberrante actividad del receptor LRH-1 está vinculado a diferentes tipos de tumores malignos, incluyendo los cánceres de mama y de endometrio, así como tumores intestinales y el cáncer de páncreas.¹¹⁰

Recientemente, el receptor LRH-1 se encontró en ovarios humanos y en las glándulas suprarrenales, aumentando la posibilidad de que el receptor LRH-1 podría desempeñar un papel en la regulación de la esteroidogénesis.¹¹¹

El receptor LRH-1 es vital en el desarrollo temprano, ya que mantiene un grupo indiferenciado de células madre embrionarias mediante el control de la expresión de dos factores de transcripción maestros, POU5F1 (conocidos como OCT3/4) y NANOG.¹¹²

3. ANTAGONISTA DEL RECEPTOR LRH-1

Los primeros antagonistas sintéticos del receptor LRH-1 eran candidatos moduladores que han sido identificados mediante acoplamiento molecular y cribado virtual con un modelo de dominio de unión a ligando (LBD) del LRH-1. Esta proyección computacional fue seguida por la unión directa, la transcripción y estudios de proliferación celular *in vitro*.⁶

La molécula 1-(3'-(1-(2-(4-morfolinil)etil)1H-pirazol-3-il)-3-bifenilil)etanona comúnmente conocida como “Antagonista LRH-1” fue identificada como el

compuesto 3d en la única investigación donde se realiza su descubrimiento, siendo parte a la vez de diversos de inhibidores específicos de LRH-1 y preseleccionado de 12 compuestos. La búsqueda independiente de los antagonistas de LRH-1 fue usando la Biblioteca Química Prestwick (Illkirch, Francia). Esta investigación dio como resultado la identificación de sólo un compuesto (0.1% de los productos químicos probados) capaz de unirse al receptor LRH-1 y es el mencionado.⁶

Es un compuesto permeable a las células, actúa como un antagonista específico del receptor de hígado homólogo 1 (LRH-1, NR5A2), bloqueando su actividad transcripcional.¹¹³

Reduce los niveles de mRNA en la transcripción del gen G0S2 ($IC_{50} = 5 \mu M$) en células HEK293. No presenta ninguna actividad antagonista contra andrógenos, estrógenos, o receptores de hormonas tiroideas a concentración de $10 \mu M$. Demostrado tener actividad anti-proliferativa en LRH-1 que se expresa en las células HT-29, líneas de células tumorales T47D y MDA-MB-468 ($IC_{50} =$ de 15 a $20 \mu M$).¹¹³

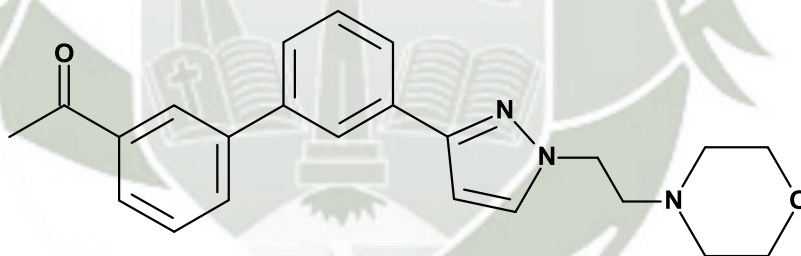


Fig. 1 Estructura química del Antagonista LRH-1

4. CULTIVO CELULAR

4.1. Fundamento

Los cultivos celulares se refieren al mantenimiento y crecimientos *in vitro* de células, tejidos u órganos que sean de origen vegetal y animal. Las células pueden ser retiradas del tejido directamente por medios enzimáticos o mecánicos, llevarlas a un ambiente

artificial que les permita desarrollar su capacidad de propagación, crecimiento, multiplicación y mantenimiento del metabolismo de una forma controlada.¹¹⁴

Se pretende mantener sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas al máximo, se consigue mantener clones de un solo tipo de células de origen animal y/o vegetal bien definido a partir de cada cultivo celular.¹¹⁵

El desarrollo y los métodos de cultivo de células están estrechamente interrelacionados a los de cultivo de tejidos y de cultivo de órganos. La propagación *in vitro* de células se ha convertido en una práctica común en muchos laboratorios para un gran número de aplicaciones.¹¹⁶

Los rangos de tipos de células cultivadas son muy amplios. Generalmente las células son sensibles a una amplia gama de compuestos y por lo tanto es necesario asegurarse de que entran en contacto solamente con los instrumentos de estudio y no con materiales extraños.¹¹⁶

4.1.1. Cultivos Primarios

Es el paso principal de cultivo de células en la que la célula es primero aislada a partir de tejido y luego se proliferan en las condiciones apropiadas hasta que consumen todo el contenido disponible para su crecimiento. Las células son provenientes del tejido original y recién trasplantadas en condiciones artificiales.¹¹⁷

La preparación de cultivos primarios es un trabajo intensivo y que se pueden mantener *in vitro* sólo por un período limitado de tiempo. Durante ese tiempo de vida relativamente limitada, las células primarias generalmente conservan muchas de las características diferenciadas de las células *in vivo*.¹¹⁷

4.1.2. Línea Celular

Una línea celular se origina a partir de un cultivo primario en el momento del primer subcultivo exitoso. El término línea celular implica que los cultivos de la misma que consisten en numerosos linajes de células presentes originalmente en el cultivo primario.¹¹⁸

Una línea celular es un cultivo celular establecida de forma permanente que proliferan indefinidamente en un medio fresco apropiado.¹¹⁷

4.1.3. Cepas Celulares

Es un cultivo derivado, por selección (simplemente denominado clonación) de una célula, desde un cultivo primario o de una línea celular.

Mediante la aplicación de la clonación, la población positiva de las líneas celulares se selecciona, por lo tanto, las líneas celulares de este momento se convierten en una cepa de células. Una cepa de células a menudo adquiere cambios genéticos resultantes de la iniciación de la línea parental.^{114, 118}

4.1.4. Pasaje

Se considera pasaje a la transferencia o trasplante de células, con o sin dilución, de un recipiente de cultivo a otro. Se entiende que siempre que las células se transfieren de un recipiente a otro, una cierta porción de éstas se pierde, por lo tanto, se produce la dilución de las células en forma deliberada o no. Comúnmente llamado subcultivo.¹¹⁸

4.2. Células ASPC-1

Las células adenocarcinomas ascitis metastásicas pancreáticas humanas se derivan de xenoinjertos de ratones desnudos iniciados con células de la ascitis de una paciente

de raza caucásica de 62 años de edad con cáncer de páncreas. Las células producen el antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno asociado páncreas humano y mucina específica.^{118, 119}

5. MUERTE CELULAR

La muerte celular es una respuesta celular fundamental que tiene un papel crucial en la formación de nuestros cuerpos durante el desarrollo y en la regulación de la homeostasis del tejido mediante la eliminación de células no deseadas.¹²⁰ Puede desencadenarse por múltiples factores, sea por pérdida de su función, daño mecánico, infección por microorganismos o virus, acción de agentes químicos tóxicos o falta de nutrientes. La muerte celular, según criterios clásicos se puede dividir en una muerte que transcurre por mecanismos regulados, como la apoptosis, y la no regulada.¹²⁰⁻¹²²

La necrosis de una célula sucede cuando se produce una alteración en las membranas plasmática y mitocondrial, donde se sitúan las bombas iónicas que poseen la función de mantener el adecuado equilibrio iónico intra-extracelular.¹²⁰

Así también enzimas como la lactato deshidrogenasa, enzima catalizadora oxidoreductasa citoplasmática que convierte el piruvato en lactato en presencia de nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH). Las fugas de la enzima LDH a partir de una variedad de células dañadas en el suero, es un marcador clínicamente útil de estados de varias enfermedades y se ha utilizado para cuantificar la lesión.¹²³

Esta forma de muerte celular se califica como un proceso violento ya que las células se hinchan, se deterioran las estructuras celulares, y se paralizan funciones críticas para la vida.¹²²

6. APOPTOSIS

La apoptosis es la ejecución programada de la muerte celular que puede ser inducida por numerosos factores desencadenantes, siendo uno de ellos la pérdida del anclaje celular.¹²⁴

La apoptosis es un proceso genéticamente controlado de selectiva eliminación de células implicadas en el desarrollo normal de las células. La apoptosis se caracteriza por morfología distinta, cambios como formación de ampollas en la membrana, condensación nuclear, desorganización y fragmentación de los genes DNA.¹²⁵

La apoptosis desempeña un papel fundamental en una variedad de la normalidad procesos fisiológicos. Estos incluyen auto-organización funcional en procesos del sistema inmunológico y del sistema nervioso central, cambios morfogenéticos durante el desarrollo embrionario, la homeostasis del tejido en los animales adultos, y una eliminación de las células dañadas. También está profundamente implicado en la patogénesis de muchas enfermedades humanas, como el cáncer, el SIDA y otros trastornos inmunitarios, enfermedades cardiovasculares, y enfermedades neurodegenerativas incluyendo la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, derrame cerebral, e isquemia.¹²⁶

La señalización de la apoptosis se produce a través de múltiples caminos independientes que se inician ya sea desde los eventos de activación dentro de la célula o desde fuera de la célula, por ejemplo, por ligación de receptores de muerte. Toda la señalización de las vías de apoptosis converge en una maquinaria común de destrucción de la célula que se activa por una familia de cisteína proteasas (caspasas) que escinden proteínas en residuos de aspartato.¹²⁷

El proceso apoptótico implica a las caspasas, la “c” de “caspasa” se refiere a la “Cisteinaproteasa”, en tanto el “aspasa” se refiere a la propiedad única de la enzima de fracturar en residuos aspárticos. Las caspasas activadas, disocian muchas proteínas celulares vitales, rompen la conformación nuclear incluyendo el citoesqueleto y activan a las DNAsas, que degradan al DNA nuclear.¹²⁸

A grandes rasgos, existen tres tipos principales de cambios bioquímicos que pueden verse en la apoptosis, 1) activación de las caspasas 2) rotura de DNA y otras proteínas y 3) cambios de la membrana y reconocimientos por parte de las células fagocíticas.¹²⁸

6.1. La vía extrínseca

Comienza cuando los ligandos de muerte se unen a un receptor de muerte. El más conocido es el receptor de TNF tipo 1 (TNFR1), y una proteína relacionada llamada Fas (CD95). Estos receptores de muerte tienen un dominio de muerte intracelular que recluta a proteínas adaptadoras tales como el dominio de muerte asociado al receptor TNF (TRADD), el dominio de muerte asociado a Fas (FADD) y las caspasas. La unión de un ligando de muerte a un receptor de muerte, resulta en la formación de un sitio de unión para una proteína adaptadora y el complejo completo de ligando-receptor-adaptador que se conoce como DISC (complejo de señalización que induce muerte). El DISC, inicia el ensamblaje y activación de la pro-caspasa 8. La caspasa 8, es una caspasa iniciadora dando rienda a otras caspasas ejecutoras como caspasas 3, 6, 7 y terminando en la apoptosis. Por otro lado la activación de Fas hace que la caspasa-8 provoque la escisión de Bid en tBid, lo que inducirá a cambios apoptogénicos mitocondriales.¹²⁹

6.2. La vía intrínseca

La vía intrínseca es desencadenada por una amplia variedad de estímulos que son originados en el interior de la célula, como hipoxia, stress oxidativo severo, activación de oncogenes o daño del ADN.¹³⁰

La vía intrínseca es mediada en la mitocondria, y en respuesta a estímulos apoptóticos, diversas proteínas son liberadas del espacio intermembranal de la mitocondria hacia el citoplasma.¹²⁸

Esta vía es la consecuencia de la liberación de proteína del interior de la mitocondria al citoplasma, como el citocromo c, considerado a la vez molécula proapoptótica, que van a activar a las caspasas, las que producirán finalmente la apoptosis.^{131, 132}

En tanto las proteínas anti-apoptóticas frenan la apoptosis bloqueando la liberación mitocondrial de citocromo-c, mientras que las proteínas pro-apoptóticas promueven

liberación de citocromo-c desde la mitocondria hacia el citoplasma. La vía intrínseca es regulada por las proteínas pro-apopticas (Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim y Hrk) y las anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 y Mcl-1), es decir, llevan a un balance adecuado lo que determina si se iniciara el proceso de apoptosis o no.¹³¹

Smac/DIABLO es una proteína mitocondrial a la vez segundo activador de caspasas ya que se une a las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP),¹³² entran al citoplasma e inactivan las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP) pretendiendo bloquear a las caspasas. Consideramos la más importante de estas proteínas proapoptóticas, el citocromo c, el cual se une y activa a la proteína factor 1 activador de la proteasa apoptótica (Apaf-1) en el citoplasma, lo que promueve que esta última se una a ATP/dATP y forme el apoptosoma, el cual se une la caspasa 9, activandola y originando que las caspasas adyacentes tales como las caspasas 3,6 y 7, se activen entre ellas mediante un proceso de autoamplificación.¹²¹

La proteína p53 protege al organismo del desarrollo de tumores mediante la apoptosis de células estresadas o dañadas. La proteína p53 puede mediar la apoptosis a partir de la regulación de bcl-2, de la superfamilia del receptor TNF y también de un modo independiente mediante la regulación de Fas o afectando al potencial de la membrana mitocondrial.^{118, 131}

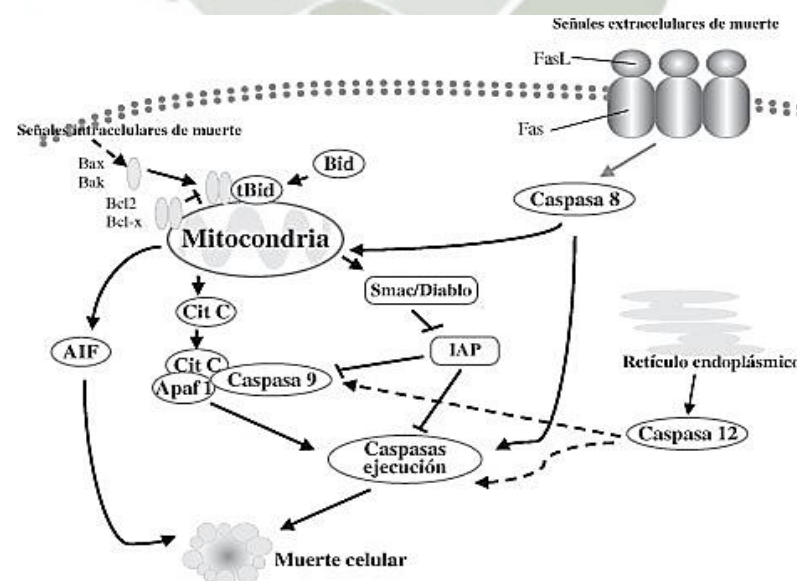


Fig. 2 Vía extrínseca e intrínseca de la inducción de la Apoptosis

7. ENSAYOS EN LÍNEAS CELULARES

7.1. Ensayo de Viabilidad

La inhibición del crecimiento de las células se determina mediante el ensayo colorimétrico CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay utilizado para determinar el número de células viables en ensayos de proliferación o citotoxicidad. El ensayo se fundamenta en su compuesto principal tetrazolio [3-(4,5-dimetil-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolio (MTS) y un reactivo de acoplamiento de electrones el etosulfato de fenazina (PES)¹³³. El MTS, es un colorante de tetrazolio, se reduce por hidrogenasas en las células vivas formando el producto formazán soluble en agua y además soluble en medio de cultivo tisular.¹³⁴

La absorbancia del producto formazán puede ser cuantificada en una longitud de onda comprendida entre 490-500 nm.¹³³

La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido, es decir la cantidad de producto de color formado es proporcional al número de células y el tiempo de incubación de las células.^{135, 136} Este ensayo MTS se realiza añadiendo el reactivo directamente en el medio de cultivo celular sin los pasos intermitentes, que son necesarios en otros ensayos que tienen el mismo fin.¹³⁷

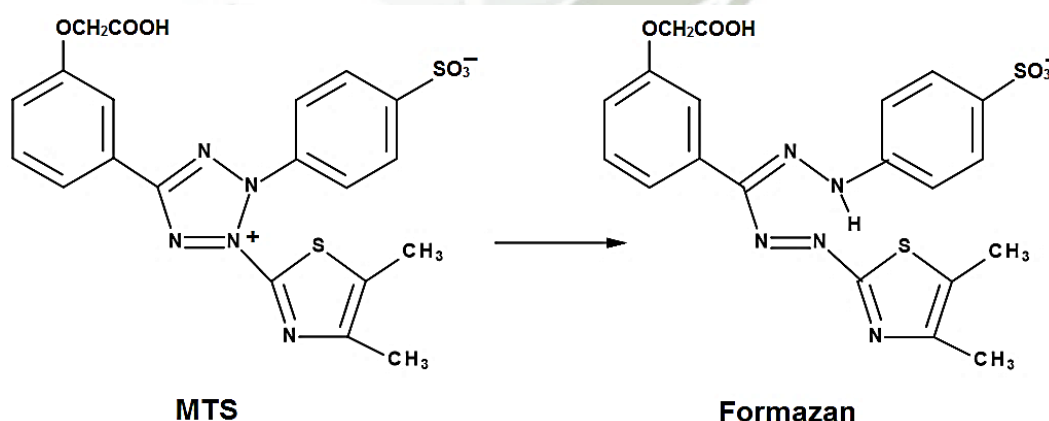


Fig. 3 Estructuras de MTS tetrazolio y su producto de formazán

7.2. Caspasas

The Caspase-Glo® 3/7 Assay es un ensayo luminiscente homogéneo que mide la actividad de las caspasas 3 y 7. El ensayo brinda un sustrato DEVD (Asp-Glu-Val-Asp) - caspasa aminoluciferin que es un proluminescente y una luciferasa termoestable que tiene la propiedad de ser un reactivo optimizado para la actividad de las caspasas 3 y 7. Se espera los resultados en la lisis celular, seguido por la escisión del sustrato caspasa. Esto libera aminoluciferin libre, que se consume por la luciferasa, generando una señal luminiscente. La señal es proporcional a la actividad de las caspasas 3 y 7. Este ensayo está diseñado para uso con formatos de placa de múltiples pocillos utilizando ya sea enzima purificada o células en cultivo.¹³⁸

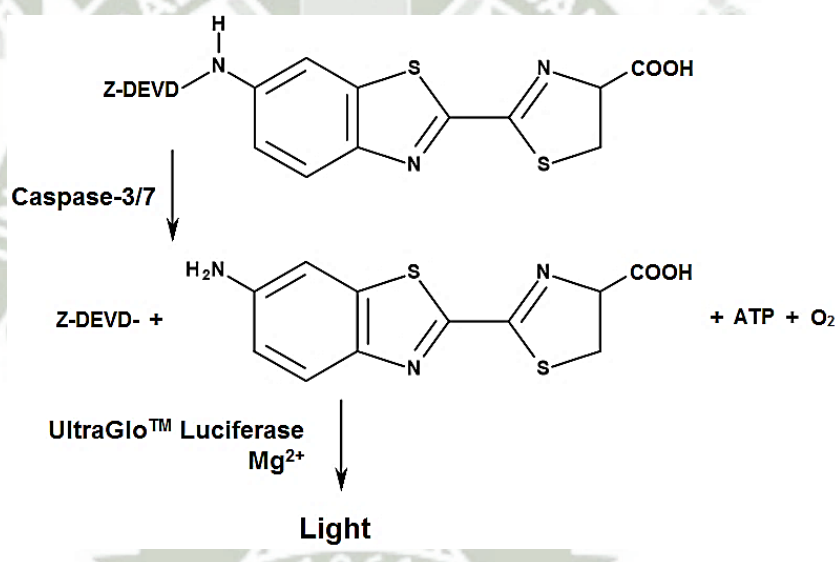


Fig. 4 Escisión Caspasa -3/7 del sustrato luminógeno que contiene la secuencia DEVD

7.3. Lactato Deshidrogenasa

El ensayo LDH Cytotoxicity Assay™ proporciona un método colorimétrico simple, confiable para la cuantificación de los ensayos de citotoxicidad celular. El kit se puede

usar con diferentes tipos de células y de esta manera medir la citotoxicidad mediada por compuestos químicos.¹³⁹

La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima citosólica presente en muchas líneas celulares. El daño en la membrana celular se da por la fuga de la enzima LDH en el medio de cultivo celular. La enzima LDH extracelular se puede cuantificar mediante una reacción enzimática acoplada en la que LDH cataliza la conversión de lactato a piruvato a través de la reducción de NAD^+ a NADH. A continuación la diaforasa, utiliza NADH para reducir una sal de tetrazolio (INT) a un producto formazán rojo que se puede medir a 490 nm. El nivel de formación de formazán es directamente proporcional a la cantidad de LDH liberada en el medio, que es indicativa de la citotoxicidad.¹³⁹

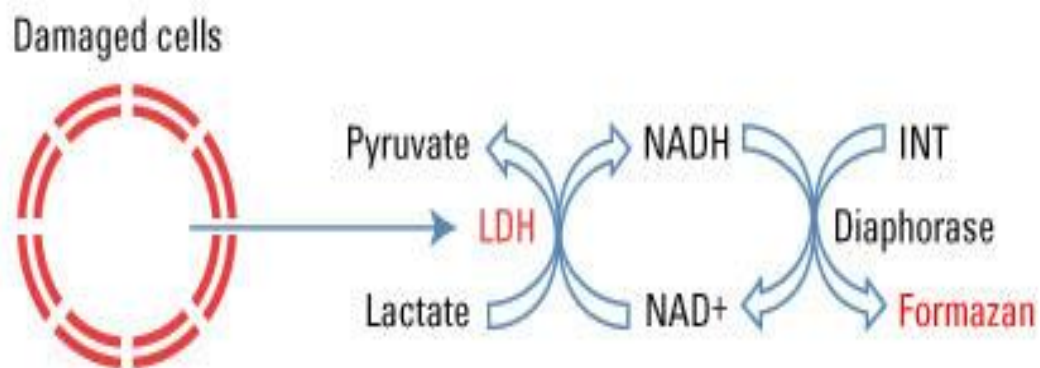


Fig. 5 Esquema del mecanismo LDH de ensayo de citotoxicidad



CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

1.1. Material Biológico

La línea celular adenocarcinomas ascitis metastásicas pancreáticas humanas ASPC-1 (CRL-1682) fueron adquiridas de la casa ATCC, se utilizó una suspensión de estas usando como medio base al Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (cuya composición es básicamente 2mM L-glutamina, HEPES 10mM, piruvato de sodio 1 mM, 4 500 mg/L de glucosa y 1 500 mg/L de bicarbonato de sodio) de la casa ATCC, para enriquecimiento del medio se adicionó suero fetal bovino (10%) y para mantener su esterilidad se adicionó una solución de penicilina - estreptomina (10 000 unidades/mL de Penicilina, 10 000 µg/mL de estreptomina) de la casa HyClone. La suspensión de células se realizó usando una solución de tripsina-EDTA (0.25%) de la casa ATCC.

Para la obtención del cultivo celular se usó una incubadora de CO₂ con camisa de aire de la casa VWR® International. Para el ensayo de exclusión celular se utilizó el Cellometer Auto T4 (contador automático de células) de Nexcelom que se muestra en la **Fig.6**. Para el ensayo de viabilidad celular se usó el reactivo CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay de la casa Promega, microplacas de 96 pocillos estériles de la casa Thermo Scientific y el equipo de la **Fig.7** llamado Synergy HT (Lector multimodal de microplacas) de Bio-Tek.

Para el ensayo de la activación de Caspasas 3 y 7 se usó el reactivo de Caspase-Glo® -3/7 Assay de la casa Promega, microplacas blancas de 96 pocillos estériles de la casa Thermo Scientific y el equipo Synergy HT (Lector multimodal de microplacas) de Bio-Tek.

Para el ensayo de Citotoxicidad se usó el reactivo de LDH Cytotoxicity Assay Kit de la casa Thermo Scientific, microplacas negras de 96 pocillos estériles de la casa Thermo Scientific y el equipo Synergy HT (Lector Multimodal de microplacas) de Bio-Tek. Estos procedimientos se realizaron en una cabina de bioseguridad (CB) clase II tipo A2 de la casa ESCO de la **Fig.8**.



Fig. 6 Contador Automático de células Cellometer Auto T4.



Fig.9 Microscopio Óptico Invertido Olympus@CKX31

1.3. Reactivos

Los reactivos utilizados fueron, dimetil sulfoxido (DMSO), tripsina-EDTA, buffer fosfato salino (PBS), alcohol al 70% y Lejía.

Buffer de Casspase-Glo@3/7 de la casa Promega, sustrato de Casspase-Glo@3/7 de la casa Promega. Buffer de lisis, solución de parada, control positivo, sustrato de mezcla y el buffer de ensayo del Kit LDH Cytotoxicity de la casa Thermo Scientific. El kit completo de LDH Cytotoxicity se muestra en la **Fig.10**.

La molécula 1-(3'-(1-(2-(4-morfolinil)etil)1H-pirazol-3-il)-3-bifenilil)etanona (Antagonista LRH-1) se obtuvo de la casa Calbiochem® EMD Millipore como se observa en la **Fig.11**.

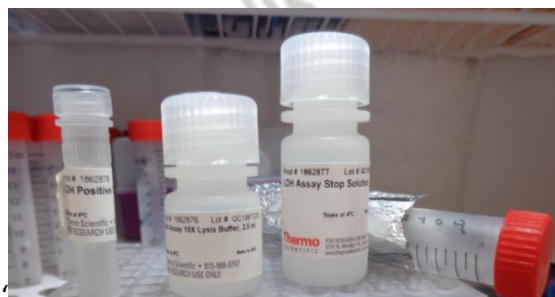


Fig.10 Kit de LDH Cytotoxicity de la casa Thermo Scientific

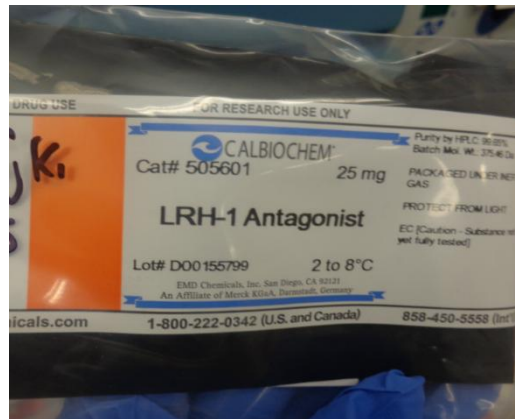


Fig.11 Antagonista LRH-1 de la casa Calbiochem® EMD

2. MÉTODOS

2.1. Soluciones a distintas concentraciones del Antagonista LRH-1

El primer paso consistió en disolver los 25 mg de molécula Antagonista LRH-1 en 2 mL de la solución DMSO, obteniendo una solución stock de 33 290 μM .

$$(25 \text{ mg}) \left(\frac{1 \text{ mmol}}{375.46 \text{ mg}} \right) = 0.006658 \text{ mmol} = 66.58 \text{ umol}$$

$$\left(\frac{66.58 \text{ umol}}{2 \text{ mL}} \right) = \left(\frac{33.29 \text{ umol}}{1 \text{ mL}} \right) \left(\frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \right) = 33290 \frac{\text{umol}}{\text{L}} = 33290 \text{ uM}$$

A partir de ella se preparó diluciones a distintas concentraciones en un rango entre 0.1 a 100 μM , cada una con 10% de DMSO y se llevaron al volumen deseado con PBS, se utilizó PBS por ser una solución isotónica de pH 7.4 y por su baja toxicidad en las células. Al mismo tiempo se preparó 1mL de una solución control que contenía 10% de DMSO y el resto PBS.

Se utilizó un volumen de 10 μL de cada una de las diluciones preparadas a partir del Stock que se muestran en la **Tabla 1**. Las concentraciones de las diluciones vertidas

en cada uno de los pocillos de 200 μL , fueron diluidas nuevamente obteniendo las concentraciones en el pocillo que se muestra en la **Tabla 1**.

$$C1 * V1 = C2 * V2$$
$$X \mu\text{M} * 10 \mu\text{L} = 0.05 \mu\text{M} * 200 \mu\text{L}$$
$$C = 1 \mu\text{M}$$

Tabla 1: Concentraciones del Antagonista LRH-1

Diluciones a partir del Stock (μM)	Concentraciones en el pocillo de 200 μL (μM)
1	0.05
2	0.1
6	0.3
10	0.5
30	1.5
60	3
100	5
200	10
400	20
600	30
800	40
2000	100

Fuente: Elaboración propia

Para la elaboración de cada dilución establecida en la **Tabla 1**, se preparó 1 000 μL de cada una de las diluciones con 10% de DMSO. Para facilitar la medición, se preparó en primer lugar aquellas concentraciones altas como la de

2000 μ M, 800 μ M, 600 μ M y 400 μ M bajo el procedimiento que se muestra en la **Tabla 2**, a partir de ellas el resto de las concentraciones. Posterior a ello, se determinó el volumen de DMSO y PBS que deberían contener cada una de las concentraciones para obtener un volumen final de 1000 μ L.

$$C1 * V1 = C2 * V2$$

$$33290 \mu M * V = 2000 \mu M * 1000 \mu L$$

$$V = 60.08 \mu L \text{ que contiene } 100\% \text{ de DMSO}$$

Tabla 2: Preparación de Dilución de 2000 μ M

2000 μM (10% DMSO)	
Volumen del Stock Original	60.08 μ L
Nuevo Volumen de DMSO	39.92 μ L
Nuevo Volumen de PBS	900 μ L

Fuente: Elaboración propia

2.2. Cultivo celular

2.2.1. Preparación del Medio

Se preparó el medio para el cultivo celular utilizando frascos de medio RPMI 1640 de 500 mL. El Medio fue enriquecido con suero fetal bovino (FBS) de la siguiente manera: Se retiró 50 mL de RPMI 1640, luego se añadió 50 mL de FBS, llegando a una concentración final de este del 10%; por último se añadió 5 mL de una solución de penicilina - estreptomina (10 000 unidades/mL de Penicilina, 10 000 μ g/mL de estreptomina), llegando a una concentración final de 1%.

2.2.2. Obtención del primer pasaje celular

Las células adenocarcinomas ascitis metastásicas pancreáticas humanas ASPC-1 son criopreservadas en viales dentro de tanques criogénicos con una fase de vapor de nitrógeno líquido, que están a una temperatura de -190°C .

Se sacó el vial que contiene la suspensión primaria de las células ASPC-1 del tanque de criogenización y se llevó a baño maría a 37°C por un periodo de 2 minutos. Luego se transfirió el contenido del vial a un tubo de centrifuga que contenía 9 mL de medio enriquecido y se centrifugó a 1 000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente, el sedimento celular se resuspendió y se adicionó 30 mL del medio RPMI 1640 enriquecido con FBS y se transfirió a un frasco estéril. Finalmente se llevó el frasco a la incubadora de 37°C con una atmósfera de 5% de CO_2 y 95% de aire por 3 días.

2.3. Método de exclusión celular

2.3.1. Obtención de la suspensión de células

Luego de la incubación durante 3 días, se llevó el frasco a la CB, allí se descartó el medio en un recipiente que contenía lejía para evitar una posible contaminación biológica, seguidamente quedando una capa de células, se lavó rápidamente con 4 mL de tripsina para eliminar todos los rastros de suero que contienen el inhibidor de tripsina, posteriormente se volvió añadir 8 mL de tripsina para despegar la capa de células adheridas al frasco, puesto que la tripsina es una enzima peptidasa, que tiene por función romper los enlaces peptídicos. Luego de despegar completamente a las células se incubó el frasco a 37°C con una atmósfera de 5% de CO_2 y 95% de aire durante 15 minutos, agitando suavemente cada 5 minutos.

A continuación, se removieron los grumos y se transfirió todo el contenido a un tubo de centrifugación de 50 mL, luego se centrifugó durante 5 minutos a 1 000 rpm, se desechó el líquido sobrenadante, seguidamente se resuspendió las células con 30 mL de medio enriquecido con FBS.

De la suspensión obtenida se colocan 15 mL en un nuevo frasco estéril, adicionando el medio enriquecido con FBS hasta completar un volumen de 30 mL. Finalmente se llevó el frasco a la incubadora de 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de aire.

2.3.2. Cambio de Medio

El objetivo del cambio de medio es renovar los nutrientes y evitar la acumulación de células muertas, usualmente se realiza un cambio de medio cada 48 horas. Para el cambio de medio se desechó el contenido del frasco, y se añadió 30 mL de nuevo medio enriquecido con FBS, posteriormente se llevó a la incubadora de 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de aire.

2.3.3. Ensayo de Exclusión celular

Se colocó 20 µL de la suspensión celular previamente preparada en la cámara de recuento celular desechable (CRCD), la cual debió estar completamente cubierta por la suspensión celular, posteriormente se colocó la CRCD en el Cellometer Auto T4 (contador automático de células). En el software del equipo se programó los parámetros correspondientes indicando el tipo de células a contar, en este caso las células ASPC-1, además se colocó el tipo de disolución que en nuestro caso fue de 1/1. Finalmente se eligió la opción contar, luego el equipo mostró el número de células viables/mL de suspensión celular y el porcentaje de células viables. El porcentaje de células viables tiene que ser mayor al 90% para proseguir con los ensayos posteriores.

2.4. Diseño Experimental

2.4.1. Viabilidad Celular frente al tratamiento

Se trabajó con tres grupos de estudio, el primero consta de concentraciones de 10 µM, 20 µM, 30 µM y 40 µM del Antagonista LRH-1, teniendo como referencia la

única investigación realizada con la molécula del Antagonista LRH-1 en células ASPC-1, siendo nuestro objetivo corroborar el efecto evidenciado por Benod y colaboradores.⁶

El segundo grupo consta de 1 μM , 3 μM , 10 μM , 30 μM y 100 μM del Antagonista LRH-1, donde se evaluó un mayor efecto del Antagonista LRH-1 a una mayor concentración y el efecto del Antagonista LRH-1 a una menor concentración sobre la viabilidad de las células ASPC-1.

El tercer grupo consta de concentraciones más bajas tales como 0.05 μM , 0.1 μM , 0.3 μM , 0.5 μM , μM , 1.5 μM , 3 μM y 5 μM del Antagonista LRH-1, cuyo objetivo es el mismo descrito anteriormente, además se buscó obtener al mismo tiempo la mínima concentración que tenga efecto sobre la viabilidad las células ASPC-1.

Una vez realizado el ensayo de exclusión celular, se trabajó a partir de la suspensión de células, estas fueron colocadas en placas de 96 pocillos a una concentración de 10 000 células/pocillo, para esto se calculó el volumen de suspensión que contuviera la cantidad de células mencionadas.

Luego se añadió a los pocillos el medio enriquecido con FBS hasta completar un volumen de 190 μL , seguidamente se añadió 10 μL del Antagonista LRH-1 en las distintas concentraciones mencionadas, excepto al grupo control que sólo posee los diluyentes como el DMSO 10% (0.5% en el pocillo de 200 μL) y el PBS mas no el Antagonista LRH-1, posterior a ello, se dejó incubar por 24 horas a 37°C en una atmosfera de 5% de CO₂ y 95% de aire, todo este procedimiento se realizó por quintuplicado.

Luego de la incubación de las placas, se agregó 10 μL del reactivo CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay a cada pocillo. Este reactivo tiene un compuesto de tetrazolio [3-(4,5-dimetil-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS) y se incubó por 3 horas, el MTS fue reducido por las células vivas formando el producto formazán obteniéndose una coloración azulada en

el medio. Después de la incubación se llevó la placa al equipo Synergy HT (Lector multimodal de microplacas), donde se midió la absorbancia de cada pocillo a 490 nm, ésta absorbancia es directamente proporcional al número de células vivas en el cultivo.

2.4.2. Determinación de la actividad de Caspasas-3/7

Esta determinación se realizó usando microplacas blancas de luminiscencia. Se trabajó con un blanco que constaba solo de medio enriquecido con FBS, un grupo control negativo con 10 000 células/pocillo y dos grupos tratados con el Antagonista LRH-1 a diferentes concentraciones con 10 000 células/pocillo cada uno, todos los grupos fueron llevados a un volumen final de 90 μ L con el medio RPMI 1640 enriquecido con FBS. Seguidamente, se cubrió la placa y se dejó incubar por 24 horas a 37°C con una atmósfera de 5% CO₂ y 95% aire.

Luego de 24 horas, se desechó el medio de las microplacas, al blanco se añadió 10 μ L de DMSO (0.5%) con PBS (buffer fosfato salino), al grupo control negativo 10 μ L de DMSO (0.5%) con PBS, 10 000 células/pocillo, al grupo a tratar se le añadió 10 μ L del Antagonista LRH-1 al 1.5 μ M y al 10 μ M. Posteriormente se les adicionó a todos los grupos 90 μ L del medio RPMI 1640 sin FBS. Seguidamente, se incubó por 1 hora a 37°C con una atmósfera de 5% CO₂ y 95% aire, además se adicionó 100 μ L del reactivo de Caspase-Glo®-3/7 Assay y se realizó las respectivas mediciones de luminiscencia en diferentes tiempos de 3 y 6 horas, utilizando el equipo Synergy HT (Lector multimodal de microplacas) de Bio-Tek.

2.4.3. Determinación de la citotoxicidad

Para llevar a cabo el ensayo de citotoxicidad y teniendo en cuenta la suspensión celular, se trabajó con un grupo control negativo que contuvo 10 000 células/pocillo con 10 μ L de agua ultrapura, un grupo control positivo con solo 10 000 células/pocillo, y el grupo a tratar con 10 μ L del Antagonista LRH-1 a una concentración de 10 μ M, todos llevados a un volumen final de 100 μ L con el medio RPMI 1640 enriquecido.

Se dejó incubar por 24 horas a 37°C con una atmósfera de 5% CO₂ y 95% aire. Posteriormente, se añadió al grupo control positivo 100 µL del Buffer de lisis del kit de LDH Cytotoxicity Assay y se llevó a incubar por 45 minutos bajo las mismas condiciones. Seguidamente, se transfirió 50 µL de cada pocillo a otra microplaca. Además, se añadió 50 µL del reactivo de Mixtura del kit de LDH Cytotoxicity Assay y 50 µL del reactivo de solución de parada del kit de LDH Cytotoxicity Assay a todos los grupos. Finalmente se dio lectura en el equipo Synergy HT (Lector multimodal de microplacas) de Bio-Tek a las longitudes de onda de 490nm y 680nm.

2.5. Métodos estadísticos

Los resultados fueron expresados como media \pm SEM, además de las pruebas de significancia como la prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido del test de Dunnet para comparaciones múltiples, a una $p < 0.05$, para esto se utilizó el software estadístico SigmaPlot 12.5.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Cultivo Celular

El desarrollo y comportamiento de la línea celular ASPC-1 fue óptimo, se obtuvo la confluencia deseada mayor al 80% y la viabilidad celular esperada mayor a 90%, debido a que se le brindó las condiciones adecuadas. Su crecimiento fue favorecido por el medio selectivo RPMI 1640. Las imágenes de cuyo crecimiento fueron realizadas por el microscopio óptico invertido con un objetivo de 10X (**Fig.9**).

En la **Fig.12** se evidencia la adaptación de las células ASPC-1 tras 12 horas de incubación y el inicio del desarrollo gracias a los factores de crecimiento aportados por el medio enriquecido.

Como es de esperar en la **Fig.13** a las 24 horas de incubación se aprecia los cambios morfológicos, el crecimiento e incremento de confluencia celular, sin embargo en la **Fig.14** tras las 48 horas de incubación, ya se observa de manera definida su morfología

así como una confluencia adecuada para los siguientes estudios o realización de nuevos pasajes (nueva generación de células).

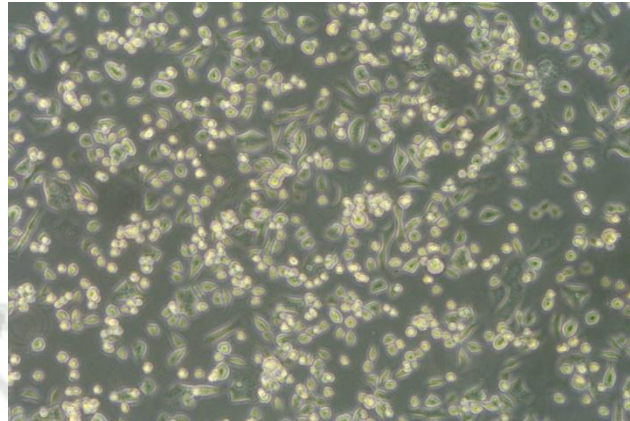


Fig.12 Desarrollo de Células ASPC-1 a 12 horas de incubación

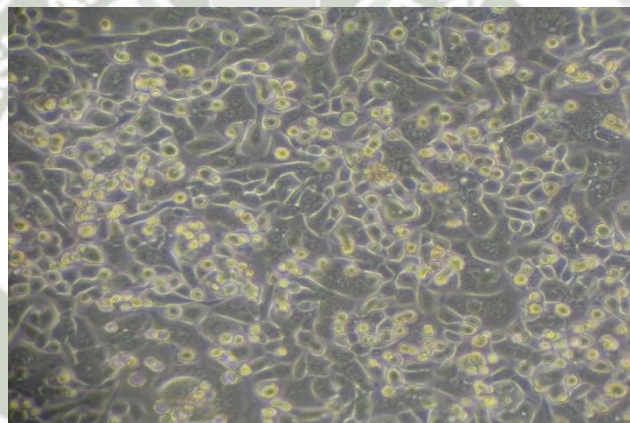


Fig.13 Desarrollo de Células ASPC-1 a 24 horas de incubación

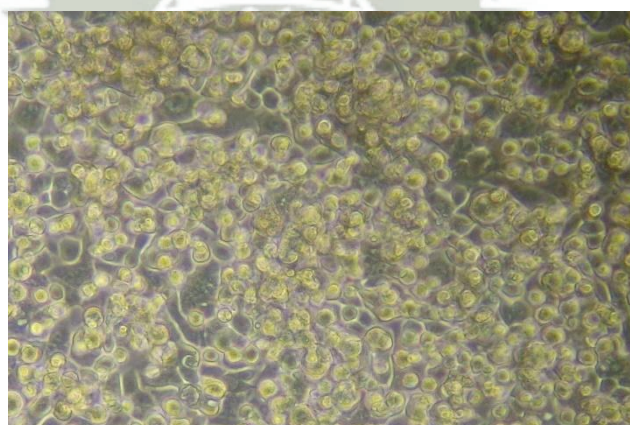


Fig.14 Desarrollo de Células ASPC-1 a 48 horas de incubación

La línea celular utilizada en este estudio presentó un crecimiento característico de las células en cultivo. Una fase inicial latente cuya duración puede ser variable puesto a que las células ASPC-1 se encuentran en un proceso de adaptación a las condiciones ambientales brindadas. El crecimiento exponencial se logró satisfactoriamente en las Células ASPC-1 debidos a los factores de crecimientos adecuados proporcionados por el medio selectivo para esta línea celular.

2. Exclusión celular y porcentaje de células viables en la suspensión celular

En la **Tabla 3** se muestra el conteo celular y el porcentaje de células viables en los 20 μL de la suspensión celular por cada frasco, las células ASPC-1 tienden a desarrollarse con mucha rapidez, al cabo de 48 horas se puede observar una confluencia mayor a 80%, es por ello que es muy fácil realizar la suspensión celular y determinar la viabilidad celular, que fue en promedio 96% siendo mayor a 90% requerido como parámetro en todas las determinaciones.

Tabla 3: Conteo celular y porcentaje de viabilidad de las células ASPC-1.

Línea Celular ASPC-1	
Células/mL	% Células viables
9.38×10^5	97%
8.43×10^5	97%
4.12×10^5	91%
6.31×10^5	95%
2.23×10^5	94%
6.74×10^5	97%
7.51×10^5	95%
7.06×10^5	97%

6.17 x 10⁵	97%
8.87 x 10⁵	97%
Promedio	96%
Desviación Estándar	2%

Fuente: Elaboración Propia

3. Análisis de la Determinación de la Viabilidad Celular frente al tratamiento

Seguidamente se determinó la viabilidad celular frente al efecto del Antagonista LRH-1 sobre la línea celular mencionada, cuyos resultados comparados con el grupo control muestran su efectividad a distintas concentraciones.

El porcentaje de viabilidad celular frente al tratamiento fue estimado al comparar las absorbancias de los grupos de estudio, con el promedio de las absorbancias del grupo control que es 100% viable.

Las imágenes del microscopio óptico invertido vistas con un objetivo de 10X de las células ASPC-1 tratadas con el Antagonista LRH-1 a concentraciones de 10 μM de la **Fig.15**, 20 μM de la **Fig.16**, 30 μM de la **Fig.17** y 40 μM de la **Fig.18** muestran a simple vista el efecto del Antagonista LRH-1 guardando relación con el primer grupo de estudio que se observan en la **Fig.19** y **Tabla 4**, donde los efectos antineoplásicos del Antagonista LRH-1 han sido analizados *in vitro* a concentraciones de 10 μM , 20 μM , 30 μM y 40 μM mediante ensayos de proliferación como el MTS. Las lecturas de absorbancias realizadas por el lector multimodal Synergy HT del primer grupo de estudio y el análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía se pueden observar en el ANEXO 1.

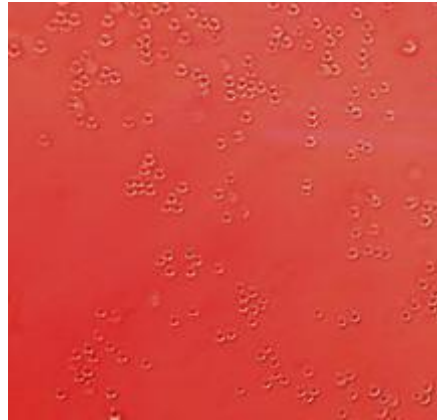


Fig.15 Células ASPC-1 tratadas con 10 μ M del Antagonista LRH-1

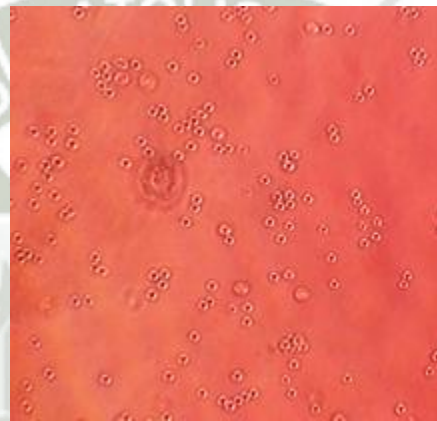


Fig.16 Células ASPC-1 tratadas con 20 μ M del Antagonista LRH-1

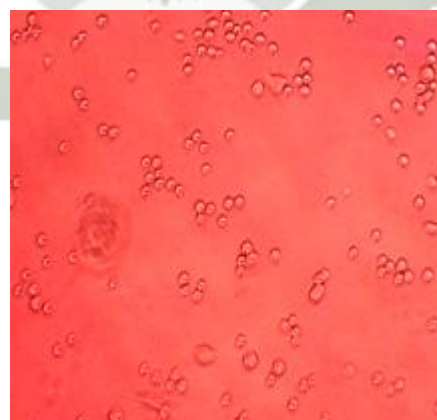


Fig.17 Células ASPC-1 tratadas con 30 μ M del Antagonista LRH-1

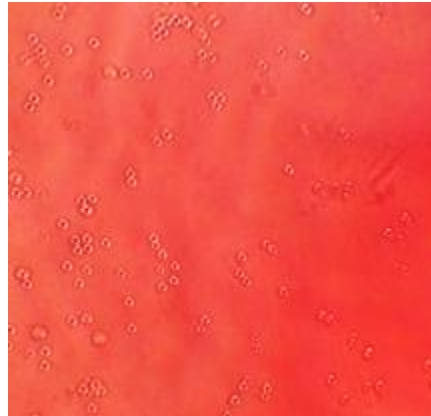


Fig.18 Células ASPC-1 tratadas con 40 μM del Antagonista LRH-1

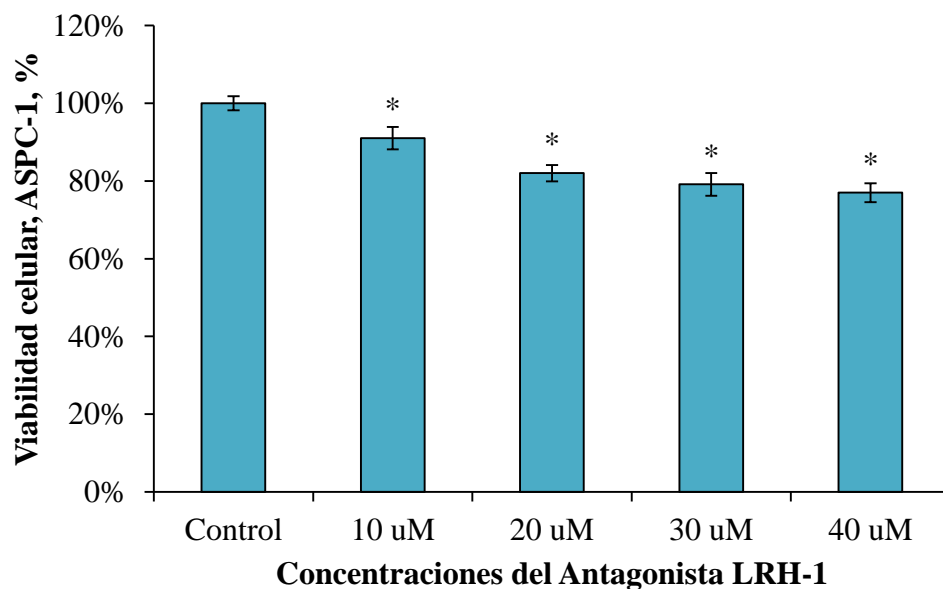


Fig.19 Antagonista LRH-1 inhibe la proliferación de células de cáncer pancreático ASPC-1. La proliferación celular en el cáncer de páncreas se mide y se compara en la ausencia y la presencia del efecto de las diferentes concentraciones del Antagonista LRH-1 en relación con el control (DMSO 0.5% y PBS) en las células ASPC-1. Los datos muestran que existe diferencia significativa en todas las concentraciones respecto al grupo control tal como se evidencia en la **Tabla 5**. Se representan la media y el

error estándar (n=5; *p<0.05, diferencias significativas respecto al control negativo, ANOVA de una vía y *post-hoc* Dunnett).

Tabla 4: Promedio del porcentaje de viabilidad celular afectada por distintas concentraciones del Antagonista LRH-1

Control	10 μ M	20 μ M	30 μ M	40 μ M
100%	91%	82%	79%	77%

Fuente: Elaboración Propia

Tabla 5: Diferencias Significativas del Primer Grupo de Estudio

Concentraciones	Media A490nm	Media %	Grupos Homogéneos
Control	1.0000	100%	X
10 μ M	0.9077	91%	X
20 μ M	0.8202	82%	X
30 μ M	0.7912	79%	X
40 μ M	0.7745	77%	X

Fuente: Elaboración Propia

Los resultados de la viabilidad celular muestran que las células ASPC-1 al ser tratadas con las diferentes concentraciones del primer grupo de estudio del Antagonista LRH-1 son consistentes y se evidencia el efecto antineoplásico del Antagonista LRH-1 en las células ASPC-1 *in vitro* habiendo diferencia significativa en todas las concentraciones comparadas con el grupo control (células sin daño alguno). Cabe recalcar que los resultados mostrados de la efectividad del primer grupo de estudio, ratifican y guardan semejanza al estudio de Benod y colaboradores, tras el descubrimiento de la molécula Antagonista LRH-1⁶.

Las imágenes microscópicas mostraron una disminución de células ASPC-1 a simple vista tras ser tratadas con el Antagonista LRH-1 del primer grupo de estudio, lo cual guarda coherencia con los resultados señalados.

El segundo grupo de estudio con concentraciones de 1 μM , 3 μM , 10 μM , 30 μM y 100 μM , del Antagonista LRH-1, evidenció tener efectividad antineoplásica del Antagonista LRH-1 en las células ASPC-1 *in vitro*, al igual que el primer grupo de estudio, tal y como se observa en la **Fig.20** y **Tabla 6** mediante ensayos de proliferación como el MTS. Las lecturas de absorbancias realizadas por el lector multimodal Synergy HT del segundo grupo de estudio y el análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía se pueden observar en el ANEXO 2.

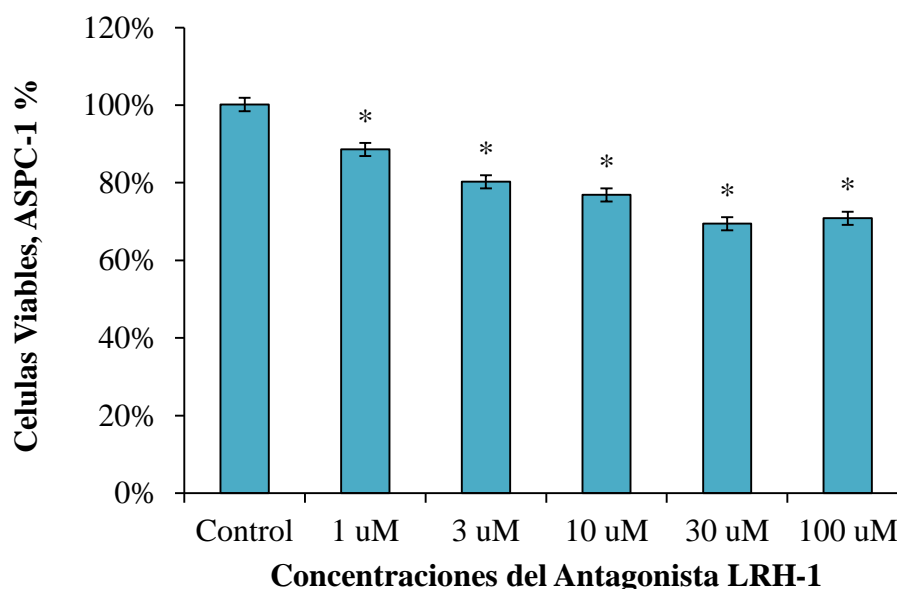


Fig.20 Antagonista LRH-1 inhibe la proliferación de células de cáncer pancreático ASPC-1. La proliferación celular en el cáncer de páncreas se mide y se compara en la ausencia y la presencia del efecto del Antagonista LRH-1 en diferentes concentraciones en relación con el control (DMSO 0.5 % y PBS) en las células ASPC-1. Los datos muestran que existe diferencia significativa en todas las concentraciones respecto al grupo control tal como se evidencia en la **Tabla 7**. Se representan la media y el

error estándar (n=5; *p<0.05, diferencias significativas respecto al control negativo, ANOVA de una vía y *post-hoc* Dunnett).

Tabla 6: Promedio del porcentaje de viabilidad afectada por distintas concentraciones del Antagonista LRH-1

Control	1 μ M	3 μ M	10 μ M	30 μ M	100 μ M
100%	89%	80%	77%	69%	71%

Fuente: Elaboracion Propia

Tabla 7: Diferencias Significativas del Segundo Grupo de Estudio

Concentraciones	Media A490nm	Media %	Grupos Homogéneos
Control	1.0027	100%	X
1 μ M	0.8890	89%	X
3 μ M	0.8008	80%	X
10 μ M	0.7675	77%	X
30 μ M	0.6922	69%	X
100 μ M	0.7089	71%	X

Fuente: Elaboracion Propia

Los resultados de la viabilidad celular muestran que las células ASPC-1 al ser tratadas con las concentraciones del segundo grupo de estudio del Antagonista LRH-1 son consistentes, y se recalca el efecto antineoplásico del Antagonista LRH-1 en las células ASPC-1 *in vitro*, habiendo diferencia significativa en todas las concentraciones en relación al grupo control (células sin daño alguno).

Se quiso obtener un mayor efecto del Antagonista LRH-1 a una concentración de 100 μM y se evidenció que su efecto es significativo comparado con el grupo control, sin embargo, no se observó un mayor efecto frente al resto de las concentraciones. De la misma manera se quiso determinar el efecto del Antagonista LRH-1 a una menor concentración tales como 1 μM y 3 μM . Se evidenció que el efecto de ambas concentraciones es estadísticamente significativo comparado con el grupo control.

El tercer grupo de estudio que comprende concentraciones de 0.05 μM , 0.1 μM , 0.3 μM , 0.5 μM , 1.5 μM , 3 μM y 5 μM , mostraron poseer el mismo afecto antineoplásico del Antagonista LRH-1 excepto el de menor concentración (0.05 μM) frente a las células ASPC-1, tal y como se observa en la **Fig.21** y **Tabla 8** mediante ensayos de proliferación como MTS. Las lecturas de absorbancias realizadas por el lector multimodal Synergy HT del tercer grupo de estudio y el análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía se pueden observar en el ANEXO 3.

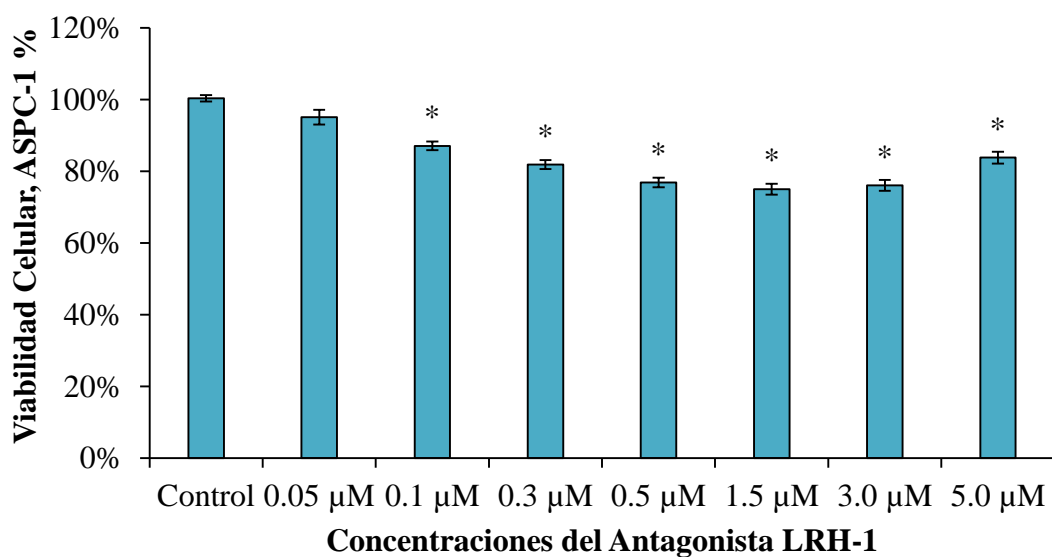


Fig.21 Antagonista LRH-1 inhibe la proliferación de células de cáncer pancreático ASPC-1. La proliferación celular en el cáncer de páncreas se mide y se compara en la ausencia y la presencia del efecto de las diferentes concentraciones del Antagonista LRH-1 en relación con el control (DMSO 0.5% y PBS) en las células ASPC-1. Los datos muestran que existe

diferencia significativa en las concentraciones de 0.1 μM , 0.3 μM , 0.5 μM , 1.5 μM , 3 μM y 5 μM respecto al grupo control, pero no a la concentración de 0.05 μM tal como se evidencia en la **Tabla 9**. Se representan la media y el error estándar (n=5; *p<0.05, diferencias significativas respecto al control negativo, ANOVA de una vía y *post-hoc* Dunnett).

Tabla 8: Promedio del porcentaje de viabilidad afectada por distintas concentraciones del Antagonista LRH-1

Control	0.05 μM	0.1 μM	0.3 μM	0.5 μM	1.5 μM	3.0 μM	5.0 μM
100%	95%	87%	82%	77%	75%	76%	84%

Fuente: Elaboración Propia

Tabla 9: Diferencias Significativas del Tercer Grupo de Estudio

Concentraciones	Media A490nm	Media %	Grupos Homogéneos
Control	1.0041	100%	X
0.05 μM	0.9494	95%	X
0.1 μM	0.8682	87%	X
0.3 μM	0.8184	82%	X
0.5 μM	0.7658	77%	X
1.5 μM	0.7490	75%	X
3 μM	0.7575	76%	X
5 μM	0.8360	84%	X

Fuente: Elaboración Propia

Los resultados de la viabilidad celular muestran que las células ASPC-1 al ser tratadas con el tercer grupo de estudio del Antagonista LRH-1 son los esperados, y es evidente

el efecto del Antagonista LRH-1 en las células ASPC-1, habiendo diferencia significativa en la mayoría de las concentraciones en relación al grupo control (células sin daño alguno) excepto en el de menor concentración. Es decir, el Antagonista LRH-1 a una concentración menor o igual $0.05 \mu\text{M}$ pierde su efecto, debido a que evidenció no poseer diferencia significativa frente al grupo control.

En trabajos de investigación realizados con anterioridad por Benod y colaboradores, en el 2013, descubrió varios análogos del Antagonistas LRH-1, afirmando que de todas las moléculas utilizadas, el compuesto descrito en este trabajo de investigación, logra un bloqueo selectivo de la función del receptor LRH-1, considerando que el Antagonista LRH-1 actúa como un siRNA (silenciador de ARN) específico del receptor o que su función inhibitoria es dada por manipulaciones genéticas, dando finalmente un resultado en la inhibición del crecimiento y la proliferación de las células cancerosas que expresan el receptor LRH-1⁶. Benod et. al., 2013, se basó en antecedentes investigativos donde los efectos inhibitorios son realizados para lograr la atenuación de los genes que controlan el crecimiento celular, la proliferación y la diferenciación, tal y como Botrugno et. al., 2004, manifiesta en su estudio del receptor LRH-1.¹⁰⁹

Lin et. al., 2014, manifiesta que la expresión de los genes del receptor LRH-1 y los posibles antagonistas están bajo investigación para el análisis de los diversos mecanismos biológicos del receptor LRH-1. En resumen, su estudio reveló que la sobreexpresión del receptor LRH-1 promueve la proliferación celular, la formación de tumores y la angiogénesis. Además, sus observaciones demuestran que el receptor LRH-1 puede jugar un papel crucial para impulsar el crecimiento de tumores del cáncer de páncreas, como otros investigadores lo afirmaron.⁷

El ensayo de MTS no proporciona información útil con respecto a la vía de la muerte celular activado por el Antagonista LRH-1. Sin embargo, cuando se combina con la pérdida de LDH por la lesión a nivel de la membrana celular, el ensayo MTS puede proporcionar algunas pistas para dilucidar la posible ruta de la muerte de las células ASPC-1 del cáncer de páncreas.

4. Análisis de la Determinación de la Activación de Caspasas

Con el fin de conocer las vías de señalización implicadas en la inducción de la apoptosis, se realizó un estudio *in vitro* donde se evidenció si la molécula Antagonista LRH-1 induce la activación de caspasas 3 y 7 utilizando la caspasa - Glo -3/7 en células ASPC-1. Los resultados fueron en base a un control (DMSO 0.5% y PBS) y dos concentraciones del Antagonista LRH-1, 1.5 μM y 10 μM , estas determinaciones se realizaron en el lapso de 3 horas y 6 horas. En la **Fig.22** se aprecia que el nivel de actividad de las caspasas 3 y 7 se incrementaron después de 3 horas de tratamiento en ambas concentraciones; sin embargo, en la **Fig.23** tras 6 horas de tratamiento sólo había un aumento significativo en la concentración de 10 μM con poco o ningún cambio en la concentración de 1.5 μM .

Estos resultados implican que el Antagonista LRH-1 puede inducir la apoptosis de las células cancerosas ASPC-1 en su fase inicial del tratamiento, y que las diferentes concentraciones juegan un rol distinto. La activación de caspasas por el Antagonista LRH-1 han sido analizados *in vitro* a concentraciones de 1.5 μM y 10 μM en el lapso de 3 horas, tal y como se observa en la **Fig. 22** mediante el Kit Caspases-3/7Glo. La lectura de nivel de actividad de caspasas (RLU) tras 3 horas de tratamiento y el análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía realizados se evidencian en el ANEXO 4.

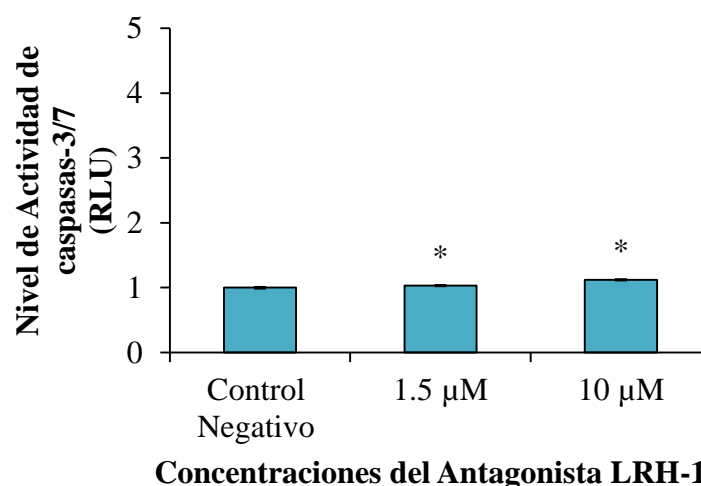


Fig.22 Expresión relativa del nivel de activación de caspasas 3 y 7 en las células ASPC -1. La actividad de las caspasas 3 y 7 fueron tratadas

durante 3 horas con el Antagonista LRH-1 a concentraciones de 1.5 μM y 10 μM medidos por luminiscencia. El nivel de actividad de caspasas -3/7 se expresaron como unidad de luz relativa (RLU) por miligramo de proteína celular total. La actividad de caspasas en ambas concentraciones se diferencia significativamente al grupo control negativo tal como se muestra en la **Tabla 10**. Se representan la media y el error estándar (n=3; *p<0.05, diferencias significativas respecto al control negativo, ANOVA de una vía y *post- hoc* Dunnett).

Tabla 10: Diferencia significativa tras 3 horas de tratamiento

Concentraciones	Nivel de actividad (RLU)	Grupos Homogéneos
Control	1.0000	X
1.5 μM	1.0309	X
10 μM	1.1205	X

Fuente: Elaboración Propia

La activación de caspasas por el Antagonista LRH-1 han sido analizados *in vitro* a concentraciones de 1.5 μM y 10 μM en el lapso de 6 horas, tal y como se observa en la **Fig.23** mediante el Kit Caspases-3/7Glo. La lectura de nivel de actividad de caspasas (RLU) tras 6 horas de tratamiento y el análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía realizados se evidencian en el ANEXO 5.

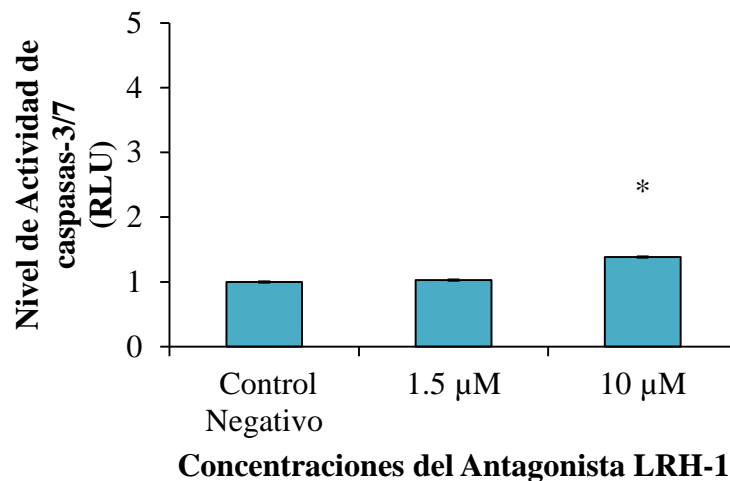


Fig.23 Expresión del nivel de activación relativa de las caspasas 3 y 7 en las células ASPC -1. La actividad de las caspasas 3 y 7 fueron tratadas durante 6 horas con el Antagonista LRH-1 a concentraciones de 1.5 μM y 10 μM medidos por luminiscencia. El nivel de actividad de caspasas -3/7 se expresaron como unidad de luz relativa (RLU) por miligramo de proteína celular total. La actividad de caspasas se diferencia en una sola concentración significativamente al grupo control negativo tal como se muestra en la **Tabla 11**. Se representan la media y el error estándar (n=3; *p<0.05, diferencias significativas respecto al control negativo, ANOVA de una vía y *post- hoc* Dunnett).

Tabla 11: Diferencia significativa tras 6 horas de tratamiento

Concentraciones	Nivel de actividad (RLU)	Grupos Homogéneos
Control	1.0000	X
1.5 μM	1.0265	X
10 μM	1.3821	X

Fuente: *Elaboración Propia*

Miret et. al., 2006, en su estudio da a conocer la relación que podría existir entre viabilidad celular y activación de caspasas. En su investigación en células HepG2 tras el uso del Kit Caspases-3/7Glo, obtuvo un resultado similar al descrito, puesto que realiza varias comparaciones con distintas sustancias, pero en definitiva resalta la evaluación de la concentración de 3.5 mM de ácido butírico, logrando la activación de caspasas significativamente y dejando claro que la concentración de cualquier droga o sustancia puede actuar de manera distinta y no necesariamente de la forma esperada.¹⁴⁰

Youns et. al., 2009, en su investigación *in vitro* de la droga experimental Artesunato en líneas celulares del cáncer de páncreas tales como MiaPaCa-2 y BxPc-3, demostró que la inducción de la apoptosis fue por los mecanismos de activación de Artesunato y afirma que gran parte de las quimioterapias e inmunoterapias comúnmente utilizadas, inducen a la apoptosis y esto se determina a través de la activación de caspasas.¹⁴¹

Su et. Al., 2008, menciona que una serie de agentes externos pueden sensibilizar las células cancerosas al proceso de apoptosis inducida por diferentes estímulos, tales como privación de suero o los fármacos quimioterapéuticos. Es más, asevera que la apoptosis es una barrera importante que debe ser eludida durante la transformación maligna. Las células cancerosas evolucionan para evadir la apoptosis y así poder escapar de ser disipadas por el sistema de vigilancia y puedan sobrevivir en el microambiente tumoral.¹⁴²

El efecto del Antagonista LRH-1 es evidente y hay pruebas de ello, sin embargo conocer su posible mecanismo de acción es complejo, dado que no existe evidencia alguna del posible comportamiento del Antagonista LRH-1 sobre el cáncer de páncreas. Además, se introdujo por primera vez, la expresión de la actividad de caspasas 3 y 7 en las células ASPC-1 tratadas con el Antagonista LRH-1, obteniendo como punto de partida la hipótesis de su posible mecanismo de acción y una disección más detallada del papel funcional de las caspasas 3 y 7. Por otra parte, los presentes resultados proporcionan nuevos conocimientos sobre el Antagonista LRH-1 relacionado al proceso de apoptosis, lo que podría facilitar el desarrollo de estrategias contra el cáncer y / o terapias de combinación a base del Antagonista LRH-1.

5. Análisis de la Determinación de la Citotoxicidad

La citotoxicidad se presenta por diversos factores, en la mayoría de los casos inducido por agentes externos provocando la permeabilidad elevada de la membrana plasmática causando un daño irreversible. Un marcador potencial de la lesión de células, es la enzima citosólica LDH, que cataliza la oxidación de L-lactato a piruvato a través de la reducción del NAD⁺ a NADH, para reducir una sal de tetrazolio en un producto formazán rojo que es medido a 490 nm y 680 nm siendo la sustracción de ambos proporcional a la citotoxicidad. En este trabajo de investigación no se ha encontrado una correlación significativa entre el número de células muertas o dañadas y las mediciones de la actividad LDH, ya que la molécula Antagonista LRH-1 a una concentración de 10 μ M no produce lesión a las células ASPC-1 lo que implicaría que la molécula actuaría sin ocasionar daño a nivel de la membrana tal como se observa en la **Fig.24**. Las lecturas realizadas de dichas absorbancias a dos longitudes de onda y el análisis de varianza de una sola vía se evidencian en el ANEXO 6.

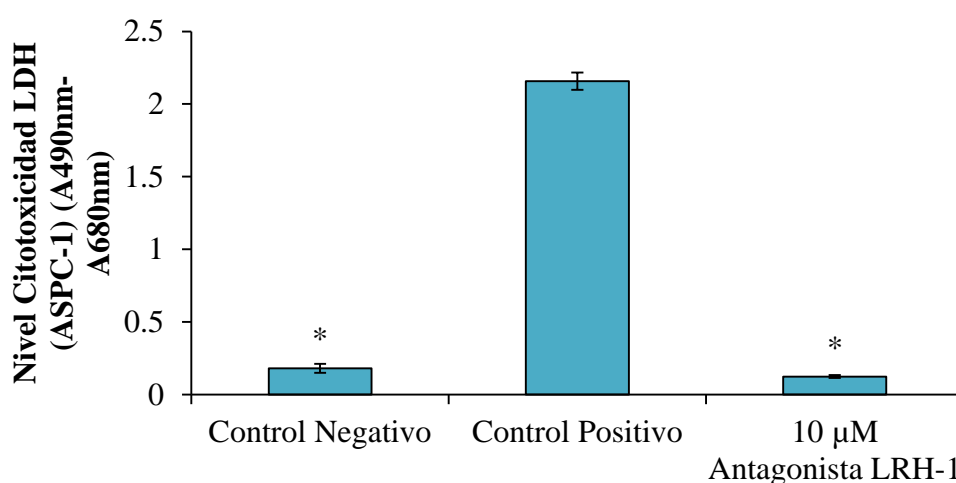


Fig.24 Liberación del LDH (Citotoxicidad) tras 24 horas de tratamiento del Antagonista LRH-1 a partir de las células ASPC-1.

Los índices de citotoxicidad en células tratadas con el grupo control negativo y el Antagonista LRH-1 tienen diferencia significativa con el grupo control positivo tal y como se evidencia en la **Tabla 12**. Se representan la media y el error estándar (n=3; *p<0.05, diferencias

significativas respecto al control positivo, ANOVA de una vía y *post-hoc* Dunnett).

Tabla 12: Diferencias significativas del nivel de Citotoxicidad

Concentraciones	Nivel de Citotoxicidad (A490nm-680nm)	Grupos Homogéneos
Control Negativo	0.181	X
Control Positivo	2.157	X
10 μ M	0.124	X

Fuente: Elaboración Propia

Las investigaciones de Legrand et al., 1992, describe algunos parámetros que influyen en la medición cuantitativa de LDH intracelular de diferentes líneas celulares, por ejemplo, el pH, la cantidad de oxigenación o la composición química de la medio.¹⁴³

Por otro lado, Gennari et al., 2003, en su investigación de citotoxicidad celular *in vitro* provocada por el cloruro de cadmio, en una línea celular pertenecientes al riñón, demostró que la fuga de la enzima LDH provoca la disminución de la viabilidad celular y así la fragmentación del ADN.¹⁴⁴ Diversos agentes tienen un comportamiento distinto, unos causando lesión a nivel de la membrana celular y permitiendo la salida de la enzima LDH hacia el exterior provocando daños irreparables, y otros que actúan sin causar daño alguno, es decir permiten la conservación de la membrana celular.

Al igual que los resultados evidenciados en el presente estudio, existen algunos estudios relativamente similares donde se determinó la citotoxicidad con la misma metodología en otra línea celular pancreática y con un principio activo distinto como es el kaempferol. Zhang et al., 2007, evidencio que el Kaempferol tiene una baja

citotoxicidad en comparación a una droga muy utilizada en el tratamiento del cáncer, como es el 5-fluorouracilo.¹⁴⁵

Claro está la importancia de determinar la concentración intracelular de esta enzima no sólo en la función de líneas de células, sino también de las condiciones de cultivo con el fin de utilizar la actividad de LDH como indicador cuantitativo de la muerte celular.



CONCLUSIONES

1. El Antagonista LRH-1 podría producir la inhibición de la actividad transcripcional del receptor LRH-1 sobre la exposición de las células humanas ASPC-1; sin embargo, la respuesta de las células frente al Antagonista LRH-1 no es uniforme, debido a la función del receptor LRH-1 que promueve la rápida proliferación celular y la resistencia a múltiples fármacos.
2. Las distintas concentraciones del Antagonista LRH-1 podría afectar a la viabilidad de las células ASPC-1 del cáncer de páncreas, mostrando daño significativo casi en todas las concentraciones excepto a una concentración de 0.05 μM donde el Antagonista LRH-1 podría haber perdido su efectividad.
3. El Antagonista LRH-1 induce a la activación de caspasas 3 y 7 obteniendo un nivel de actividad de caspasas relativamente significativo a las 3 horas de tratamiento; sin embargo a 6 horas de tratamiento se observó que a una concentración 10 μM el nivel de actividad de caspasas prevalecía habiendo una diferencia significativa comparada con el grupo control. El Antagonista LRH-1 podría inducir a las células del cáncer de páncreas a la apoptosis, mostrando efecto en su fase inicial.
4. Después de la exposición de las células humanas ASPC-1 al Antagonista LRH-1 la liberación de LDH no fue elevado en una relación dosis-dependiente. De hecho, se podría afirmar que el Antagonista LRH-1 no induce citotoxicidad o daño en la membrana celular, siendo beneficioso para las células sanas del ser humano.

SUGERENCIAS

1. Extender los estudios expuestos en esta tesis al estudio de las proteínas sobreexpresadas por causa del receptor LRH-1 y su conservación tras exponerlas al tratamiento del Antagonista LRH-1. Para ello se sugiere ensayos Western Blot.
2. Analizar con mayor detenimiento y buscar las vías alternativas que podría usar el Antagonista LRH-1 como mecanismo de acción.
3. Extender los estudios expuestos a otras líneas celulares de los distintos tipos de cáncer.
4. Extender los estudios expuestos de viabilidad celular de la administración *in vitro* de Antagonista LRH-1 a estudios *in vivo*, haciendo uso de las distintas concentraciones determinada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Chiang K-C, Yeh C-N, Ueng S-H, Hsu J-T, Yeh T-S, Jan Y-Y, et al. Clinicodemographic aspect of resectable pancreatic cancer and prognostic factors for resectable cancer. *World journal of surgical oncology*. 2012;10(1):1.
2. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2014;64(1):9-29.
3. Hajj C, Goodman KA. Pancreatic cancer and SBRT: A new potential option? *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy*. 2015;20(5):377-84.
4. Kelsen DP, Portenoy R, Thaler H, Tao Y, Brennan M. Pain as a predictor of outcome in patients with operable pancreatic carcinoma. *Surgery*. 1997;122(1):53-9.
5. de Gonzalez AB, Sweetland S, Spencer E. A meta-analysis of obesity and the risk of pancreatic cancer. *British journal of cancer*. 2003;89(3):519-23.
6. Benod C, Carlsson J, Uthayaruban R, Hwang P, Irwin JJ, Doak AK, et al. Structure-based discovery of antagonists of nuclear receptor LRH-1. *Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(27):19830-44.
7. Lin Q, Aihara A, Chung W, Li Y, Huang Z, Chen X, et al. LRH1 as a driving factor in pancreatic cancer growth. *Cancer letters*. 2014;345(1):85-90.
8. Reber H. *Pancreatic cancer: pathogenesis, diagnosis, and treatment*: Springer Science & Business Media; 2012.
9. ESMO. *Cáncer de Páncreas*. European Society for Medical Oncology. 2013;Volumen I:31.
10. Laban Villanueva CE, Díaz Plasencia JA, Yan Quiroz EF, Arrascue G, Luis J. Tendencias en la incidencia y factores de riesgo asociados al desarrollo de cáncer de páncreas: Instituto Regional de Enfermedades Neoplásicas" Dr. Luis Pinillos Ganoza"-IREN Norte. 2008-2011. *Revista de Gastroenterología del Perú*. 2012;32(2):161-8.
11. Tempero MA, Malafa MP, Behrman SW, Benson AB, Casper ES, Chiorean EG, et al. Pancreatic adenocarcinoma, version 2.2014. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2014;12(8):1083-93.
12. Modena DJT, Grau DRG, Cevasco DLB, Arnao DPTP. *Cáncer y tumores quísticos del páncreas. Tópicos Selectors en Medicina Interna - GASTROENTEROLOGÍA2015*.
13. Tovar JR. *Asociación de Polimorfismos de Timidilato Sintasa (TS) y Factor Inducible por Hipoxia – 1 α (HIF – 1 α) con el Cáncer de Páncreas*: Universidad Autónoma de Madrid; 2009.
14. García Borobia F, Jorba Martín R, Fabregat Prous J. Adenocarcinoma de páncreas y del área periampular. En: *Cirugía AEC Manual de la Asociación Española de Cirujanos Madrid*: Panamericana. 2005:573-84.
15. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. *GLOBOCAN 2012 v1. 0, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase No. 11*. 2013. Available from: [globocan iarc fr](http://globocan.iarc.fr). 2014.
16. Zhang Q, Zeng L, Chen Y, Lian G, Qian C, Chen S, et al. Pancreatic Cancer Epidemiology, Detection, and Management. *Gastroenterology Research and Practice*. 2016;2016.

17. Society AC. Cancer facts and figures 2015. American Cancer Society Atlanta; 2015.
18. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2015;65(1):5-29.
19. Mizuno S, Nakai Y, Isayama H, Kawahata S, Saito T, Takagi K, et al. Smoking, family history of cancer, and diabetes mellitus are associated with the age of onset of pancreatic cancer in Japanese patients. *Pancreas*. 2014;43(7):1014-7.
20. Chen K, Zhang Q, Peng M, Shen Y, Wan P, Xie G. Relationship between tea consumption and pancreatic cancer risk: a meta-analysis based on prospective cohort studies and case-control studies. *European Journal of Cancer Prevention*. 2014;23(5):353-60.
21. Kern SE. Clonality: more than just a tumor-progression model. *Journal of the National Cancer Institute*. 1993;85(13):1020-1.
22. Knudson AG. Hereditary cancer: two hits revisited. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 1996;122(3):135-40.
23. Bos JL. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer research*. 1989;49(17):4682-9.
24. Pellegata N, Sessa F, Renault B, Bonato M, Leone B, Solcia E, et al. K-ras and p53 gene mutations in pancreatic cancer: ductal and nonductal tumors progress through different genetic lesions. *Cancer research*. 1994;54(6):1556-60.
25. Sugio K, Gazdar AF, Albores-Saavedra J, Kokkinakis DM. High yields of K-ras mutations in intraductal papillary mucinous tumors and invasive adenocarcinomas induced by N-nitroso (2-hydroxypropyl)(2-oxopropyl) amine in the pancreas of female Syrian hamsters. *Carcinogenesis*. 1996;17(2):303-9.
26. Yamada H, Sakamoto H, Taira M, Nishimura S, Shimosato Y, Terada M, et al. Amplifications of both c-Ki-ras with a point mutation and c-myc in a primary pancreatic cancer and its metastatic tumors in lymph nodes. *Japanese Journal of Cancer Research GANN*. 1986;77(4):370-5.
27. Cheng JQ, Ruggeri B, Klein WM, Sonoda G, Altomare DA, Watson DK, et al. Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996;93(8):3636-41.
28. Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzese JL. Pancreatic cancer. *The Lancet*. 2004;363(9414):1049-57.
29. Serrano AL. Factores de riesgo y diagnóstico temprano del cáncer de páncreas. *Gastroenterología y hepatología*. 2010;33(5):382-90.
30. Lillemoe KD, Yeo CJ, Cameron JL. Pancreatic cancer: state-of-the-art care. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2000;50(4):241-68.
31. ACS. Pancreatic cancer risk factors: American Cancer Society; 2016. Available from: <http://www.cancer.org/cancer/pancreaticcancer/detailedguide/pancreatic-cancer-risk-factors>.
32. Ghadirian P, Lynch H, Krewski D. Epidemiology of pancreatic cancer: an overview. *Cancer detection and prevention*. 2003;27(2):87-93.
33. Lowenfels AB, Maisonneuve P, Whitcomb DC. Risk factors for cancer in hereditary pancreatitis. *Medical Clinics of North America*. 2000;84(3):565-73.
34. Silverman DT, Hoover RN, Brown LM, Swanson GM, Schiffman M, Greenberg RS, et al. Why do Black Americans have a higher risk of pancreatic cancer than White Americans? *Epidemiology*. 2003;14(1):45-54.

35. Simard EP, Ward EM, Siegel R, Jemal A. Cancers with increasing incidence trends in the United States: 1999 through 2008. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2012;62(2):118-28.
36. Lowenfels AB, Maisonneuve P. Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2006;20(2):197-209.
37. MacDermott R, Kramer P. Adenocarcinoma of the pancreas in four siblings. *Gastroenterology*. 1973;65(1):137.
38. Shi C, Hruban RH, Klein AP. Familial pancreatic cancer. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2009;133(3):365-74.
39. Yadav D, Lowenfels AB. The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology*. 2013;144(6):1252-61.
40. Lowenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G, Ammann RW, Lankisch PG, Andersen JR, et al. Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. *New England Journal of Medicine*. 1993;328(20):1433-7.
41. Bansal P, Sonnenberg A. Pancreatitis is a risk factor for pancreatic cancer. *Gastroenterology*. 1995;109(1):247-51.
42. Karlson BM, Ekblom A, Josefsson S, McLaughlin JK, Fraumeni J, Nyren O. The risk of pancreatic cancer following pancreatitis: an association due to confounding? *Gastroenterology*. 1997;113(2):587-92.
43. Lowenfels AB, Maisonneuve P, DiMagno EP, Elitsur Y, Gates LK, Perrault J, et al. Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 1997;89(6):442-6.
44. Castleman B, Scully R, McNeely B. Case records of the Massachusetts General Hospital. Weekly clinicopathological exercises. Case 39-1972. *The New England Journal of Medicine*. 1972;287(13):656-63.
45. Tomita T, Vachal E, Rengachary S, Watanabe I. Occult adenocarcinoma of the pancreas in a patient with Lindau's disease. *The American Journal of Digestive Diseases*. 1978;23(5):S80-S3.
46. Whitcomb DC. Inflammation and Cancer V. Chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2004;287(2):G315-G9.
47. Etemad B, Whitcomb DC. Chronic pancreatitis: diagnosis, classification, and new genetic developments. *Gastroenterology*. 2001;120(3):682-707.
48. Schneider A, Suman A, Rossi L, Barmada MM, Beglinger C, Parvin S, et al. SPINK1/PSTI mutations are associated with tropical pancreatitis and type II diabetes mellitus in Bangladesh. *Gastroenterology*. 2002;123(4):1026-30.
49. Kastrinos F, Mukherjee B, Tayob N, Wang F, Sparr J, Raymond VM, et al. Risk of pancreatic cancer in families with Lynch syndrome. *Jama*. 2009;302(16):1790-5.
50. Becker-Catania SG, Chen G, Hwang MJ, Wang Z, Sun X, Sanal O, et al. Ataxia-telangiectasia: phenotype/genotype studies of ATM protein expression, mutations, and radiosensitivity. *Molecular genetics and metabolism*. 2000;70(2):122-33.
51. Spigelman A, Murday V, Phillips R. Cancer and the Peutz-Jeghers syndrome. *Gut*. 1989;30(11):1588-90.
52. Giardiello FM, Welsh SB, Hamilton SR, Offerhaus GJA, Gittelsohn AM, Booker SV, et al. Increased risk of cancer in the Peutz-Jeghers syndrome. *New England Journal of Medicine*. 1987;316(24):1511-4.

53. Kato N, Sugawara M, Maeda K, Hosoya N, Motoyama T. Pyloric gland metaplasia/differentiation in multiple organ systems in a patient with Peutz–Jegher's syndrome. *Pathology international*. 2011;61(6):369-72.
54. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature*. 1995;378(6559):789-92.
55. Schutte M, da Costa LT, Hahn SA, Moskaluk C, Hoque A, Rozenblum E, et al. Identification by representational difference analysis of a homozygous deletion in pancreatic carcinoma that lies within the BRCA2 region. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995;92(13):5950-4.
56. Tavtigian SV, Simard J, Rommens J, Couch FJ, Shattuck-Eidens D, Neuhausen S, et al. The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. *Nature genetics*. 1996;12(3):333-7.
57. Thorlacius S, Olafsdottir G, Tryggvadottir L, Neuhausen S, Jonasson JG, Tavtigian SV, et al. A single BRCA2 mutation in male and female breast cancer families from Iceland with varied cancer phenotypes. *Nature genetics*. 1996;13(1):117-9.
58. Huxley R, Ansary-Moghaddam A, De González AB, Barzi F, Woodward M. Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies. *British journal of cancer*. 2005;92(11):2076-83.
59. Pannala R, Leirness JB, Bamlet WR, Basu A, Petersen GM, Chari ST. Prevalence and clinical profile of pancreatic cancer–associated diabetes mellitus. *Gastroenterology*. 2008;134(4):981-7.
60. Chow W, Johansen C, Gridley G, Møller M, Olsen J, Fraumeni Jr J. Gallstones, cholecystectomy and risk of cancers of the liver, biliary tract and pancreas. *British journal of cancer*. 1999;79(3-4):640.
61. Savage K, Waller HA, Stubbs M, Khan K, Watson SA, Clarke PA, et al. Targeting of cholecystokinin B/gastrin receptor in colonic, pancreatic and hepatocellular carcinoma cell lines. *International journal of oncology*. 2006;29(6):1429-35.
62. Silverman DT. Risk factors for pancreatic cancer: A case-control study based on direct interviews. *Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis*. 2001;21(1):7-25.
63. Wingo PA, Ries LA, Giovino GA, Miller DS, Rosenberg HM, Shopland DR, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1996, with a special section on lung cancer and tobacco smoking. *Journal of the National Cancer institute*. 1999;91(8):675-90.
64. Fuchs CS, Colditz GA, Stampfer MJ, Giovannucci EL, Hunter DJ, Rimm EB, et al. A prospective study of cigarette smoking and the risk of pancreatic cancer. *Archives of Internal Medicine*. 1996;156(19):2255-60.
65. McWilliams RR, Bamlet WR, Cunningham JM, Goode EL, de Andrade M, Boardman LA, et al. Polymorphisms in DNA repair genes, smoking, and pancreatic adenocarcinoma risk. *Cancer research*. 2008;68(12):4928-35.
66. Partanen T, Monge P, Wesseling C. Causas y prevención del cáncer ocupacional. *Acta Médica Costarricense ISSN 0001-6012*. 2009;51(4).
67. Ojajärvi IA, Partanen TJ, Ahlbom A, Boffetta P, Hakulinen T, Jourenkova N, et al. Occupational exposures and pancreatic cancer: a meta-analysis. *Occupational and environmental medicine*. 2000;57(5):316-24.

68. Stolzenberg-Solomon RZ, Pietinen P, Taylor PR, Virtamo J, Albanes D. Prospective study of diet and pancreatic cancer in male smokers. *American journal of epidemiology*. 2002;155(9):783-92.
69. Risch HA. Etiology of pancreatic cancer, with a hypothesis concerning the role of N-nitroso compounds and excess gastric acidity. *Journal of the National Cancer Institute*. 2003;95(13):948-60.
70. Larsson SC, Bergkvist L, Wolk A. Consumption of sugar and sugar-sweetened foods and the risk of pancreatic cancer in a prospective study. *The American journal of clinical nutrition*. 2006;84(5):1171-6.
71. Larsson SC, Håkansson N, Näslund I, Bergkvist L, Wolk A. Fruit and vegetable consumption in relation to pancreatic cancer risk: a prospective study. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2006;15(2):301-5.
72. Skinner HG, Michaud DS, Giovannucci EL, Rimm EB, Stampfer MJ, Willett WC, et al. A prospective study of folate intake and the risk of pancreatic cancer in men and women. *American Journal of Epidemiology*. 2004;160(3):248-58.
73. Larsson SC, Håkansson N, Giovannucci E, Wolk A. Folate intake and pancreatic cancer incidence: a prospective study of Swedish women and men. *Journal of the National Cancer Institute*. 2006;98(6):407-13.
74. Michaud DS, Giovannucci E, Willett WC, Colditz GA, Fuchs CS. Coffee and alcohol consumption and the risk of pancreatic cancer in two prospective United States cohorts. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2001;10(5):429-37.
75. Quiroga IB. *Epidemiología Descriptiva del Cáncer de Páncreas Exocrino en la comunidad de Madrid. Análisis de Supervivencia*. España: Universidad de Alcalá 2013.
76. Reber HA, Winter J. 1423 pancreaticoduodenectomies for pancreatic cancer: A single-institution experience-Discussion. ELSEVIER SCIENCE INC 360 PARK AVE SOUTH, NEW YORK, NY 10010-1710 USA; 2006.
77. Murr MM, Sarr MG, Oishi AJ, van Heerden JA. *Pancreatic cancer. CA: a cancer journal for clinicians*. 1994;44(5):304-18.
78. Cancer.Net. *Cáncer de páncreas: Estadios 2015*. Available from: <http://www.cancer.net/es/tipos-de-c%C3%A1ncer/c%C3%A1ncer-de-p%C3%A1ncreas/estadios>.
79. Karlson B-M, Ekbom A, Lindgren PG, Källskog V, Rastad J. Abdominal US for Diagnosis of Pancreatic Tumor: Prospective Cohort Analysis 1. *Radiology*. 1999;213(1):107-11.
80. Rickes S, Unkrodt K, Neye H, Ocran K, Wermke W. Differentiation of pancreatic tumours by conventional ultrasound, unenhanced and echo-enhanced power Doppler sonography. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2002;37(11):1313-20.
81. Miura F, Takada T, Amano H, Yoshida M, Furui S, Takeshita K. Diagnosis of pancreatic cancer. *HPB*. 2006;8(5):337-42.
82. Diehl S, Lehmann K, Sadick M, Lachmann R, Georgi M. Pancreatic cancer: value of dual-phase helical CT in assessing resectability. *Radiology*. 1998;206(2):373-8.
83. Jordan VFC. *Colangiopancreatografía retrograda endoscópica (ERCP)*. *Revista Científica Ciencia Médica*. 2008;11(1):44-5.

84. Miller FH, Rini NJ, Keppke AL. MRI of adenocarcinoma of the pancreas. *American Journal of Roentgenology*. 2006;187(4):W365-W74.
85. Legmann P, Vignaux O, Dousset B, Baraza A, Palazzo L, Dumontier I, et al. Pancreatic tumors: comparison of dual-phase helical CT and endoscopic sonography. *AJR American journal of roentgenology*. 1998;170(5):1315-22.
86. Müller M, Meyenberger C, Bertschinger P, Schaer R, Marincek B. Pancreatic tumors: evaluation with endoscopic US, CT, and MR imaging. *Radiology*. 1994;190(3):745-51.
87. Sendler A, Avril N, Helmberger H, Stollfuß J, Weber W, Bengel F, et al. Preoperative evaluation of pancreatic masses with positron emission tomography using 18F-fluorodeoxyglucose: diagnostic limitations. *World journal of surgery*. 2000;24(9):1121-9.
88. Maisey N, Webb A, Flux G, Padhani A, Cunningham D, Ott R, et al. FDG-PET in the prediction of survival of patients with cancer of the pancreas: a pilot study. *British journal of cancer*. 2000;83(3):287.
89. Maithel SK, Maloney S, Winston C, Gönen M, D'Angelica MI, DeMatteo RP, et al. Preoperative CA 19-9 and the yield of staging laparoscopy in patients with radiographically resectable pancreatic adenocarcinoma. *Annals of surgical oncology*. 2008;15(12):3512-20.
90. Ramzan Z, Le P, Kapur P, Huerta S. *Current Concepts in Pancreatic Cancer*. 2015.
91. Callery MP, Chang KJ, Fishman EK, Talamonti MS, William Traverso L, Linehan DC. Pretreatment assessment of resectable and borderline resectable pancreatic cancer: expert consensus statement. *Annals of surgical oncology*. 2009;16(7):1727-33.
92. Varadhachary GR, Tamm EP, Abbruzzese JL, Xiong HQ, Crane CH, Wang H, et al. Borderline resectable pancreatic cancer: definitions, management, and role of preoperative therapy. *Annals of surgical oncology*. 2006;13(8):1035-46.
93. Guo X-Z, Cui Z-M, Liu X. Current developments, problems and solutions in the non-surgical treatment of pancreatic cancer. *World journal of gastrointestinal oncology*. 2013;5(2):20-8.
94. Burris Hr, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *Journal of clinical oncology*. 1997;15(6):2403-13.
95. Chiu J, Yau T. Metastatic pancreatic cancer: are we making progress in treatment? *Gastroenterology research and practice*. 2012;2012.
96. Oettle H, Post S, Neuhaus P, Gellert K, Langrehr J, Ridwelski K, et al. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *Jama*. 2007;297(3):267-77.
97. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, et al. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *New England Journal of Medicine*. 2011;364(19):1817-25.
98. Hoyer M, Roed H, Sengelov L, Traberg A, Ohlhuis L, Pedersen J, et al. Phase-II study on stereotactic radiotherapy of locally advanced pancreatic carcinoma. *Radiotherapy and oncology*. 2005;76(1):48-53.

99. Bouchard M, Amos RA, Briere TM, Beddar S, Crane CH. Dose escalation with proton or photon radiation treatment for pancreatic cancer. *Radiotherapy and Oncology*. 2009;92(2):238-43.
100. Hong TS, Craft DL, Carlsson F, Bortfeld TR. Multicriteria optimization in intensity-modulated radiation therapy treatment planning for locally advanced cancer of the pancreatic head. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*. 2008;72(4):1208-14.
101. Zhang L-P, Nie Q, Kang J-B, Wang B, Cai C-L, Li J-G, et al. Efficacy of whole body gamma-knife radiotherapy combined with thermochemotherapy on locally advanced pancreatic cancer. *Ai Zheng*. 2008;27(11):1204-7.
102. Zhang K, Loong SL, Connor S, Sidney W, Tan S-Y, Ng RT, et al. Complete tumor response following intratumoral 32P BioSilicon on human hepatocellular and pancreatic carcinoma xenografts in nude mice. *Clinical cancer research*. 2005;11(20):7532-7.
103. Gan SI, Thompson CC, Lauwers GY, Bounds BC, Brugge WR. Ethanol lavage of pancreatic cystic lesions: initial pilot study. *Gastrointestinal endoscopy*. 2005;61(6):746-52.
104. Ashida R, Chang KJ. Interventional EUS for the treatment of pancreatic cancer. *Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery*. 2009;16(5):592-7.
105. Gjertsen M, Sæterdal I, Sæbøe-Larssen S, Gaudernack G. HLA-A3 restricted mutant ras specific cytotoxic T-lymphocytes induced by vaccination with T-helper epitopes. *Journal of molecular medicine*. 2003;81(1):43-50.
106. Schneider C, Schmidt T, Ziske C, Tiemann K, Lee K, Uhlinsky V, et al. Tumour suppression induced by the macrophage activating lipopeptide MALP-2 in an ultrasound guided pancreatic carcinoma mouse model. *Gut*. 2004;53(3):355-61.
107. Wagner RT, Xu X, Yi F, Merrill BJ, Cooney AJ. Canonical Wnt/ β -catenin regulation of liver receptor homolog-1 mediates pluripotency gene expression. *Stem cells*. 2010;28(10):1794-804.
108. Heng J-CD, Feng B, Han J, Jiang J, Kraus P, Ng J-H, et al. The nuclear receptor Nr5a2 can replace Oct4 in the reprogramming of murine somatic cells to pluripotent cells. *Cell stem cell*. 2010;6(2):167-74.
109. Botrugno OA, Fayard E, Annicotte J-S, Haby C, Brennan T, Wendling O, et al. Synergy between LRH-1 and β -catenin induces G 1 cyclin-mediated cell proliferation. *Molecular cell*. 2004;15(4):499-509.
110. Benod C, Vinogradova MV, Jouravel N, Kim GE, Fletterick RJ, Sablin EP. Nuclear receptor liver receptor homologue 1 (LRH-1) regulates pancreatic cancer cell growth and proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(41):16927-31.
111. Kim JW, Peng N, Rainey WE, Carr BR, Attia GR. Liver receptor homolog-1 regulates the expression of steroidogenic acute regulatory protein in human granulosa cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004;89(6):3042-7.
112. Gu P, Goodwin B, Chung AC-K, Xu X, Wheeler DA, Price RR, et al. Orphan nuclear receptor LRH-1 is required to maintain Oct4 expression at the epiblast stage of embryonic development. *Molecular and cellular biology*. 2005;25(9):3492-505.

- 113.LD. LRH-1 Antagonist from EMD MILLIPORE 2016. Available from: <http://www.linscottsdirectory.com/products/emd-millipore/LRH-1-Antagonist-4848737>.
- 114.Castaño ME. Cultivos celulares. Editorial Biogenesis. 2012:29-46.
- 115.Ibiantech. El ayer y hoy de las técnicas y medios de cultivo celular: Ibian Technologies; 2016. Available from: <http://www.ibiantech.com/el-ayer-y-hoy-de-las-tecnicas-y-medios-de-cultivo-celular/>.
- 116.ECACC. Fundamental Techniques in Cell Cultures: The European Collection of Cell Cultures; 2015. Available from: <http://www.bristol.ac.uk/safety/media/gn/ecacc-handbook-gn.pdf>.
- 117.NPTEL. Cell Culture: National Programme on Technology Enhanced Learning; 2013. Available from: <http://nptel.ac.in/courses/102103012/pdf/mod6.pdf>.
- 118.UNQ. Mantenimiento de líneas celulares: Universidad Nacional Quilmes; 2012. Available from: <http://cancer.unq.edu.ar/Tpnro2bis.pdf>.
- 119.PHE. ECACC General Cell Collection: AsPC-1: Public Health England; 2016. Available from: http://www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=96020930&collection=ecacc_gc.
- 120.Degterev A, Yuan J. Expansion and evolution of cell death programmes. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008;9(5):378-90.
- 121.Loro L, Vintermyr O, Johannessen A. Cell death regulation in oral squamous cell carcinoma: methodological considerations and clinical significance. *Journal of oral pathology & medicine*. 2003;32(3):125-38.
- 122.Iracheta ML. El suicidio y la muerte celular. *Rev R Acad Cienc Exact Fís Nat*. 2007;101(2).
- 123.Koh JY, Choi DW. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *Journal of neuroscience methods*. 1987;20(1):83-90.
- 124.Grossmann J. Molecular mechanisms of “detachment-induced apoptosis—Anoikis”. *Apoptosis*. 2002;7(3):247-60.
- 125.Brodie C, Blumberg P. Regulation of cell apoptosis by protein kinase c δ . *Apoptosis*. 2003;8(1):19-27.
- 126.Cho S-G, Choi E-J. Apoptotic signaling pathways: caspases and stress-activated protein kinases. *Journal of biochemistry and molecular biology*. 2002;35(1):24-7.
- 127.Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annual review of biochemistry*. 2000;69(1):217-45.
- 128.Sosa R. Apoptosis. *Universidad Nacional del Nordeste*. 2012:1-6.
- 129.García García V, González-Moles M, Bascones Martínez A. Bases moleculares del cáncer oral: Revisión bibliográfica. *Avances en Odontostomatología*. 2005;21(6):287-95.
- 130.Rojas M, Salmen S, Berrueta L. Muerte celular programada: I. Activación y mecanismos de regulación. *Revista Médica de la Extensión Portuguesa—ULA*(4). 2009;3:92-106.
- 131.Dash P. Apoptosis; *Basic Medical Sciences*, St. George's, University of London. 1994.
- 132.Vucic D, Deshayes K, Ackerly H, Pisabarro MT, Kadkhodayan S, Fairbrother WJ, et al. SMAC negatively regulates the anti-apoptotic activity of melanoma inhibitor of apoptosis (ML-IAP). *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(14):12275-9.

133. Plumb JA, Milroy R, Kaye S. Effects of the pH dependence of 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. *Cancer research*. 1989;49(16):4435-40.
134. Khabar KS, AL-Zoghaibi F, Dzimiri M, Taha M, AL-Tuwaijri A, AL-ahdal MN. MTS interferon assay: a simplified cellular dehydrogenase assay for interferon activity using a water-soluble tetrazolium salt. *Journal of interferon & cytokine research*. 1996;16(1):31-3.
135. Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer communications*. 1991;3(7):207-12.
136. Goodwin C, Holt S, Downes S, Marshall N. Microculture tetrazolium assays: a comparison between two new tetrazolium salts, XTT and MTS. *Journal of immunological methods*. 1995;179(1):95-103.
137. Abcam. MTS Cell Proliferation Assay Kit (Colorimetric): Abcam; 2016. Available from: <http://www.abcam.com/mts-cell-proliferation-assay-kit-colorimetric-ab197010.html>.
138. Promega. Caspase-Glo® 3/7 Assay Systems: Promega; 2016. Available from: https://worldwide.promega.com/products/cell-health-and-metabolism/apoptosis-assays/luminescent-caspase-assays/caspase_glo-3_7-assay-systems/.
139. Scientific TF. Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit 2014. Available from: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011851_Pierce_LDH_Cytotoxicity_Asy_UG.pdf.
140. Miret S, De Groene EM, Klaffke W. Comparison of in vitro assays of cellular toxicity in the human hepatic cell line HepG2. *Journal of biomolecular screening*. 2006;11(2):184-93.
141. Youns M, Efferth T, Reichling J, Fellenberg K, Bauer A, Hoheisel JD. Gene expression profiling identifies novel key players involved in the cytotoxic effect of Artesunate on pancreatic cancer cells. *Biochemical pharmacology*. 2009;78(3):273-83.
142. Su H, Yang J-R, Xu T, Huang J, Xu L, Yuan Y, et al. MicroRNA-101, down-regulated in hepatocellular carcinoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity. *Cancer research*. 2009;69(3):1135-42.
143. Legrand C, Bour J, Jacob C, Capiaumont J, Martial A, Marc A, et al. Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the number of dead cells in the medium of cultured eukaryotic cells as marker. *Journal of biotechnology*. 1992;25(3):231-43.
144. Gennari A, Cortese E, Boveri M, Casado J, Prieto P. Sensitive endpoints for evaluating cadmium-induced acute toxicity in LLC-PK1 cells. *Toxicology*. 2003;183(1):211-20.
145. Zhang Y, Chen AY, Li M, Chen C, Yao Q. Ginkgo biloba extract kaempferol inhibits cell proliferation and induces apoptosis in pancreatic cancer cells. *Journal of Surgical Research*. 2008;148(1):17-23.



ANEXO 1

LECTURA DE ABSORVANCIAS DEL PRIMER GRUPO DE ESTUDIO

Control	10 μM	20 μM	30 μM	40 μM
0.9629	0.9320	0.8735	0.8315	0.7553
0.9872	0.9210	0.8536	0.8249	0.7873
1.0777	0.9607	0.8205	0.7133	0.7222
0.9717	0.9044	0.9033	0.8646	0.7387
1.0004	0.9485	0.7553	0.8006	0.6614
1.0830	1.0064	0.7479	0.6538	0.8755
0.9553	0.7399	0.8500	0.8500	0.8309
0.9617	0.8484	0.7575	0.7912	0.8245
0.9750	0.9265	0.8635	0.8282	0.7713
1.0247	0.9325	0.8619	0.7890	0.7305
1.0417	0.9775	0.7516	0.7272	0.7685
0.9585	0.7942	0.8037	0.8206	0.8277
0.9623	0.8902	0.8155	0.8114	0.7899
0.9713	0.8305	0.8518	0.8374	0.8091
1.0804	0.9835	0.7842	0.6836	0.7989
0.9861	0.9265	0.8293	0.8326	0.7001
1.0000	0.9077	0.8202	0.7912	0.7745
0.9999	0.9295	0.8627	0.8086	0.7509
1.0001	0.8858	0.7777	0.7739	0.7981
1.0000	0.9077	0.8202	0.7912	0.7745

Fuente: Elaboración Propia

	Control	30 μM	20 μM	30 μM	40 μM
PROMEDIO	100%	91%	82%	79%	77%
SD	4%	6%	5%	6%	5%
SEM	1%	1%	1%	1%	1%

Fuente: Elaboración Propia

ANALISIS DE VARIANZA DE UNA VIA EMITIDO POR SIGMA PLOT 12.5

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

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

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Data source: Data 1 in Notebook1

Group	N	Missing	Median	25%	75%
Control	20	0	0.994	0.965	1.019
10 μM	20	0	0.924	0.887	0.945
20 μM	20	0	0.820	0.779	0.860
30 μM	20	0	0.805	0.778	0.831
40 μM	20	0	0.774	0.742	0.807

$H = 67.837$ with 4 degrees of freedom. ($P = <0.001$)

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

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

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

Comparison	Diff of Ranks	q'	P<0.05
40 μM vs Control	1296.500	8.822	Yes
30 μM vs Control	1127.500	7.672	Yes
20 μM vs Control	966.000	6.573	Yes
10 μM vs Control	445.000	3.028	Yes

Note: The multiple comparisons on ranks do not include an adjustment for ties.

ANEXO 2

LECTURA DE ABSORBANCIAS DEL SEGUNDO GRUPO DE ESTUDIO

Control	1 μ M	3 μ M	10 μ M	30 μ M	100 μ M
1.0603	0.8549	0.8842	0.8728	0.7337	0.7503
0.9684	0.8447	0.9225	0.9238	0.7529	0.6329
0.9888	0.8932	0.7312	0.8587	0.6597	0.6585
0.9825	0.8472	0.7388	0.7082	0.6368	0.7426
1.0237	0.9389	0.7837	0.7147	0.6931	0.8555
0.9907	0.8987	0.7017	0.6644	0.6802	0.7664
0.9935	0.7477	0.7477	0.7592	0.7032	0.7161
0.9921	0.8182	0.7966	0.8081	0.7017	0.7707
1.0031	0.9347	0.8741	0.8881	0.5990	0.7404
0.9876	0.9316	0.8741	0.6472	0.4327	0.6472
0.9969	0.7156	0.8026	0.4918	0.5710	0.7171
1.0124	0.8011	0.7280	0.7311	0.6208	0.7684
1.0237	0.9389	0.7837	0.7147	0.6931	0.8555
0.9907	0.8987	0.7017	0.6644	0.6802	0.7664
0.9915	0.8547	0.7710	0.7827	0.7169	0.7048
1.0346	0.9677	0.8067	0.8523	0.8416	0.5591
1.0133	1.0270	0.8492	0.7733	0.7307	0.6289
1.0282	1.0513	0.8558	0.8789	0.8250	0.6311
0.9405	1.0513	0.9497	0.8450	0.8805	0.5972
1.0313	0.7635	0.7127	0.7712	0.6911	0.6680

Fuente: Elaboración Propia

	Control	1 μ M	3 μ M	10 μ M	30 μ M	100 μ M
PROMEDIO	100%	89%	80%	77%	69%	71%
SD	3%	10%	7%	10%	10%	8%
SEM	1%	2%	2%	2%	2%	2%

Fuente: Elaboración Propia

ANALISIS DE VARIANZA DE UNA VIA EMITIDO POR SIGMA PLOT 12.5

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook5

Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0.057)

Equal Variance Test: Failed (P < 0.050)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Data source: Data 1 in Notebook5

Group	N	Missing	Median	25%	75%
Control	20	0	0.995	0.989	1.024
1 μ M	20	0	0.896	0.825	0.939
3 μ M	20	0	0.790	0.733	0.870
10 μ M	20	0	0.772	0.710	0.857
30 μ M	20	0	0.693	0.643	0.733
100 μ M	20	0	0.717	0.637	0.766

H = 73.772 with 5 degrees of freedom. (P = <0.001)

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

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

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

Comparison	Diff of Ranks	q'	P<0.05
30 μ M vs Control	1572.000	8.567	Yes
100 μ M vs Control	1479.500	8.063	Yes
10 μ M vs Control	1128.500	6.150	Yes
3 μ M vs Control	962.500	5.246	Yes
1 μ M vs Control	521.500	2.842	Yes

Note: The multiple comparisons on ranks do not include an adjustment for ties

ANEXO 3

LECTURA DE ABSORBANCIAS DEL TERCER GRUPO DE ESTUDIO

Control	0.05 μM	0.1 μM	0.3 μM	0.5 μM	1.5 μM	3.0 μM	5.0 μM
1.0039	0.9825	0.9585	0.9446	0.8765	0.8590	0.8328	0.8869
0.9742	0.8887	0.9289	0.8852	0.8904	0.7787	0.7822	0.8241
0.9638	0.9907	0.8031	0.7019	0.6966	0.6181	0.7997	0.7246
1.0581	0.9935	0.8573	0.8485	0.7368	0.8311	0.7735	0.7665
0.9984	0.9921	0.8779	0.9033	0.6666	0.6423	0.8462	0.8018
1.0069	1.0031	0.8399	0.6951	0.6983	0.6275	0.5028	0.6856
1.0460	0.8857	0.8621	0.8103	0.5894	0.5514	0.6539	0.5429
0.9487	0.9969	0.9667	0.7184	0.6983	0.7871	0.5937	0.6222
1.0458	1.0124	0.8767	0.8721	0.8429	0.8691	0.7231	0.9152
0.9751	1.0002	0.9090	0.7492	0.6539	0.5817	0.8199	0.8368
1.0197	0.9907	0.9859	0.7430	0.7169	0.6570	0.5156	0.9398
1.0350	0.9935	0.9398	0.9259	0.9198	0.7784	0.7784	0.7630
1.0237	0.8921	0.8011	0.8475	0.7718	0.8382	0.7888	0.9531
0.9279	0.9890	0.7378	0.7950	0.7702	0.8815	0.7192	0.7656
1.0484	0.8835	0.8521	0.7687	0.7671	0.6605	0.8738	0.8985
1.0237	0.7829	0.8011	0.8475	0.7718	0.8382	0.7888	0.8531
0.9279	0.8474	0.7378	0.7950	0.7702	0.8815	0.7192	0.7656
1.0484	0.9717	0.8521	0.7687	0.7671	0.6605	0.8738	0.8985
0.9632	1.0021	0.9089	0.8240	0.8121	0.7917	0.8155	0.8817
1.0260	0.9553	0.9327	0.8325	0.8427	0.7578	0.8240	0.9938

Fuente: Elaboración Propia

	Control	0.05 μM	0.1 μM	0.3 μM	0.5 μM	1.5 μM	3.0 μM	5.0 μM
PROMEDIO	100%	95%	87%	82%	77%	75%	76%	84%
SD	4%	6%	7%	8%	9%	11%	11%	10%
SEM	1%	1%	1%	1%	2%	2%	2%	2%

Fuente: Elaboración Propia

ANALISIS DE VARIANZA DE UNA VIA EMITIDO POR SIGMA PLOT 12.5

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook3

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

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Data source: Data 1 in Notebook3

Group	N	Missing	Median	25%	75%
Control	20	0	1.013	0.966	1.043
0.05 μM	20	0	0.990	0.890	0.996
0.1 μM	20	0	0.869	0.812	0.932
0.3 μM	20	0	0.817	0.754	0.866
0.5 μM	20	0	0.769	0.698	0.835
1.5 μM	20	0	0.779	0.646	0.838
3.0 μM	20	0	0.785	0.719	0.823
5.0 μM	20	0	0.830	0.764	0.898

$H = 89.911$ with 7 degrees of freedom. ($P = <0.001$)

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

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

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

Comparison	Diff of Ranks	q'	P<0.05
1.5 μM vs Control	1941.500	7.569	Yes
0.5 μM vs Control	1918.500	7.479	Yes
3.0 μM vs Control	1904.500	7.425	Yes
0.3 μM vs Control	1535.500	5.986	Yes
5.0 μM vs Control	1443.500	5.627	Yes
0.1 μM vs Control	1023.500	3.990	Yes
0.05 μM vs Control	369.000	1.439	No

Note: The multiple comparisons on ranks do not include an adjustment for ties.

ANEXO 4

LECTURA DEL NIVEL DE ACTIVIDAD DE CASPASAS (RLU)

TRAS 3 HORAS DE TRATAMIENTO

Nivel de Actividad de Caspasas -3/7 (RLU)			
	Control	1.5 μ M	10 μ M
	0.9989	1.0294	1.1191
	1.0009	1.0320	1.1208
	1.0002	1.0312	1.1217
Promedio	1.0000	1.0309	1.1205
SD	0.10%	0.14%	0.13%
SEM	0.06%	0.08%	0.07%

Fuente: Elaboración Propia

ANALISIS DE VARIANZA DE UNA VIA EMITIDO POR SIGMA PLOT 12.5

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook2

Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0.089)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.844)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Control	3	0	1.000	0.00101	0.000586
1.5 μ M	3	0	1.031	0.00133	0.000769
10 μ M	3	0	1.121	0.00132	0.000762

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	2	0.0235	0.0118	7759.909	<0.001
Residual	6	0.00000909	0.00000152		
Total	8	0.0235			

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

Power of performed test with alpha = 0.050: 1.000

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

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	q'	P	P<0.050
Control vs. 10 μM	0.121	119.913	<0.001	Yes
Control vs. 1.5 μM	0.0309	30.708	<0.001	Yes



ANEXO 5

LECTURA DEL NIVEL DE ACTIVIDAD DE CASPASAS (RLU)

TRAS 6 HORAS DE TRATAMIENTO

Nivel de Actividad de Caspas-3/7			
	Control	1.5 μ M	10 μ M
	1.0000	1.0265	1.3821
	1.0000	1.0267	1.3819
	1.0000	1.0263	1.3824
Promedio	1.0000	1.0265	1.3821
SD	0.00%	0.02%	0.03%
SEM	0.00%	0.01%	0.02%

Fuente: Elaboración Propia

ANALISIS DE VARIANZA DE UNA VIA EMITIDO POR SIGMA PLOT 12.5

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0.773)

Equal Variance Test: Failed (P < 0.050)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Data source: Data 1 in Notebook1

Group	N	Missing	Median	25%	75%
Control	3	0	13901.000	13899.000	13903.000
1.5 μ M	3	0	14269.000	14264.000	14274.000
10 μ M	3	0	19213.000	19212.000	19214.000

H = 7.200 with 2 degrees of freedom. P(est.)= 0.027 P(exact)= 0.004

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0.004)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

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

Comparison	Diff of Ranks	q'	P<0.05
10 μ M vs Control	18.000	3.928	Yes
1.5 μ M vs Control	9.000	1.964	No

Note: The multiple comparisons on ranks do not include an adjustment for ties.



ANEXO 6

LECTURA DE ABSORBANCIAS DE LACTATO
DESHIDROGENASA TRAS 24 HORAS DE TRATAMIENTO

Blanco	Control Negativo	Control Positivo	10 μ m	λ
0.5180	0.7280	2.7700	0.6470	490nm
0.0420	0.0460	0.0840	0.0440	680nm
0.5050	0.6630	2.6460	0.6350	490nm
0.0420	0.0440	0.0790	0.0510	680nm
0.5115	0.6955	2.7080	0.6410	490nm
0.0420	0.0450	0.0815	0.0475	680nm

Fuente: Elaboración Propia

Nivel Citotoxicidad LDH (A490nm-A680nm)			
	Control Negativo	Control Positivo	10 μ m
	0.2125	2.2165	0.1335
	0.1495	2.0975	0.1145
	0.1810	2.1570	0.1240
PROMEDIO	0.1810	2.1570	0.1240
SD	3%	6%	1%
SEM	2%	3%	1%

Fuente: Elaboración Propia

ANALISIS DE VARIANZA DE UNA VIA EMITIDO POR SIGMA PLOT 12.5

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0.806)

Equal Variance Test: Failed (P < 0.050)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Data source: Data 1 in Notebook1

Group	N	Missing	Median	25%	75%
Control-	3	0	0.181	0.149	0.212
Control+	3	0	2.157	2.098	2.216
10 uM	3	0	0.124	0.115	0.134

H = 7.200 with 2 degrees of freedom. P(est.)= 0.027 P(exact)= 0.004

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0.004)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

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

Comparison	Diff of Ranks	q'	P<0.05
Control+ vs 10 uM	18.000	3.928	Yes
Control- vs 10 uM	9.000	1.964	No

Note: The multiple comparisons on ranks do not include an adjustment for ties.