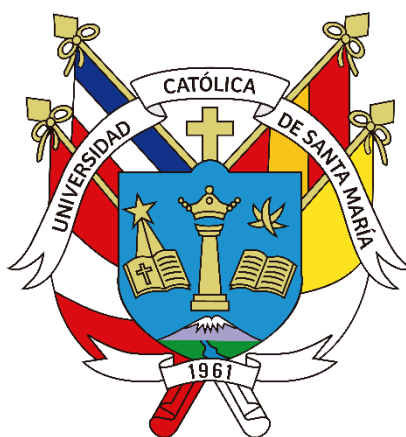


**Universidad Católica de Santa María**  
**Escuela de Postgrado**  
**Maestría en Bioquímica y Biología Molecular**



**ESTUDIO DE LA CITOTOXICIDAD DEL ÁCIDO CAFEICO, EL 1,8-  
CINEOL Y LA TRIPTANTRINA EN LAS LÍNEAS CELULARES DE  
CÁNCER DE MAMA MCF-7 Y MDA-MB-231**

Tesis presentada por el Bachiller

**Johnson Corrales, Fabrizio**

Para optar el Grado Académico de

**Maestro en Bioquímica y Biología Molecular**

Asesora:

**Mgter. Paredes Fuentes, Julitza Lindsey**

**Arequipa - Perú**

**2023**

UCSM-ERP

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA**  
**ESCUELA DE POSTGRADO**  
**DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR DE TESIS**

Arequipa, 30 de Octubre del 2023

**Dictamen: 010592-C-EPG-2023**

Visto el borrador del expediente 010592, presentado por:

**2021000641 - JOHNSON CORRALES FABRIZIO**

Titulado:

**ESTUDIO DE LA CITOTOXICIDAD DEL ácido CAFEICO, EL 1,8-CINEOL Y LA TRIPTANTRINA EN  
LAS LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA MCF-7 Y MDA-MB-231**

Nuestro dictamen es:

**APROBADO**

**29201360 - VILLANUEVA SALAS JOSE ANTONIO  
DICTAMINADOR**



**29440909 - MOLINA RODRIGUEZ FREDY NICOLAS  
DICTAMINADOR**



**71219609 - ITA BALTA YUMA ARACELY  
DICTAMINADOR**



# ESTUDIO DE LA CITOTOXICIDAD DEL ÁCIDO CAFEICO, EL 1,8-CINEOL Y LA TRIPTANTRINA EN LAS LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA MCF-7 Y MDA-MB-231

## INFORME DE ORIGINALIDAD

4%

INDICE DE SIMILITUD

4%

FUENTES DE INTERNET

3%

PUBLICACIONES

3%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1

Submitted to Temple University

Trabajo del estudiante

2%

2

cicese.repositorioinstitucional.mx

Fuente de Internet

1%

3

hdl.handle.net

Fuente de Internet

1%

4

www.frontiersin.org

Fuente de Internet

1%

Excluir citas

Apagado

Excluir coincidencias < 1%

Excluir bibliografía

Apagado

## Dedicatoria

*A Dios, por ser mi soporte y mi guía constante en todo momento.*

*A la ciencia y a las personas que padecen de cáncer, gracias por su lucha constante.*



## Agradecimientos

Al doctor Manuel Alberto Briceño Ortega por su incondicional apoyo y respaldo a lo largo de todos estos años, al doctor José Antonio Villanueva Salas, por su amistad y exigencia constante. A la maestra Julitza Paredes Fuentes, asesora paciente y dedicada. A la doctora Angelica Corzo, por sus consejos y guía en este trabajo.

A los integrantes del laboratorio de investigación en biología molecular y farmacología experimental por su apoyo a lo largo de estos meses: Mtro. José Miguel Carpio, Mtra. Jeaneth Medina, Mtra. Cecilia Sánchez, Mtra. Celia Choquenaira y a las tesoreras Bach. Brenda y Bach. Verónica. A la doctora Lena Gálvez por su apoyo y buena disposición. Y a los doctores Edilberto Medina y Claudio Villegas por sus consejos al inicio de este trabajo.

A la UCSM, mi alma mater, por formarme y acogerme, “...es la ciencia que es luz y verdad”

A mi familia y esposa, María Belén, por su infinito amor y apoyo formando un hogar excepcional. A mi mamá y abuelitos por su cariño incondicional. A mi hermana, Fabiana, por enseñarme el significado de resiliencia. A mis suegros, por su apoyo y respaldo.

A mis amigos, Paolo Velazco, Paulo Ciudad, Carlos Dávila, José Lazo y a todos los integrantes de la BSUCSM, que hacen de este grupo mi segunda familia.

A mis amigos, Luis Fernández, Camilo Febres y Cesar Del Carpio por su constante y sincera amistad.

A mis alumnos en quienes veo cada día el potencial para cambiar el mundo.

Y a los dictaminadores de este trabajo, doctor Fredy Molina y maestra Yuma Ita, que con sus aportes y guía pude completar este trayecto.

## Epígrafe



*“Escucha lo que te mando: **Esfuézate y sé valiente**. No temas ni desmayes, que yo soy el Señor tu Dios, y estaré contigo por dondequiera que vayas”*

**Josué 1:9**

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL .....	V
ÍNDICE DE TABLAS.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS .....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
RESUMEN .....	XIII
ABSTRACT .....	XIV
INTRODUCCIÓN .....	1
HIPÓTESIS.....	2
OBJETIVOS .....	3
<b>1. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>4</b>
1.1 CÁNCER DE MAMA .....	4
1.2 COMPUESTOS BIOACTIVOS EN LA CITOTOXICIDAD.....	5
1.3 ÁCIDO CAFEICO.....	5
1.3.1 Estructura y fuentes naturales.....	5
1.3.2 Actividades biológicas reportadas .....	6
1.4 1,8-CINEOL .....	6
1.4.1 Estructura y fuentes naturales.....	6
1.4.2 Actividades biológicas reportadas .....	7
1.5 TRIPTANTRINA .....	7
1.5.1 Estructura y fuentes naturales.....	7
1.5.2 Actividades biológicas reportadas .....	8
1.6 LÍNEAS CELULARES EN EL ESTUDIO DEL CÁNCER DE MAMA .....	8
1.6.1 MCF-07.....	9
1.6.2 MDA-MB-231.....	9
1.7 EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD.....	10
1.7.1 Citotoxicidad.....	10
1.7.2 Viabilidad celular y ensayo MTT .....	10
1.7.3 IC <sub>50</sub> .....	12
<b>2. METODOLOGIA .....</b>	<b>13</b>

2.1	TÉCNICAS PARA EL CULTIVO CELULAR .....	13
2.1.1	<i>Preparación del medio de cultivo.</i> .....	13
2.1.2	<i>Descongelación, cultivo y criopreservación de líneas celulares.</i> .....	13
2.1.3	<i>Tripsinización.</i> .....	14
2.1.4	<i>Conteo celular y evaluación de la viabilidad.</i> .....	15
2.2	PREPARACIÓN DE PLACAS DE CULTIVO (96 O 6 POCILLOS).....	16
2.3	PREPARACIÓN DE SOLUCIONES STOCK Y SOLUCIONES DE TRABAJO DE ACIDO CAFEICO, 1,8-CINEOL Y TRIPTANTRINA. ....	16
2.3.1	<i>Soluciones stock de Ácido cafeico.</i> .....	17
2.3.2	<i>Soluciones stock de 1,8-Cineol.</i> .....	17
2.3.3	<i>Soluciones stock de Triptantrina.</i> .....	18
2.4	ENSAYO MTT Y CÁLCULO DEL IC <sub>50</sub> .....	19
2.5	ENSAYO DE CICATRIZACIÓN CELULAR.....	20
2.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	21
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>22</b>
3.1	PRUEBAS PRELIMINARES .....	22
3.2	ENSAYO MTT .....	22
3.2.1	<i>MDA-MB-231</i> .....	22
3.2.2	<i>MCF-7</i> .....	24
3.3	IC <sub>50</sub> .....	25
3.3.1	<i>MDA-MB-231</i> .....	25
3.3.2	<i>MCF-7</i> .....	28
3.4	CICATRIZACIÓN CELULAR .....	31
3.4.1	<i>MDA-MB-231</i> .....	31
3.4.2	<i>MCF-7</i> .....	34
	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>38</b>
	<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>39</b>
	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>40</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>48</b>
	01 - RESULTADOS INDIVIDUALES ENSAYO MTT (MDA-MB-231) .....	48
	02 - RESULTADOS INDIVIDUALES ENSAYO MTT (MCF-7).....	51
	03 - IC <sub>50</sub> .....	54

04 - ANÁLISIS ESTADÍSTICO (IC <sub>50</sub> Y COMPARATIVAS ENTRE CONCENTRACIONES) .....	55
05 - ANÁLISIS ESTADÍSTICO (ENSAYO DE CICATRIZACIÓN).....	57
06 - ENSAYO MTT (FOTOGRAFÍAS MICROSCÓPICAS).....	58
07 - ENSAYO DE CICATRIZACIÓN (FOTOGRAFÍAS MICROSCÓPICAS).....	60



## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N°01: TABLA RESUMEN DE CONCENTRACIONES Y VOLÚMENES DE SOLUCIONES STOCK DE ÁCIDO CAFEICO PARA SU USO EN ENSAYOS DE LAS LÍNEAS CELULARES MDA-MB-231 Y MCF-7.....	17
TABLA N°02: TABLA RESUMEN DE CONCENTRACIONES Y VOLÚMENES DE SOLUCIONES STOCK DE 1,8-CINEOL PARA SU USO EN ENSAYOS DE LAS LÍNEAS CELULARES MDA-MB-231 Y MCF-7.....	18
TABLA N°03: TABLA RESUMEN DE CONCENTRACIONES Y VOLÚMENES DE SOLUCIONES STOCK DE TRIPTANTRINA PARA SU USO EN ENSAYOS DE LAS LÍNEAS CELULARES MDA-MB-231 Y MCF-7.....	18
TABLA N°04: TABLA DE RESULTADOS DE LOS ENSAYOS REALIZADOS EN LA LÍNEA CELULAR MDA-MB-231 CON ÁCIDO CAFEICO.....	23
TABLA N°05: TABLA DE RESULTADOS DE LOS ENSAYOS REALIZADOS EN LA LÍNEA CELULAR MDA-MB-231 CON 1,8-CINEOL.....	23
TABLA N°06: TABLA DE RESULTADOS DE LOS ENSAYOS REALIZADOS EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7 CON ÁCIDO CAFEICO.....	24
TABLA N°07: TABLA DE RESULTADOS DE LOS ENSAYOS REALIZADOS EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7 CON 1,8-CINEOL.....	24
TABLA N°08: TABLA DE RESULTADOS DEL ENSAYO DE CICATRIZACIÓN EN LA LÍNEA CELULAR MDA-MB-231 CON LA CONCENTRACIÓN $IC_{50}$ OBTENIDA DEL ÁCIDO CAFEICO, LOS RESULTADOS ESTÁN EXPRESADOS EN % DE CICATRIZACIÓN.....	31
TABLA N°09: TABLA DE RESULTADOS DEL ENSAYO DE CICATRIZACIÓN EN LA LÍNEA CELULAR MDA-MB-231 CON LA CONCENTRACIÓN $IC_{50}$ OBTENIDA DEL 1,8-CINEOL, LOS RESULTADOS ESTÁN EXPRESADOS EN % DE CICATRIZACIÓN.....	33
TABLA N°10: TABLA DE RESULTADOS DEL ENSAYO DE CICATRIZACIÓN EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7 CON LA CONCENTRACIÓN $IC_{50}$ OBTENIDA DEL ÁCIDO CAFEICO, LOS RESULTADOS ESTÁN EXPRESADOS EN % DE CICATRIZACIÓN.....	34
TABLA N°11: TABLA DE RESULTADOS DEL ENSAYO DE CICATRIZACIÓN EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7 CON LA CONCENTRACIÓN $IC_{50}$ OBTENIDA DEL 1,8-CINEOL.....	35

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N°01: ESTRUCTURA DEL ÁCIDO CAFEICO (17).....	6
FIGURA N°02: ESTRUCTURA DEL 1,8-CINEOL (24). ....	7
FIGURA N°03: ESTRUCTURA DE LA TRIPTANTRINA (33).....	8
FIGURA N°04: LÍNEA CELULAR MCF-07. ....	9
FIGURA N°05: LÍNEA CELULAR MDA-MB-231.....	10
FIGURA N°06: FUNDAMENTO DEL ENSAYO MTT (52).....	11
FIGURA N°07: ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO DE TRIPSINIZACIÓN (ELABORACIÓN PROPIA, CREADO CON BIORENDER.COM) .....	15
FIGURA N°08: ESQUEMA DE PROCEDIMIENTO PARA EL CONTEO Y EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD CON AZUL DE TRIPAN (ELABORACIÓN PROPIA, CREADO CON BIORENDER.COM). ....	16
FIGURA N°09: ESQUEMA DE PROCEDIMIENTO PARA EL CULTIVO DE CÉLULAS EN PLACAS DE 96 POCILLOS, ADICIÓN DE COMPUESTOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES Y ENSAYO MTT PARA EVALUAR LA VIABILIDAD CELULAR (ELABORACIÓN PROPIA, CREADO CON BIORENDER.COM).....	19
FIGURA N°10: ESQUEMA DE PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO DE CICATRIZACIÓN CELULAR (ELABORACIÓN PROPIA, CREADO CON BIORENDER.COM).....	20
FIGURA N°11: GRÁFICO DE CURVA DOSIS RESPUESTA DEL ÁCIDO CAFEICO EN LA LÍNEA CELULAR MDA-MB-231, LA LÍNEA PUNTEADA ES LA REGRESIÓN NO LINEAL GENERADA PARA EL CÁLCULO DEL IC <sub>50</sub> .....	25
FIGURA N°12: DIAGRAMA DE BARRAS QUE MUESTRA EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO COMPARATIVO DE LAS CONCENTRACIONES DEL ÁCIDO CAFEICO INFLUYENDO EN EL PORCENTAJE DE VIABILIDAD DE LA LÍNEA CELULAR MDA-MB-231. ....	26
FIGURA N°13: GRÁFICO DE CURVA DOSIS RESPUESTA DEL 1,8-CINEOL EN LA LÍNEA CELULAR MDA-MB-231, LA LÍNEA PUNTEADA ES LA REGRESIÓN NO LINEAL GENERADA PARA EL CÁLCULO DEL IC <sub>50</sub> . ....	27
FIGURA N°14: DIAGRAMA DE BARRAS QUE MUESTRA EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO COMPARATIVO DE LAS CONCENTRACIONES DEL 1,8-CINEOL INFLUYENDO EN EL PORCENTAJE DE VIABILIDAD DE LA LÍNEA CELULAR MDA-MB-231.....	27

FIGURA N°15: GRÁFICO DE CURVA DOSIS RESPUESTA DEL ÁCIDO CAFEICO EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7, LA LÍNEA PUNTEADA ES LA REGRESIÓN NO LINEAL GENERADA PARA EL CÁLCULO DEL  $IC_{50}$ . ..... 28

FIGURA N°16: DIAGRAMA DE BARRAS QUE MUESTRA EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO COMPARATIVO DE LAS CONCENTRACIONES DEL ÁCIDO CAFEICO INFLUYENDO EN EL PORCENTAJE DE VIABILIDAD DE LA LÍNEA CELULAR MCF-7..... 29

FIGURA N°17: GRÁFICO DE CURVA DOSIS RESPUESTA DEL 1,8-CINEOL EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7, LA LÍNEA PUNTEADA ES LA REGRESIÓN NO LINEAL GENERADA PARA EL CÁLCULO DEL  $IC_{50}$ ..... 30

FIGURA N°18: DIAGRAMA DE BARRAS QUE MUESTRA EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO COMPARATIVO DE LAS CONCENTRACIONES DEL 1,8-CINEOL INFLUYENDO EN EL PORCENTAJE DE VIABILIDAD DE LA LÍNEA CELULAR MCF-7..... 30

FIGURA N°19: GRÁFICO DE CURVAS DE CICATRIZACIÓN EN LA LÍNEA CELULAR MDA-MB-231 CON EL VALOR  $IC_{50}$  OBTENIDO DEL ÁCIDO CAFEICO..... 32

FIGURA N°20: GRÁFICO DE CURVAS DE CICATRIZACIÓN EN LA LÍNEA CELULAR MDA-MB-231 CON EL VALOR  $IC_{50}$  OBTENIDO DEL 1,8-CINEOL. .... 33

FIGURA N°21: GRÁFICO DE CURVAS DE CICATRIZACIÓN EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7 CON EL VALOR  $IC_{50}$  OBTENIDO DEL ÁCIDO CAFEICO. .... 34

FIGURA N°22: GRÁFICO DE CURVAS DE CICATRIZACIÓN EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7 CON EL VALOR  $IC_{50}$  OBTENIDO DEL 1,8-CINEOL..... 35

## LISTA DE ABREVIATURAS

**MDA-MB-231:** *MD Anderson Cancer Center – Breast - 231*

**MCF-7:** *Michigan Cancer Foundation - 7*

**MTT:** 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

**IC<sub>50</sub>:** Concentración inhibitoria media 50%

**MINSA:** Ministerio de Salud

**ERBB2:** Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano

**HER2:** Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano

**ER:** Receptor de estrógeno

**PR:** Receptor de progesterona

**MTS:**(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonatofenil)-2H tetrazolio)

**WST:** *Water-Soluble Tetrazolium*

**DMEM:** Medio de Eagle modificado de Dulbecco

**SFB:** Suero fetal bovino

**UV:** Ultravioleta

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético

**P.M.:** Peso molecular

**HPLC:** Cromatografía líquida de alta resolución

**ANOVA:** Análisis de varianza

**$\bar{X}$ :** Media

**DS:** Desviación estándar

**CV%:** Coeficiente de variación porcentual

**NF- $\kappa$ B:** Factor nuclear kappa B

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno

**Akt:** Proteína quinasa B (PKB)

**PARP:** Poli (ADP-ribosa) polimerasa



## RESUMEN

El cáncer de mama es una de las principales causas de muerte en mujeres en todo el mundo. Para abordar este desafío, el presente trabajo de investigación se centró en estudiar la citotoxicidad de tres compuestos que se pueden encontrar de manera natural: ácido cafeico, 1,8-cineol y triptantrina, en dos líneas celulares de cáncer de mama, MDA-MB-231 y MCF-7. Para ello se determinó las concentraciones más adecuadas de estos compuestos para poder generar datos de viabilidad celular (ensayo MTT) que permitiera calcular el valor  $IC_{50}$  para cada caso: MDA-MB-231 (ácido cafeico): 730  $\mu$ M, MDA-MB-231 (1,8-cineol): 8.095 mM, MCF-7 (ácido cafeico): 1028  $\mu$ M, MCF-7 (1,8-cineol): 10.34 mM. Con ello se realizó ensayos de cicatrización celular, corroborando a través de estos que los compuestos evaluados detienen el crecimiento celular mostrando una diferencia significativa con respecto al grupo control. Estos resultados destacan el potencial de los compuestos naturales y aporta información para continuar con investigaciones similares que permitan desarrollar nuevas terapias.

**Palabras clave:** Cáncer de mama, Citotoxicidad, ácido cafeico, 1,8-cineol y triptantrina

## ABSTRACT

Breast cancer is one of the leading causes of death in women worldwide. To address this challenge, this research focused on studying the cytotoxicity of three naturally occurring compounds: caffeic acid, 1,8-cineole, and tryptantrin, in two breast cancer cell lines, MDA-MB-231 and MCF-7. To achieve this, the most appropriate concentrations of these compounds were determined to generate cell viability data (MTT assay) that allowed for the calculation of the IC<sub>50</sub> value for each case: MDA-MB-231 (caffeic acid): 730  $\mu$ M, MDA-MB-231 (1,8-cineole): 8.095 mM, MCF-7 (caffeic acid): 1028  $\mu$ M, MCF-7 (1,8-cineole): 10.34 mM. Scratch assays were conducted, confirming that the evaluated compounds inhibit cell growth, showing a significant difference compared to the control group. These results highlight the potential of natural compounds and provide information to support further similar research that can lead to the development of new therapies.

**Keywords:** Breast cancer, Cytotoxicity, caffeic acid, 1,8-cineole, and tryptantrin.

## INTRODUCCIÓN

Millones de mujeres se ven afectadas cada año por el cáncer de mama, una de las enfermedades oncológicas más comunes y peligrosas del mundo. Aunque ha habido mejoras sustanciales en nuestra comprensión de la biología del cáncer de mama y la creación de medicamentos más potentes, continúa la necesidad de una terapia más dirigida y libre de tóxicos. En este sentido, el trabajo actual se centra en examinar la citotoxicidad de tres compuestos que pueden encontrarse de manera natural en plantas (ácido cafeico, 1,8-cineol y triptantrina), en dos líneas celulares de cáncer de mama, MDA-MB-231 y MCF-7.

Dado que representan dos subgrupos clínicamente significativos de la enfermedad, las líneas celulares MDA-MB-231 (triple negativo) y MCF-7 (positiva para los receptores de estrógeno y progesterona) se han convertido en modelos cruciales para la investigación del cáncer de mama. Estas líneas celulares muestran rasgos distintivos y perfiles de expresión genética, que contribuyen significativamente a su utilidad en la investigación oncológica.

El presente trabajo busca evaluar la citotoxicidad de los compuestos antes mencionados en estas líneas celulares, para evaluar su potencial como agentes terapéuticos (elucidando su concentración inhibidora media máxima). Para ello, se realizaron una serie de ensayos *in vitro*. Estos ensayos evaluaron la viabilidad celular (ensayo MTT), determinaron los valores  $IC_{50}$  y con ello se evaluó el efecto de las concentraciones obtenidas en un ensayo de cicatrización celular.

Esta investigación pretende mejorar nuestra comprensión en los efectos letales de estos compuestos en líneas celulares de cáncer de mama, lo que puede proporcionar nuevos conocimientos sobre el desarrollo de tratamientos más seguros y potentes para esta enfermedad mortal. Abriendo la posibilidad de nuevos estudios que permitan dilucidar los posibles modos de acción de estos compuestos, lo que podría resultar útil en la creación de planes de tratamiento individualizados para pacientes con cáncer de mama.

## HIPÓTESIS

Dado que el ácido cafeico, el 1,8-cineol y la triptantrina son compuestos con propiedades potencialmente anticancerígenas, es probable que se pueda determinar la citotoxicidad en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 para el reporte y posterior evaluación como alternativas de tratamiento contra el cáncer de mama.



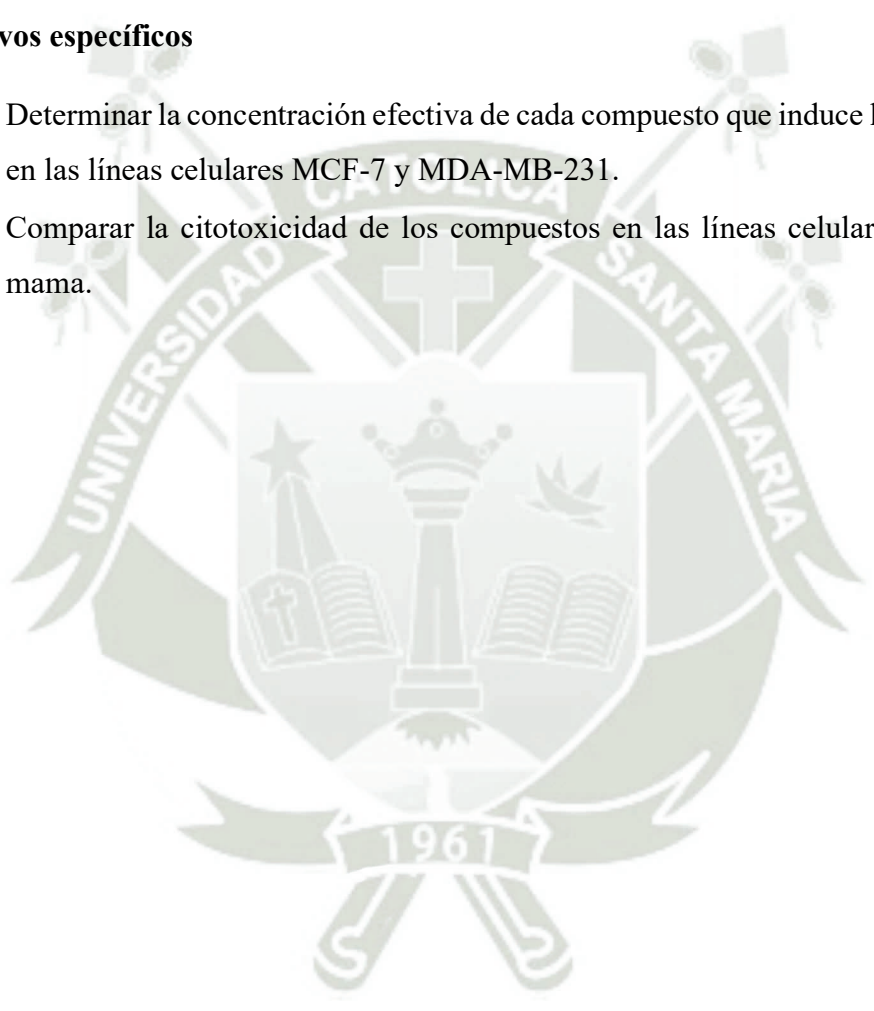
## OBJETIVOS

### Objetivo general

- Evaluar la citotoxicidad del ácido cafeico, el 1,8-cineol y la triptantrina en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231.

### Objetivos específicos

- Determinar la concentración efectiva de cada compuesto que induce la muerte celular en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231.
- Comparar la citotoxicidad de los compuestos en las líneas celulares de cáncer de mama.



## CAPÍTULO I

### 1. MARCO TEÓRICO

#### 1.1 Cáncer de mama

El cáncer de mama es la neoplasia maligna con mayor incidencia en mujeres de todo el mundo con un aproximado de 2,3 millones de casos nuevos por año. Esto lo convierte en un importante problema de salud pública en América Latina y el Caribe con más 210 mil casos nuevos por año y alrededor de 60 mil muertes por año (1,2).

De acuerdo con el reporte del Ministerio de Salud del Perú del año 2021, se estima que la incidencia anual de esta enfermedad en el país es del 0.028 %, siendo las regiones de Lima, Callao, Tumbes, Piura, Lambayeque y La Libertad las de mayor índice. Además, el cáncer de mama es la segunda neoplasia más frecuente en el Perú, afectando principalmente a mujeres mayores a los 35 años. Según el último reporte del Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades del Perú del año 2023, en el Perú el cáncer de mama es el segundo tipo de cáncer más común (1224 casos en establecimientos MINSA) después del cáncer de cuello uterino (3,4).

Este tipo de cáncer se divide en 3 tipos según la presencia o ausencia de diferentes proteínas en las células. El cáncer de mama con receptor hormonal positivo representa el 70 % de los casos y tiene la proteína receptora de estrógeno (ER) o receptora de progesterona (PR) en las células cancerosas. El cáncer de mama ERBB2 positivo (anteriormente conocido como HER2 positivo) representa del 15% al 20% de los casos de este tipo de cáncer y tiene altos niveles de proteína ERBB2 en las células cancerosas; y el cáncer de mama triple negativo que representa el 15% de los casos y no tiene proteína ER, PR o ERBB2 en las células cancerosas (5,6).

Diferentes tratamientos funcionan para diferentes formas de cáncer de mama. Los comprimidos antiestrógenos son el tratamiento más eficaz para el cáncer de mama con receptores hormonales positivos. Algunos pacientes también requieren tratamientos de quimioterapia por vía intravenosa. Los medicamentos intravenosos que abordan específicamente la proteína ERBB2 aberrante, así como la quimioterapia intravenosa, se usan para tratar el cáncer de mama positivo para ERBB2 y por su lado la quimioterapia intravenosa se usa para tratar el cáncer de mama triple negativo (5,7).

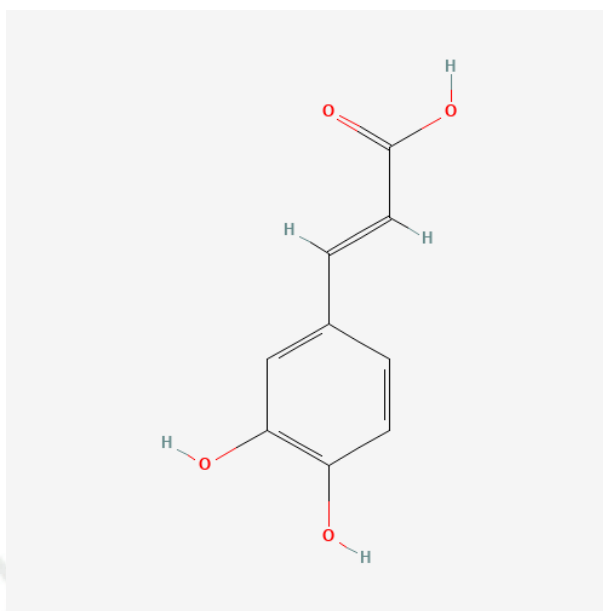
## 1.2 Compuestos bioactivos en la citotoxicidad

A pesar de las diversas opciones de tratamiento, la incidencia del cáncer de mama está aumentando. Como resultado, la identificación y detección de nuevos medicamentos con capacidades contra el cáncer de mama es fundamental. Diferentes plantas medicinales tienen un alto contenido de compuestos bioactivos de varias familias químicas (flavonoides, alcaloides, terpenoides, ácidos fenólicos entre otros) que tienen propiedades anticancerígenas, incluidos efectos contra el cáncer de mama (8–10). Las investigaciones más recientes indican que las plantas medicinales y sus compuestos bioactivos son agentes importantes en el tratamiento del cáncer de mama a través de varios mecanismos. Varias investigaciones *in vitro* basadas en pruebas de cultivos celulares demostraron que los extractos de plantas medicinales y los aceites esenciales presentan efectos anti-proliferativos contra diferentes líneas celulares de cáncer de mama (10–12).

## 1.3 Ácido cafeico

### 1.3.1 Estructura y fuentes naturales

El ácido cafeico (3,4-dihidroxicinámico) es un ácido hidroxicinámico de la familia de los ácidos fenólicos con estructura fenilpropanoide (C6-C3) que incluye un anillo aromático 3,4-dihidroxiado unido a un ácido carboxílico. Esta molécula se biosintetiza en las plantas a través de la vía del shikimato endógeno, que es responsable de la generación de aminoácidos aromáticos a partir de la glucosa, que se encuentra normalmente en los tejidos de las plantas. Este polifenol se puede encontrar en el café, las aceitunas, las papas, las zanahorias, el propóleo, los arándanos y las manzanas, entre otros alimentos. El ácido cafeico también se puede encontrar en ciruelas, arándanos, aronias negras y numerosas hierbas de la familia de la menta como la salvia, el tomillo, el orégano, la mejorana o la menta verde (13–16). Estudios de absorción de este compuesto en el ser humano reportan hasta un 95% de absorción sugiriendo que la mayoría de este compuesto se absorbe en el intestino delgado (17).



**Figura N°01: Estructura del ácido cafeico (18)**

### 1.3.2 Actividades biológicas reportadas

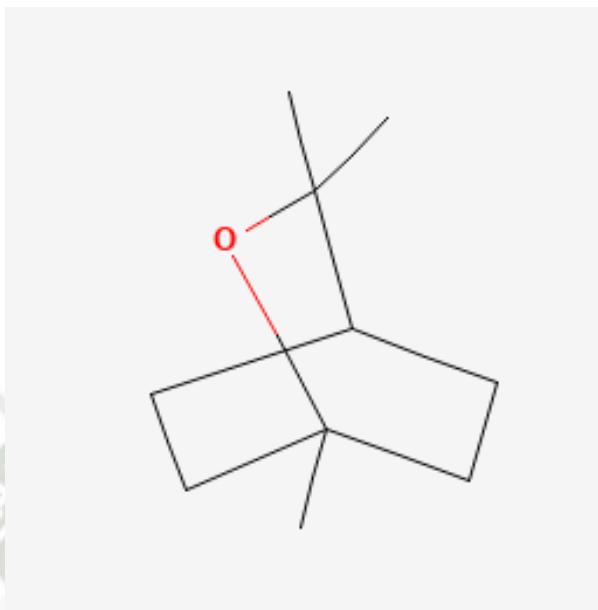
Las propiedades del ácido cafeico son importantes en muchos efectos beneficiosos para la salud humana. Khan y colaboradores reportaron por ejemplo detalladamente las propiedades antioxidantes del ácido cafeico contra numerosos tipos de radicales libres (19). Ha habido numerosos estudios que describen la acción antiproliferativa del ácido cafeico en varios tipos de células cancerosas. El ácido cafeico puede influir en las células cancerosas solo o en combinación con medicamentos contra el cáncer, tal vez reduciendo la dosis del tratamiento contra el cáncer o previniendo o superando la resistencia a los medicamentos (16). Además de actuar como inhibidor cancerígeno, también se sabe que posee actividad antioxidante y antibacteriana *in vitro*, y puede contribuir a la prevención de la aterosclerosis y otras enfermedades cardiovasculares (10,13,20,21).

## 1.4 1,8-Cineol

### 1.4.1 Estructura y fuentes naturales

El 1,8-cineol es una molécula monoterpénica que se produce de forma natural y tiene un aroma agradable que se usa con frecuencia como agente saborizante en alimentos y productos químicos cotidianos (enjuagues bucales y supresores de la tos) (22). El 1,8-cineol también llamado eucaliptol es un compuesto terpénico encontrado en una amplia gama de plantas como el eucalipto (componente sustancial, hasta un 90 % o

más del aceite esencial), el romero, la salvia, el laurel, el laurel de alcanfor, la canela y el té (23,24).



**Figura N°02: Estructura del 1,8-cineol (25).**

#### **1.4.2 Actividades biológicas reportadas**

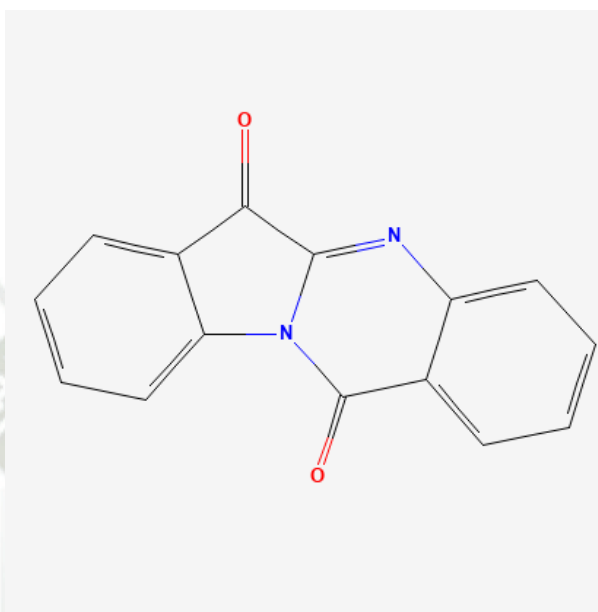
Se han observado propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, antioxidantes, analgésicas y espasmolíticas del 1,8-cineol en una variedad de trastornos como resfriados, influenza, otras infecciones respiratorias, rinitis y sinusitis. Se ha demostrado que este compuesto tiene efectos en una variedad de trastornos inflamatorios, incluidas enfermedades respiratorias, pancreatitis, enfermedades cardiovasculares y neurológicas, y reducción del daño del colon (26–28). Además, se ha reportado que este compuesto cuenta con propiedades anticancerígenas reportadas en distintos estudios (29–31).

### **1.5 Triptantrina**

#### **1.5.1 Estructura y fuentes naturales**

La triptantrina es un alcaloide, base débil de amarillo. La nomenclatura química de la sustancia es (6,12-dihidro-6,12-dioxindolo-(2,1-b)-quinazolina), y es un antibiótico alcaloidal de indoloquinazolina. Está formado por un resto de indol con grupos carbonilo en las posiciones 6 y 12 fusionados a un anillo de quinazolina.

Antes de identificarse a partir de la planta medicinal china *Strobilanthes cusia* Kuntze (campana de lluvia china), inicialmente se aisló de un cultivo de la levadura *Candida lipolytica*. Otras especies de plantas también contienen este compuesto, como *Isatis*, *Clanthe*, *Wrightia* y *Couroupota* (32,33).



**Figura N°03: Estructura de la triptantrina (34).**

### 1.5.2 Actividades biológicas reportadas

La triptantrina tiene una serie de propiedades biológicas, como la capacidad de inhibir el crecimiento de *Leishmania donovani*, *Trypanosoma brucei* y *Plasmodium falciparum*, así como la capacidad de inhibir la inflamación, ya sea inhibiendo la actividad de la ciclooxygenasa-2 o regulando la expresión de la óxido nítrico sintasa (33,35,36). Se ha demostrado que la triptantrina tiene acción anticancerígena *in vitro* en varias líneas celulares de cáncer, que incluyen leucemia U937, glioma U251, colon SW620 y pulmón H5229 (35). Además de ello se ha reportado propiedades antimicrobianas, antifúngicas y citotóxicas (37).

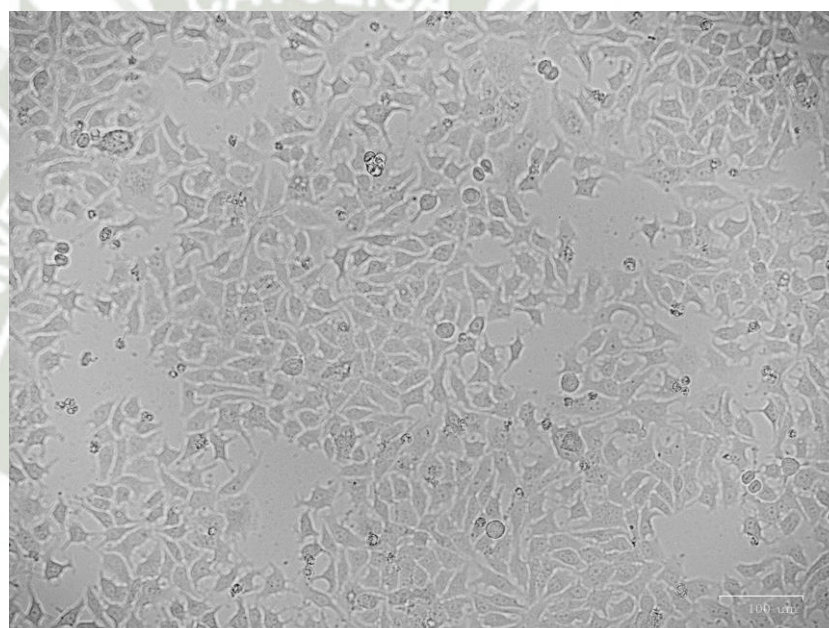
### 1.6 Líneas celulares en el estudio del cáncer de mama

Las líneas celulares de cáncer de mama se han utilizado ampliamente para el modelado de cáncer de mama que abarca un panel de enfermedades con distintas asociaciones fenotípicas. En la revisión de Dai y colaboradores reportan 84 líneas celulares, dentro

de ellas las que más destacan en los modelos *in vitro* podemos encontrar a las líneas MCF-07 y MDA-MB-23 (38).

### 1.6.1 MCF-07

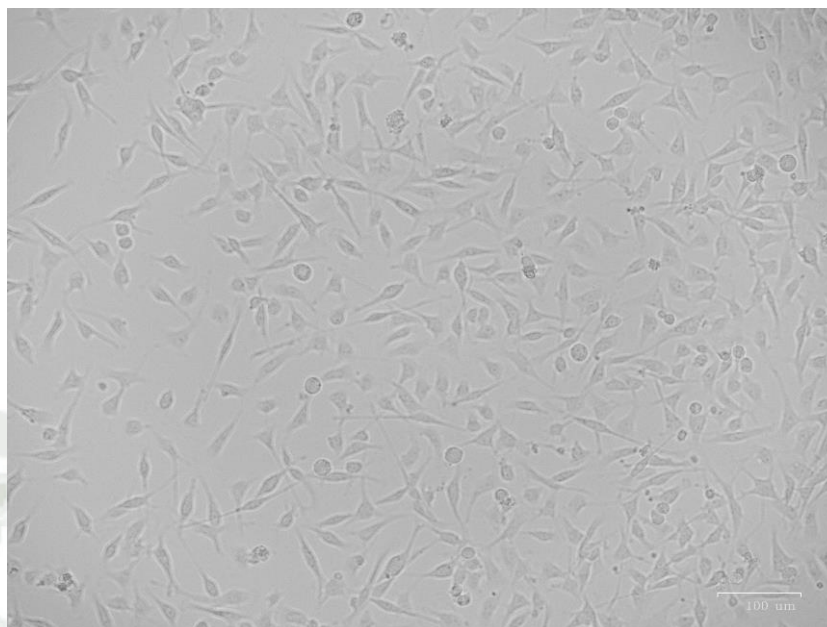
La línea celular MCF-7 fue aislada por Soule en 1973 en la *Michigan Cancer Foundation* de una mujer de 69 años con enfermedad metastásica (39). Sirve como una línea celular modelo útil para la investigación sobre el cáncer de mama en todo el mundo, incluidos los estudios que incluyen medicamentos contra el cáncer. Es ER y PR positivo. MCF-7 es una línea celular con un potencial limitado de metástasis que también es débilmente agresiva y no invasiva (40–42).



**Figura N°04: Línea celular MCF-07 (Fuente propia).**

### 1.6.2 MDA-MB-231

La línea celular MDA-MB-231 es una línea celular epitelial de cáncer de mama humano que se aisló a partir de un derrame pleural de una mujer caucásica de 51 años con un adenocarcinoma mamario metastásico en el Centro Oncológico MD Anderson por J.W. Shay y colaboradores. Se trata de una línea agresiva e invasiva, que carece de expresión del receptor de estrógeno (ER) y del receptor de progesterona (PR), así como de la amplificación de HER2 (receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano), por lo tanto, esta línea celular se denomina línea celular de cáncer de mama triple negativo (43–45).



**Figura N°05: línea celular MDA-MB-231 (Fuente propia).**

## **1.7 Evaluación de la Citotoxicidad**

La evaluación de la citotoxicidad es crucial para determinar los posibles efectos de ciertos compuestos bioactivos en determinadas líneas celulares empleando distintos ensayos y técnicas que pueden determinar el nivel de daño o muerte celular inducido por estos compuestos. Por ello es importante tener en cuenta los siguientes conceptos:

### **1.7.1 Citotoxicidad**

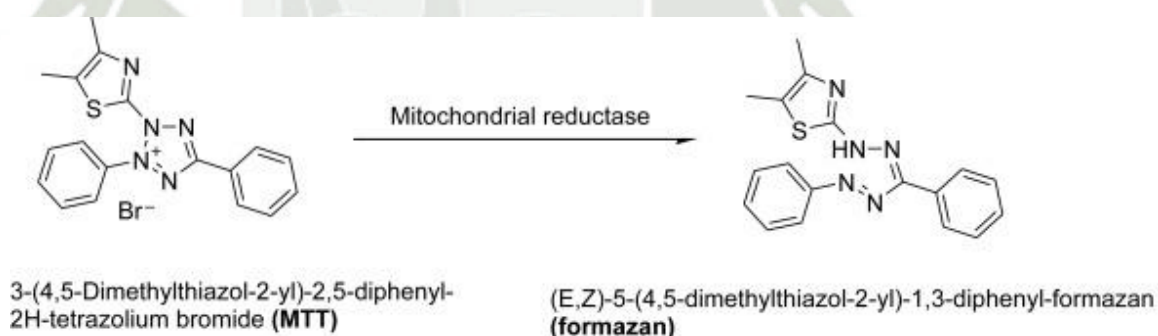
El efecto de ciertos compuestos que son tóxicos para las células se conoce como citotoxicidad. Los agentes citotóxicos se definen como cualquier agente que inhibe el crecimiento celular y, en ciertos casos, inducen la muerte celular. La citotoxicidad puede ser causada por factores químicos, biológicos o físicos que afectan a las células en distintos grados. Por ejemplo, compuestos que limitan la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas en la célula y que interrumpen las vías de generación de energía celular o comprometen la integridad de la membrana celular (46,47).

### **1.7.2 Viabilidad celular y ensayo MTT**

La viabilidad celular se define como el número de células sanas en una muestra, se puede evaluar mediante alteraciones morfológicas, cambios en la permeabilidad de la membrana y/o estado fisiológico deducidos de la exclusión de algunos colorantes o la captación y retención de otros (48). Es entonces que la medición de la viabilidad

celular juega un rol importante en muchos trabajos de investigación siendo los ensayos más utilizados el MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), XTT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfophenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida), MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonatofenil)-2H-tetrazolio), WST (2-(4-Iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio) y los métodos basados en resazurina (Azul de Alamar) (49,50).

Entre los ensayos de viabilidad que dependen de la conversión de sustrato en producto cromogénico por células vivas, el ensayo MTT sigue siendo uno de los ensayos más utilizados. El ensayo MTT implica la conversión del colorante amarillo hidrosoluble MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio) (Azul de tiazolil Bromuro de tetrazolio) en cristales de formazán color púrpura e insolubles (por la acción de la reductasa mitocondrial dado que, para la mayoría de las poblaciones celulares, la actividad mitocondrial total está relacionada con el número de células viables). Una vez obtenido el formazán este se solubiliza y se determina la concentración por densidad óptica a 570 nm. El resultado es un ensayo sensible con buena linealidad (51,52).



**Figura N°06: Fundamento del ensayo MTT (53)**

El ensayo MTT es adecuado para determinar la susceptibilidad a un determinado compuesto o fármaco tanto en células primarias como en líneas celulares establecidas. La sensibilidad al compuesto se define típicamente como la concentración necesaria para lograr la inhibición del crecimiento de las células en división, donde la reducción en el número de células significa inhibición del crecimiento celular del 50 % frente al crecimiento del control sin tratar (50 % de concentración inhibidora: IC<sub>50</sub>) (54).

### 1.7.3 IC<sub>50</sub>

El concepto de la mitad de la concentración inhibitoria máxima (IC<sub>50</sub>) se usa ampliamente en el mundo farmacéutico como una medida de la eficacia en la inhibición de funciones biológicas. El valor IC<sub>50</sub> indica la concentración del inhibidor que se requiere para inhibir a la mitad una determinada función biológica o bioquímica (55). Como menciona Sebaugh en su artículo el concepto de IC<sub>50</sub> se utiliza al principio del proceso de descubrimiento para evaluar la idoneidad y el rendimiento de un compuesto o fármaco y determinar si las estructuras moleculares de los compuestos probados tienen las propiedades deseadas siendo el objetivo descubrir aquellos que tienen más probabilidades de tener las cualidades deseadas (56). Para la creación de medicamentos seguros y eficaces, así como para la evaluación de la toxicidad de las sustancias en la investigación científica, conocer el IC<sub>50</sub> es fundamental para comprender la potencia y la selectividad de los compuestos que influyen en las respuestas biológicas.



## CAPÍTULO II

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1 Técnicas para el cultivo celular

##### 2.1.1 Preparación del medio de cultivo.

Se preparó Medio Eagle Modificado de Dulbecco, glucosa elevada (DMEM) de Sigma-Aldrich. Para esto se siguió las indicaciones del inserto del fabricante y para 1 litro de volumen final de medio se pesó en la balanza Pioneer (Ohaus), 13.5 gramos del medio en polvo y se diluyó con un volumen de 700 mL de agua ultrapura para luego agregarle 44 mL de  $\text{NaHCO}_3$  (solución inyectable de PharmaGen), una vez disuelto todo el polvo y homogenizado todo el contenido en el matraz se procedió a ajustar el pH a 7,4 verificando esto con el potenciómetro 827 pHlab (Metrohm). Finalmente se enrazó al volumen final (1000 mL) y se filtró en el sistema Stericup – Express PLUS (0.10  $\mu\text{m}$ ) de Millipore conectado adecuadamente al sistema de vacío. Todo este procedimiento se realizó en la cabina de seguridad Airstream (Esco), así mismo, todo el material y equipos utilizados fueron irradiados con luz UV por un periodo de 15 minutos, antes de dar inicio al procedimiento descrito.

Luego de obtenido el medio, se repartió en alícuotas en tubos cónicos de 50 mL, agregando 44 mL de DMEM, para luego adicionarle 5mL de Suero Fetal Bovino (SFB) (Sigma-Aldrich) previamente descongelado y alícuotado para finalmente agregarle 500  $\mu\text{L}$  de la solución estabilizada de Penicilina-Estreptomicina-Neomicina (Sigma-Aldrich) y 500  $\mu\text{L}$  de la solución de Anfotericina B (Capricorn). Obteniendo medio DMEM (10% SFB) suplementado con solución de antibióticos y antimicótico. También se preparó medio DMEM sin SFB, para obtener diluciones del medio a diferentes porcentajes de SFB.

##### 2.1.2 Descongelación, cultivo y criopreservación de líneas celulares.

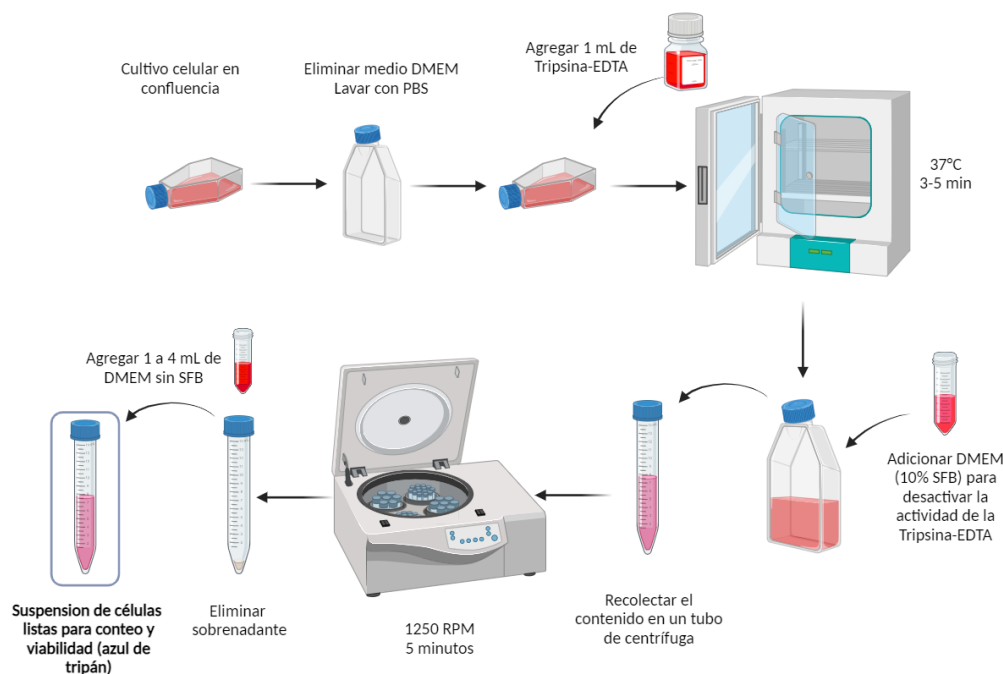
Los viales que contienen las líneas celulares criopreservadas se descongelaron a 37°C y se agregó 500  $\mu\text{L}$  en un T-Flask de 25  $\text{cm}^2$  con 4 mL de medio DMEM (10% SFB). Se dejó en incubación por 48 horas en la Incubadora  $\text{CO}_2$  Series 8000WJ (Thermo Scientific) a 37°C y 5 % de  $\text{CO}_2$ , luego de este periodo de tiempo se observó si el medio cambio de color (indicación de cambio de pH) y se hizo observaciones en el microscopio invertido ZOE (Bio-Rad) para verificar la confluencia celular. De no llegar a confluencia se cambia de medio y se reemplaza por uno nuevo hasta el siguiente día y lograr la confluencia deseada. Una vez que el T-Flask llegó a

confluencia se procede a la tripsinización para obtener volúmenes de medio con células que nos permitiera trabajar en placas de 96 o 6 pocillos o bien hacer más repiques en T-Flask de 25 o 75 cm<sup>2</sup> (importante seguir haciendo observaciones microscópicas para verificar la integridad y confluencia celular, así como siempre rotular el número de pase en el que se encuentra la línea celular con la que se está trabajando). Después de un periodo de trabajo, las líneas celulares fueron de nuevo criopreservadas, se preparó un vial de criopreservación con 65 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), 745 µL de SFB y 500 µL de medio DMEM con las células en suspensión, se llevó a -20°C por un periodo de 2 horas, luego a -80°C en la ultracongeladora U101-Innova (New Brunswick) por un periodo de 6 a 8 horas para finalmente ser llevado a un tanque de criopreservación con nitrógeno líquido de manera permanente.

### **2.1.3 Tripsinización.**

Una vez obtenida la confluencia deseada en los T-Flask de trabajo se realizó la tripsinización para cosechar las células obtenidas y ser distribuidas en las placas de 96 o 6 pocillos de trabajo. Para esto se siguió el siguiente procedimiento:

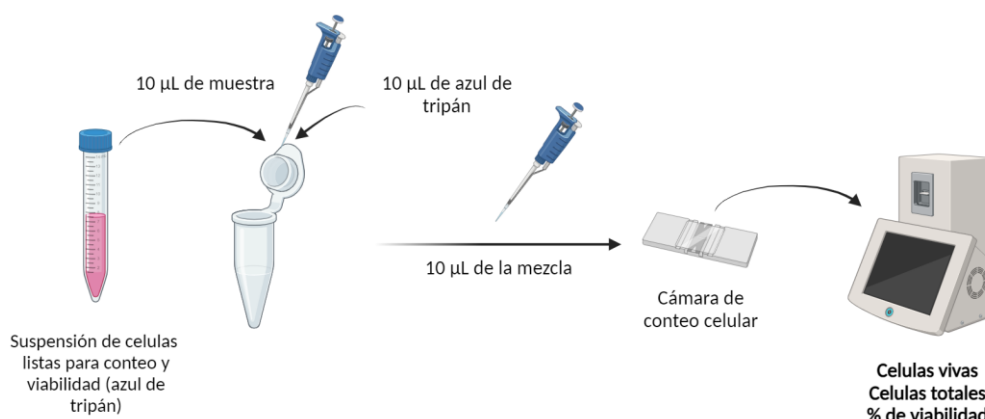
Se eliminó el medio y se lavó con 2 mL de Buffer Fosfato Salino (PBS 1X) (BioRad), se le agregó 1 mL de Tripsina – EDTA (Sigma-Aldrich), previamente alicuotada y descongelada. Se llevó a incubación a 37°C por un periodo de 3 a 5 minutos, inmediatamente después se agregó 2 mL de medio DMEM (10% SFB) homogenizando ligeramente para luego ser recolectado en un tubo cónico de centrifuga de 15 mL, se centrifugó a 1250 rpm por 5 minutos en la centrifuga Universal 320 (Hettich) culminado este tiempo se eliminó cuidadosamente el sobrenadante y finalmente se agregó entre 1 a 4 mL de medio DMEM (sin SFB) resuspendiendo el contenido ligeramente.



**Figura N°07: Esquema del procedimiento de tripsinización (Elaboración propia, creado con BioRender.com)**

#### 2.1.4 Conteo celular y evaluación de la viabilidad.

Obtenidas las células en suspensión se procedió a hacer el conteo celular y evaluación de su viabilidad, para esto se tomó 10  $\mu\text{L}$  de la suspensión de células y en un microtubo se le agrega a este volumen 10  $\mu\text{L}$  de Azul de Tripán (Sigma-Aldrich), se hizo una homogenización con la ayuda de una micropipeta y se transfirió 10  $\mu\text{L}$  de la mezcla a un portaobjetos (lamina) de doble cámara (BioRad) para luego hacer la medición en el contador de células automatizado TC20 (BioRad). El contador da como resultado los datos de: Células vivas, Células totales y % de viabilidad. Con estos datos se hicieron los cálculos respectivos de dilución y se tiene en cuenta siempre el porcentaje de viabilidad, procurando que este siempre sea superior al 95%.



**Figura N°08: Esquema de procedimiento para el conteo y evaluación de la viabilidad con Azul de Tripán (Elaboración propia, creado con BioRender.com).**

## 2.2 Preparación de placas de cultivo (96 o 6 pocillos).

Después de conocer la concentración celular de la suspensión de células, se hace las diluciones correspondientes (con medio DMEM, 2% SFB) para llegar a las soluciones de trabajo, para el caso de la línea celular MDA-MB-231 se trabajó a una concentración celular de  $7 \times 10^4$  cel./mL. Mientras que para la línea celular MCF-7 la concentración de trabajo fue de  $2 \times 10^4$  cel./mL. Para placas de 96 pocillos el volumen final de trabajo fue de 150 µL por cada pocillo y en las placas de 6 pocillos este volumen fue 2.5 mL. Se dejó estas placas por un periodo de 24 horas en incubación (37°C y 5% CO<sub>2</sub>) para que las células se adhieran a los pocillos, para finalmente reemplazar el medio utilizado por medio DMEM, 2% SFB con las concentraciones de los compuestos que se desean evaluar. Para el trabajo en placas de 96 pocillos (para evaluación de la viabilidad por MTT) fue necesario considerar 5 columnas de pocillos para las distintas concentraciones de los compuestos, 1 columna para el control y 1 columna para el blanco. Todas estas columnas con un total de 6 repeticiones y procurando no utilizar los pocillos de los bordes.

## 2.3 Preparación de soluciones stock y soluciones de trabajo de Acido Cafeico, 1,8-Cineol y Triptantrina.

Para las pruebas preliminares y ensayos finales de cada compuesto con ambas líneas celulares fue necesario generar soluciones stock, para a partir de estas preparar las diluciones con las concentraciones finales de trabajo.

### 2.3.1 Soluciones stock de Ácido cafeico.

Para preparar la solución stock y diluciones de Ácido Cafeico (P.M.: 180,16 g/mol) (Calbiochem) se disolvió el compuesto en DMSO (para biología molecular, Sigma-Aldrich), luego se obtuvo soluciones intermedias (disueltas también con DMSO) que permitieron trabajar a un solo volumen para el pase a concentraciones finales, en este caso el volumen fue de 10  $\mu$ L para un volumen final de 2000  $\mu$ L (medio de cultivo). Una vez obtenido el medio de cultivo con las concentraciones finales de trabajo se reemplazó el medio y se dejó por un periodo de 24 horas para evaluar el efecto de este compuesto a diferentes concentraciones en las líneas celulares seleccionadas.

**Tabla N°01: Tabla resumen de concentraciones y volúmenes de soluciones stock de Ácido Cafeico para su uso en ensayos de las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7.**

<b>800 mM</b>	25 $\mu$ L	40 mM	10 $\mu$ L	200 $\mu$ M
	50 $\mu$ L	80 mM	10 $\mu$ L	400 $\mu$ M
	75 $\mu$ L	120 mM	10 $\mu$ L	600 $\mu$ M
	100 $\mu$ L	160 mM	10 $\mu$ L	800 $\mu$ M
	125 $\mu$ L	200 mM	10 $\mu$ L	1000 $\mu$ M
	150 $\mu$ L	240 mM	10 $\mu$ L	1200 $\mu$ M
<i>Solución Stock</i>	<i>Volumen de la solución stock</i>	<i>Concentraciones de la soluciones intermedias</i>	<i>Volumen de las soluciones intermedias</i>	<i>Concentraciones finales en medio de cultivo</i>
		<b>Vol. final = 500 <math>\mu</math>L</b>		<b>Vol. final=2000 <math>\mu</math>L</b>

### 2.3.2 Soluciones stock de 1,8-Cineol.

Para preparar la solución stock y diluciones de 1,8-Cineol (P.M.: 154,249 g/mol) (Sigma-Aldrich) se disolvió el compuesto en Etanol (grado HPLC), luego se obtuvo soluciones intermedias (disueltas también con etanol) que permitieron trabajar a un solo volumen para el pase a concentraciones finales, en este caso el volumen fue de 20  $\mu$ L para un volumen final de 2000  $\mu$ L (medio de cultivo). Una vez obtenido el medio de cultivo con las concentraciones finales de trabajo se reemplazó el medio y se dejó por un periodo de 24 horas para evaluar el efecto de este compuesto a diferentes concentraciones en las líneas celulares seleccionadas.

**Tabla N°02: Tabla resumen de concentraciones y volúmenes de soluciones stock de 1,8-Cineol para su uso en ensayos de las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7.**

<b>5000 mM</b>	25 $\mu\text{L}$	200 mM	20 $\mu\text{L}$	2 mM
	40 $\mu\text{L}$	400 mM	20 $\mu\text{L}$	4 mM
	60 $\mu\text{L}$	600 mM	20 $\mu\text{L}$	6 mM
	80 $\mu\text{L}$	800 mM	20 $\mu\text{L}$	8 mM
	100 $\mu\text{L}$	1000 mM	20 $\mu\text{L}$	10 mM
	120 $\mu\text{L}$	1200 mM	20 $\mu\text{L}$	12 mM
<i>Solución Stock</i>	<i>Volumen de la solución stock</i>	<i>Concentraciones de la soluciones intermedias</i>	<i>Volumen de las soluciones intermedias</i>	<i>Concentraciones finales en medio de cultivo</i>
		<b>Vol. final = 500 <math>\mu\text{L}</math></b>		<b>Vol. final=2000 <math>\mu\text{L}</math></b>

### 2.3.3 Soluciones stock de Triptantrina.

Para preparar las diluciones de Triptantrina (P.M.: 248.2 g/mol) (Sigma-Aldrich) se disolvió el stock del compuesto con DMSO (para biología molecular, Sigma-Aldrich), el compuesto se encontró previamente disuelto a una concentración de 1 mg/mL (4.03 mM), luego se obtuvo soluciones intermedias (disueltas también con DMSO) que permitieron trabajar a un solo volumen para el pase a concentraciones finales, en este caso el volumen fue de 10  $\mu\text{L}$  para un volumen final de 2000  $\mu\text{L}$  (medio de cultivo). Una vez obtenido el medio de cultivo con las concentraciones finales de trabajo se reemplazó el medio y se dejó por un periodo de 24 horas para evaluar el efecto de este compuesto a diferentes concentraciones en las líneas celulares seleccionadas.

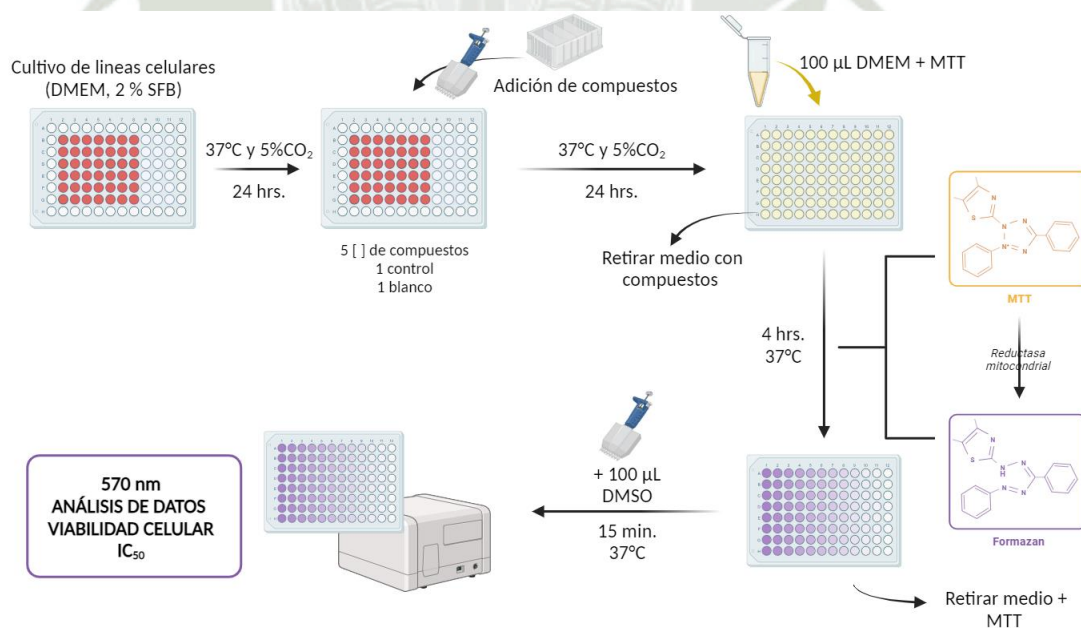
**Tabla N°03: Tabla resumen de concentraciones y volúmenes de soluciones stock de Triptantrina para su uso en ensayos de las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7.**

<b>4,03 mM</b>	12,4 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{M}$
	62 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{L}$	400 $\mu\text{M}$
	124.1 $\mu\text{L}$	1000 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{L}$	600 $\mu\text{M}$
	248.2 $\mu\text{L}$	2000 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{L}$	800 $\mu\text{M}$
	-	-	10 $\mu\text{L}$ (directo)	1000 $\mu\text{M}$
<i>Solución Stock</i>	<i>Volumen de la solución stock</i>	<i>Concentraciones de la soluciones intermedias</i>	<i>Volumen de las soluciones intermedias</i>	<i>Concentraciones finales en medio de cultivo</i>
		<b>Vol. final = 500 <math>\mu\text{L}</math></b>		<b>Vol. final=2000 <math>\mu\text{L}</math></b>

## 2.4 Ensayo MTT y cálculo del IC<sub>50</sub>.

Una vez que las líneas celulares (MDA-MB-231 y MCF-7) estuvieron expuestas por un periodo de 24 horas con las diferentes concentraciones de los compuestos (Ac. Cafeico, 1,8-cienol y Triptantrina) se procedió a realizar los ensayos de viabilidad MTT respectivos. Para esto se siguió el siguiente procedimiento:

Previamente se preparó una solución stock del reactivo MTT (Azul de tiazolil Bromuro de tetrazolio) a una concentración de 5 mg/mL disuelto con PBS 1X, esta solución debe estar totalmente homogenizada, almacenada a -20°C y en total oscuridad. Luego se llevó esta solución a una concentración final de 0.5mg/mL disolviendo con medio DMEM (sin SFB) para su uso inmediato. Una vez se tuvo el reactivo preparado se retiró el medio con los diferentes tratamientos y se reemplazó con un volumen de 100 µL para cada pocillo, para luego ser llevado a incubación a 37°C por un periodo de 4 horas, culminado este tiempo se retiró el contenido de los pocillos cuidando de no arrastrar los cristales generados, para luego agregar 100 µL de DMSO a cada pocillo, se llevó luego a incubación por 15 minutos para finalmente hacer la lectura a 570 nm en un lector de microplacas (Biotek Synergy HTX, Agilent Technologies) tomando los datos obtenidos del software Gen5.

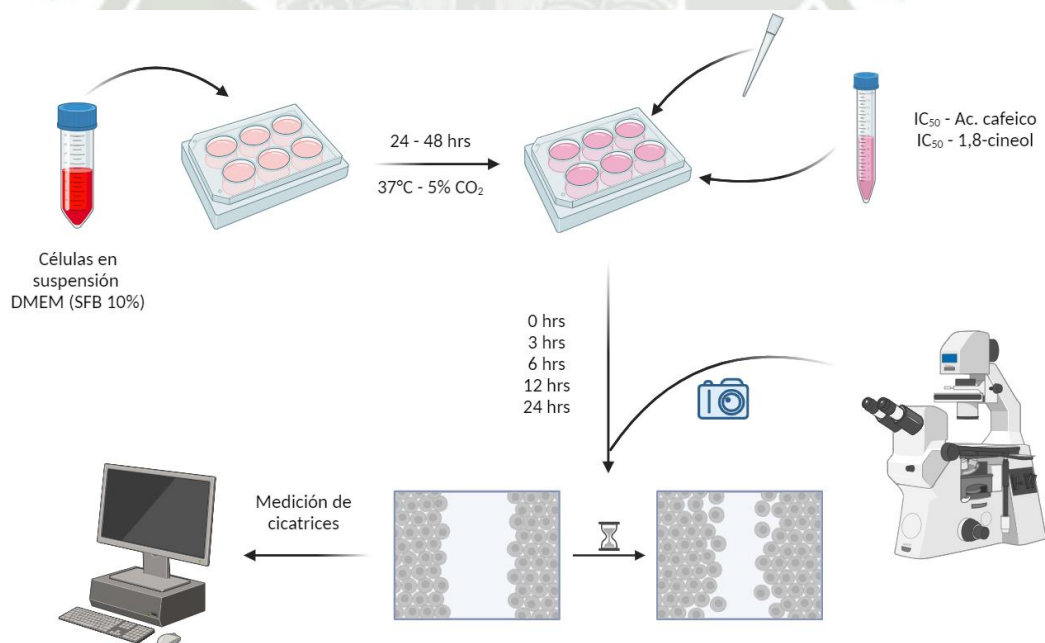


**Figura N°09: Esquema de procedimiento para el cultivo de células en placas de 96 pocillos, adición de compuestos a diferentes concentraciones y ensayo MTT para evaluar la viabilidad celular (Elaboración propia, creado con BioRender.com).**

El cálculo del  $IC_{50}$  se hizo utilizando el software GraphPad Prism 9, una vez insertados los datos en la tabla de datos del programa, se utilizó el apartado “*Analyse*” – “*XY analyses*” – “*Nonlinear regression (curve fit)*”, una vez abierta la nueva ventana se seleccionó la ecuación “*Dose-response – Inhibition*” para luego seleccionar la opción “[*Inhibitor*] vs. *normalized response -- Variable slope*”, luego de esto el programa generó una ventana con la tabla de resultados.

## 2.5 Ensayo de cicatrización celular.

El ensayo de cicatrización celular se realizó una vez obtenidos los valores de  $IC_{50}$  para cada compuesto, para este ensayo se trabajó en placas de 6 pocillos donde se agregó una suspensión de células (2.5 mL) y se esperó por un periodo entre 24 y 48 horas hasta que todos los pocillos lleguen a confluencia. Una vez obtenida la confluencia deseada se procedió a retirar el medio y con la ayuda de una puntera P200 (200  $\mu$ L) se hizo una cicatriz en el fondo de cada pocillo, procurando que esta sea uniforme y con la misma dirección, luego se hizo un lavado rápido con medio DMEM para retirar el residuo generado.



**Figura N°10: Esquema de procedimiento del ensayo de cicatrización celular (Elaboración propia, creado con BioRender.com).**

Seguidamente se agregó por triplicados el medio DMEM (2% SFB) conteniendo el compuesto a evaluar (Ac. Cafeico o 1,8-cineol) a un volumen final de 2.5 mL por cada pocillo y así mismo por triplicados medio DMEM (2% SFB) como control del ensayo. Inmediatamente se procedió a tomar fotografías microscópicas de las cicatrices utilizando el microscopio invertido Axio Vert.A1 (Carl Zeiss) y el software Zen 3.8 para hacer las mediciones correspondientes en los siguientes periodos de tiempo: 0, 3, 6, 12 y 24 horas. Los resultados se expresaron en porcentaje de cicatrización.

## 2.6 Análisis estadístico.

El análisis estadístico de los resultados se hizo utilizando el software GraphPad Prism 9, el mismo que se utilizó para generar los gráficos de la presente tesis. Para los ensayos de viabilidad celular se trabajó en placas de 96 pocillos, cada columna (tratamiento, blanco o control) conto con 6 repeticiones, luego de obtenidos los resultados se eliminaron los valores atípicos, quedando 5 repeticiones para cada columna. Con estos datos se tomó en cuenta los valores promedios ( $\bar{X}$ ) y de desviación estándar (DS) para cada columna y así mismo se determinó el coeficiente de variación (CV%). Cada ensayo se realizó por triplicado, obteniendo de esta manera 3 resultados de viabilidad para cada compuesto evaluado (a los cuales también se les calculó promedio, desviación estándar y coeficiente de variación), una vez obtenido el cálculo de  $IC_{50}$  para cada compuesto en sus determinadas líneas celulares, se hizo un análisis estadístico para la comparación entre los promedios de viabilidad obtenidos con las diferentes concentraciones utilizadas, para ello se utilizó el análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) para saber si existe diferencia significativa entre los grupos propuestos, así mismo se hizo una comparación del promedio de cada concentración con el promedio de todas las demás columnas utilizando la test de Tukey, lo cual nos especificó que columnas de concentración de compuestos son o no diferentes (significativamente) con que otras columnas de concentración de compuestos. Para los ensayos de cicatrización celular se comparó los valores de cada tiempo (Control vs.  $IC_{50}$ ) con una prueba T no emparejada, de esta manera se elucidó si existía diferencia significativa entre el grupo control y el grupo con la concentración  $IC_{50}$  de cada compuesto en los distintos tiempos de cicatrización.

## CAPÍTULO III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Pruebas preliminares

Se realizaron pruebas preliminares para determinar las concentraciones de los compuestos más adecuadas, como resultado para la línea celular MDA-MB-231, las concentraciones de trabajo para el ácido cafeico fueron ser: 200, 400, 600, 800 y 1000  $\mu\text{M}$  y para el 1,8-cineol: 2, 4, 6, 8 y 10 mM. Mientras que para la línea celular MCF-7 las concentraciones de trabajo para el ácido cafeico fueron ser: 400, 600, 800, 1000 y 1200  $\mu\text{M}$  y para el 1,8-cineol: 4, 6, 8, 10 y 12 mM.

Las pruebas preliminares con la triptantrina no dieron los resultados esperados, la máxima concentración a la que se llegó de este compuesto en medio fue de 10 000  $\mu\text{M}$  (teniendo en cuenta no exceder el porcentaje permitido de DMSO presente en medio DMEM, 0.5%)(57). No se pudo preparar un stock más concentrado debido a que el reactivo de triptantrina ya estuvo previamente disuelto a una concentración de 1 mg/mL (4.03 mM). Considerando esto, las pruebas preliminares en ambas líneas celulares con este compuesto no pudieron efectuarse a mayor concentración, esto dio como resultado curvas que no decaían según lo esperado, muchas de ellas mantenían una viabilidad superior al 80% inclusive en las mayores concentraciones, esto impide hacer el análisis para la obtención de valores  $\text{IC}_{50}$ . Por este motivo la triptantrina quedó descartada para los siguientes ensayos.

#### 3.2 Ensayo MTT

##### 3.2.1 MDA-MB-231

Para la línea celular MDA-MB-231 con las concentraciones propuestas de ácido cafeico se obtuvieron los resultados observados en la tabla N°04. Donde se plasma los promedios de cada ensayo realizado, los resultados individuales se pueden observar en el anexo N°01.

Como se puede ver en los resultados mostrados el porcentaje de viabilidad en las 3 repeticiones decae de tal manera que se puede generar una curva de dosis respuesta inhibitoria. Los resultados obtenidos nos indican que concentraciones entre los 200 a 400  $\mu\text{M}$  mantiene la viabilidad por encima del 90%, inclusive se observó en pruebas preliminares que concentraciones más bajas a estas favorecía a la viabilidad celular, en este punto se ha de tener en cuenta que el ácido cafeico es un compuesto con

propiedades antioxidantes y se podría explicar con ello este efecto (58). Por otro lado, en el rango de concentraciones trabajado se observa que a concentraciones mayores a los 600  $\mu\text{M}$  la viabilidad cae proporcionalmente y por debajo del 55% de viabilidad. Esto permite hacer el cálculo para determinar el valor de  $\text{IC}_{50}$ .

**Tabla N°04: Tabla de resultados de los ensayos realizados en la línea celular MDA-MB-231 con ácido cafeico.**

<u>Ac. Cafeico</u>	<b>Repetición 1</b>	<b>Repetición 2</b>	<b>Repetición 3</b>	<b>Promedio</b>	<b>DS</b>	<b>%CV</b>
[ ] $\mu\text{M}$	% Viabilidad	% Viabilidad	% Viabilidad	% Viabilidad		
200	105.5851	103.1836	99.7352	<b>102.8347</b>	2.94	2.86
400	95.0000	90.8471	90.9187	<b>92.2553</b>	2.38	2.58
600	56.9149	53.0415	51.6812	<b>53.8792</b>	2.72	5.04
800	40.7713	39.8522	38.5756	<b>39.7330</b>	1.10	2.78
1000	39.6011	39.1131	36.7223	<b>38.4788</b>	1.54	4.00

En cuanto a las concentraciones propuestas de 1,8-cineol se obtuvieron los resultados observados en la Tabla N°05. Donde se plasma los promedios de cada ensayo realizado, los resultados individuales se pueden observar en el anexo N°01.

**Tabla N°05: Tabla de resultados de los ensayos realizados en la línea celular MDA-MB-231 con 1,8-cineol.**

<b>1,8-cineol</b>	<b>Repetición 1</b>	<b>Repetición 2</b>	<b>Repetición 3</b>	<b>Promedio</b>	<b>DS</b>	<b>%CV</b>
[ ] $\text{mM}$	% Viabilidad	% Viabilidad	% Viabilidad	% Viabilidad		
2	106.6475	107.4616	106.6575	<b>106.9222</b>	0.47	0.44
4	100.5234	107.6011	101.1728	<b>103.0991</b>	3.91	3.79
6	83.6692	75.3835	82.4422	<b>80.4983</b>	4.47	5.56
8	57.6027	40.9344	49.3963	<b>49.3112</b>	8.33	16.90
10	33.4049	25.3835	26.9748	<b>28.5877</b>	4.25	14.86

Como se puede apreciar en la Tabla N°05, de una manera similar las concentraciones más bajas mantienen la viabilidad celular cercana al 100%, mientras que la más alta llega a bajar en promedio por debajo del 30% de viabilidad. Estos resultados son útiles para posterior cálculo del  $\text{IC}_{50}$  de este compuesto en la línea celular MDA-MB-231.

### 3.2.2 MCF-7

Para la línea celular MCF-7 con las concentraciones propuestas de ácido cafeico se obtuvieron los resultados observados en la Tabla N°06. Donde se reporta los promedios de cada ensayo realizado, los resultados individuales se pueden observar en el Anexo N°02.

**Tabla N°06: Tabla de resultados de los ensayos realizados en la línea celular MCF-7 con ácido cafeico.**

<u>Ac. Cafeico</u>	Repeticón 1	Repeticón 2	Repeticón 3	Promedio	DS	%CV
[ ] $\mu\text{M}$	% Viabilidad	% Viabilidad	% Viabilidad	% Viabilidad		
400	102.0646	102.3469	104.0947	<b>102.8354</b>	1.10	1.07
600	92.7740	98.8265	101.0370	<b>97.5458</b>	4.28	4.39
800	82.7157	79.8313	83.9404	<b>82.1625</b>	2.11	2.57
1000	50.7094	39.8973	44.5094	<b>45.0387</b>	5.43	12.05
1200	32.9275	38.9072	39.2715	<b>37.0354</b>	3.56	9.62

Como se puede ver en la Tabla N°06, en las dos primeras concentraciones (400 y 600  $\mu\text{M}$ ) la viabilidad se mantiene por encima del 95% de viabilidad y posteriormente decae a valores por debajo del 40% en la concentración de 1200  $\mu\text{M}$ . Esto permitió generar una curva dosis vs. respuesta inhibitoria para poder obtener el valor de  $\text{IC}_{50}$ . En cuanto a las concentraciones propuestas de 1,8-cineol se obtuvieron los resultados observados en la Tabla N°07. Donde se muestra los promedios de cada ensayo realizado, los resultados individuales se pueden observar en el anexo N°02.

**Tabla N°07: Tabla de resultados de los ensayos realizados en la línea celular MCF-7 con 1,8-cineol.**

<u>1,8-cineol</u>	Repeticón 1	Repeticón 2	Repeticón 3	Promedio	DS	%CV
[ ] mM	% Viabilidad	% Viabilidad	% Viabilidad	% Viabilidad		
4	100.5729	109.8765	114.3937	<b>108.2811</b>	7.05	6.51
6	97.3116	104.1358	103.4420	<b>101.6298</b>	3.76	3.70
8	72.8955	71.6049	85.1630	<b>76.5545</b>	7.48	9.77
10	42.6179	42.9630	54.3416	<b>46.6408</b>	6.67	14.30
12	35.5223	41.1111	41.3299	<b>39.3211</b>	3.29	8.37

De esta manera se puede observar en la Tabla N°07, que el promedio de viabilidad en las concentraciones 4 y 6 mM es cercana al 100% para luego decrecer con el aumento de estos valores de concentración, observando que en la concentración de 12 mM la viabilidad promedio es inferior al 40%. El comportamiento de estos valores permitió de igual manera obtener una curva dosis vs. respuesta inhibitoria para poder obtener el valor de  $IC_{50}$ .

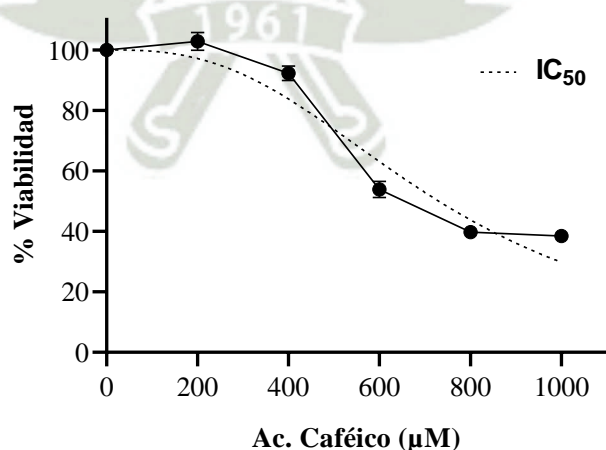
Adicionalmente es relevante tener en cuenta que la desviación estándar (DS) es importante porque puede medir la dispersión de los datos. Por otro lado, el coeficiente de variación (CV%) es esencial para normalizar esta variabilidad en relación con el promedio, lo que facilita la comparación entre diferentes conjuntos de datos. Ambas medidas son importantes para evaluar si nuestros datos realmente no están dispersos y si podemos trabajar adecuadamente con ellos, teniendo en cuenta el contexto en el que se están analizando los datos.

### 3.3 $IC_{50}$

Una vez obtenidos los valores de porcentaje de viabilidad para cada concentración con los compuestos y líneas celulares ensayadas, se calculó la concentración inhibidora media máxima ( $IC_{50}$ ). Obteniéndose los siguientes resultados:

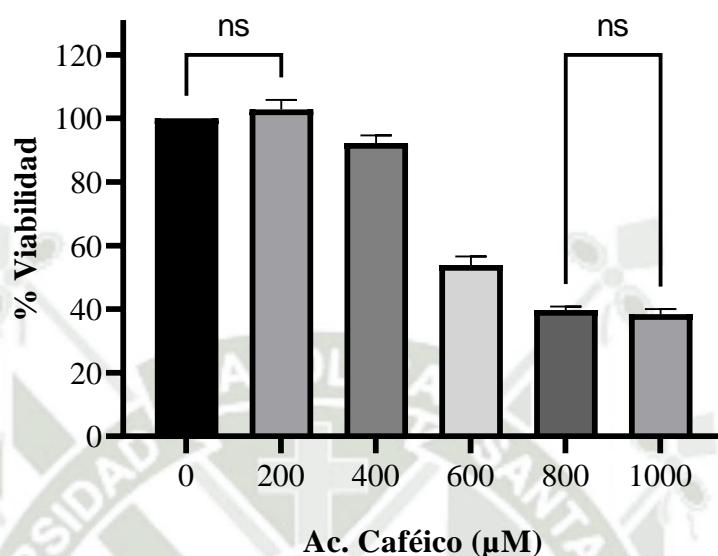
#### 3.3.1 MDA-MB-231

##### Curva dosis-respuesta para el efecto del Ac. Caféico en la línea celular MDA-MB-231



**Figura N°11: Gráfico de curva dosis respuesta del ácido cafeico en la línea celular MDA-MB-231, la línea punteada es la regresión no lineal generada para el cálculo del  $IC_{50}$ .**

### Diagrama de barras del efecto del Ac. Caféico en la línea celular MDA-MB-231



**Figura N°12: Diagrama de barras que muestra el análisis estadístico comparativo de las concentraciones del ácido cafeico influyendo en el porcentaje de viabilidad de la línea celular MDA-MB-231.**

Como se pudo observar previamente las concentraciones utilizadas generan una curva en la que el porcentaje de viabilidad decae proporcionalmente al incremento de la concentración de este compuesto (Figura N°11). El valor de  $IC_{50}$  para este ensayo es  $730 \mu M$  de ácido cafeico con un intervalo de confianza al 95 % de  $673.8$  a  $795.4 \mu M$ .

El análisis estadístico ANOVA y la prueba de Tukey para múltiples comparaciones reveló que el promedio de viabilidad celular no tiene diferencias significativas entre el control y la concentración de  $400 \mu M$  y las concentraciones  $800$  y  $1000 \mu M$ , pero si en las concentraciones en donde la viabilidad decae ( $200$  y  $800 \mu M$ ), como se puede ver en la Figura N°12.

### Curva dosis-respuesta para el efecto del 1,8-cineol en la línea celular MDA-MB-231

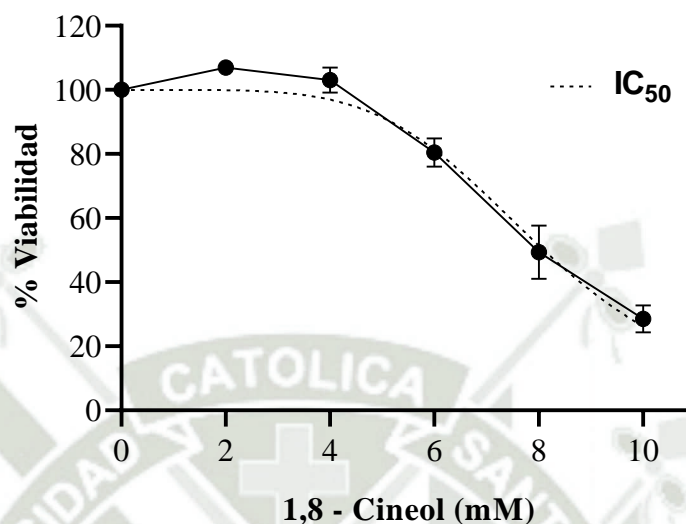


Figura N°13: Gráfico de curva dosis respuesta del 1,8-cineol en la línea celular MDA-MB-231, la línea punteada es la regresión no lineal generada para el cálculo del IC<sub>50</sub>.

### Diagrama de barras del efecto del 1,8 - Cineol en la línea celular MDA-MB-231

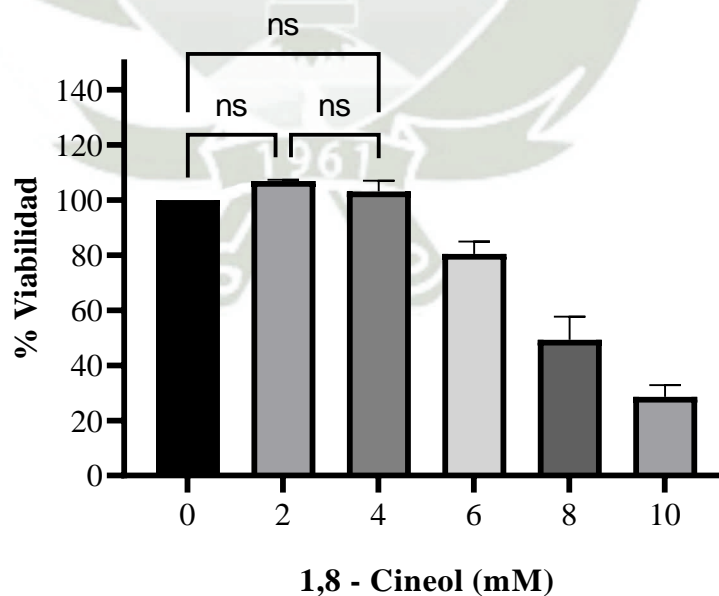


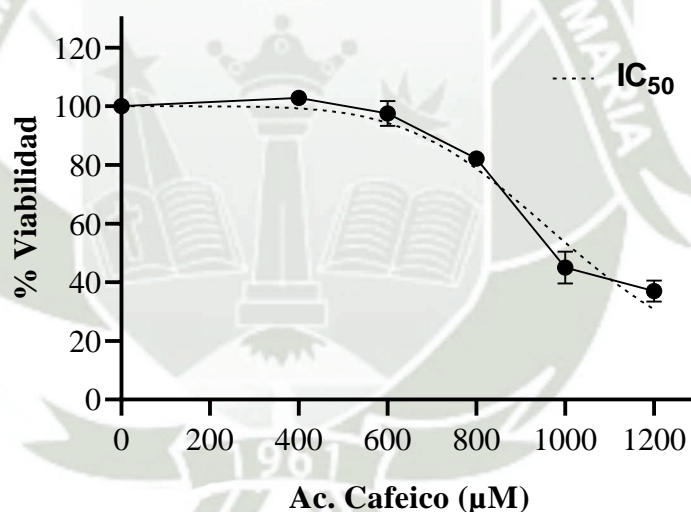
Figura N°14: Diagrama de barras que muestra el análisis estadístico comparativo de las concentraciones del 1,8-cineol influyendo en el porcentaje de viabilidad de la línea celular MDA-MB-231.

El valor de  $IC_{50}$  para este ensayo es 8.095 mM de 1,8-cineol (95% CI de 7.766 a 8.445 mM) (Figura N°13)

El análisis estadístico ANOVA y la prueba de Tukey para múltiples comparaciones reveló que el promedio de viabilidad celular no tiene diferencias significativas entre las concentraciones 2 y 4 mM y el grupo control (100 % de viabilidad), pero si en las concentraciones en donde la viabilidad decae entre 6 a 10 mM como se puede ver en la Figura N°14.

### 3.3.2 MCF-7

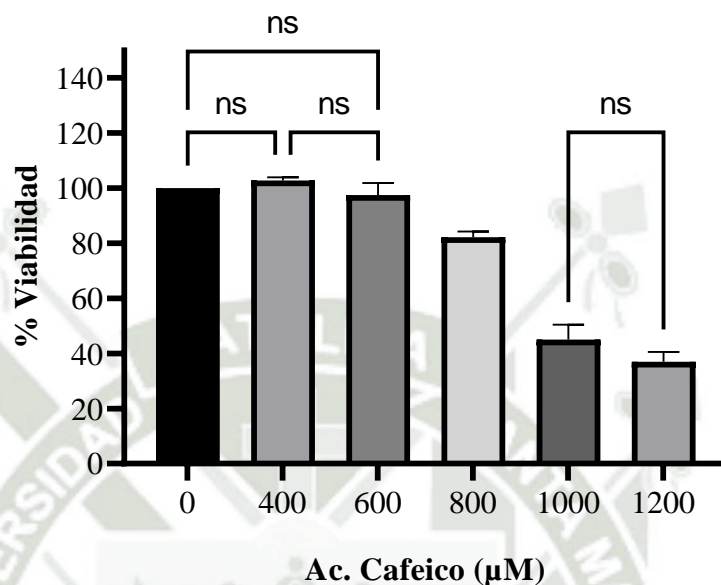
#### Curva dosis-respuesta para el efecto del Ac. Cafeico en la línea celular MCF-7



**Figura N°15:** Gráfico de curva dosis respuesta del ácido cafeico en la línea celular MCF-7, la línea punteada es la regresión no lineal generada para el cálculo del  $IC_{50}$ .

En la línea celular MFC-7 fue necesario incrementar los valores de concentración de los compuestos, obteniendo de esa manera curvas en la que el porcentaje de viabilidad decae proporcionalmente al incremento de la concentración de estos compuestos. El valor de  $IC_{50}$  para este ensayo es 1028  $\mu\text{M}$  de ácido cafeico (95% CI de 989.2 a 1070  $\mu\text{M}$ ) (Figura N°15).

### Diagrama de barras del efecto del Ac. Cafeico en la línea celular MCF-7



**Figura N°16: Diagrama de barras que muestra el análisis estadístico comparativo de las concentraciones del ácido cafeico influyendo en el porcentaje de viabilidad de la línea celular MCF-7.**

El análisis estadístico ANOVA y la prueba de Tukey para múltiples comparaciones reveló que el promedio de viabilidad celular no tiene diferencias significativas entre las concentraciones 400 y 600 µM y el grupo control (100 % de viabilidad) además de las concentraciones 1000 y 1200 µM, sin embargo, en la zona en la que se da el decaimiento de viabilidad si se presenta diferencias significativas, como se puede ver en la Figura N°16.

### Curva dosis-respuesta para el efecto del 1,8 - Cineol en la línea celular MCF-7

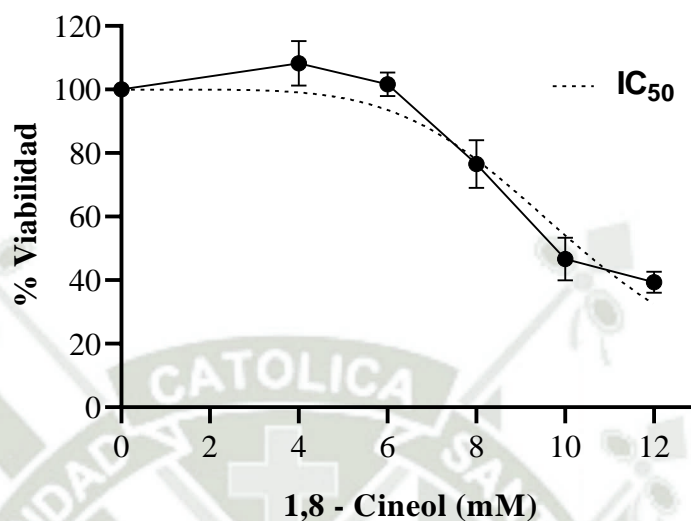


Figura N°17: Gráfico de curva dosis respuesta del 1,8-cineol en la línea celular MCF-7, la línea punteada es la regresión no lineal generada para el cálculo del  $IC_{50}$ .

### Diagrama de barras del efecto del 1,8 - Cineol en la línea celular MCF-7

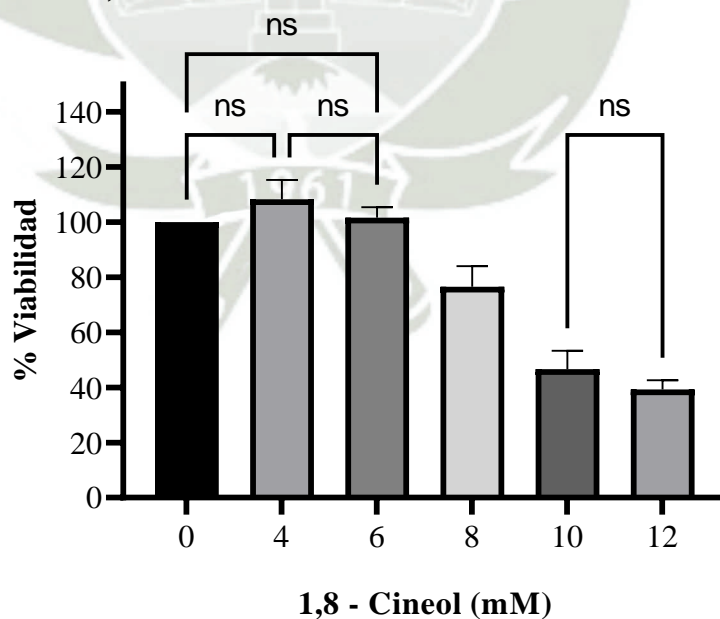


Figura N°18: Diagrama de barras que muestra el análisis estadístico comparativo de las concentraciones del 1,8-cineol influyendo en el porcentaje de viabilidad de la línea celular MCF-7.

Por otro lado, el valor de  $IC_{50}$  para el ensayo con 1,8-cineol es 10.34 mM de este compuesto (95% CI de 9.778 a 11.01 mM) (Figura N°17).

El análisis estadístico ANOVA y la prueba de Tukey para múltiples comparaciones reveló que el promedio de viabilidad celular no tiene diferencias significativas entre las concentraciones 4 y 6 mM y el grupo control (100 % de viabilidad) además de las concentraciones 10 y 12 mM, pero sí de todas estas concentraciones con la concentración 8 mM, zona en la que se da el decaimiento de viabilidad, como se puede ver en la Figura N°18.

El análisis estadístico de los resultados anteriormente reportados se puede encontrar en los anexos N°03 y 04.

### 3.4 Cicatrización celular

Como se mencionó en el capítulo anterior, una vez obtenidos los valores de  $IC_{50}$  de cada compuesto para cada medio se realizó el ensayo de cicatrización celular (anexo 07) obteniéndose los siguientes resultados:

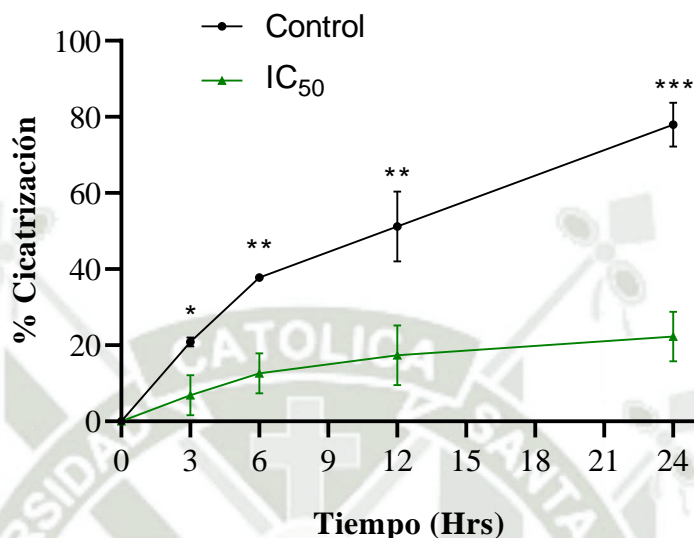
#### 3.4.1 MDA-MB-231

Los resultados de la prueba de cicatrización celular para esta línea celular se reportan en la Tabla N°08.

**Tabla N°08: Tabla de resultados del ensayo de cicatrización en la línea celular MDA-MB-231 con la concentración  $IC_{50}$  obtenida del ácido cafeico, los resultados están expresados en % de cicatrización.**

Hrs	% Cicatrización					
	CONTROL			$IC_{50}$		
	A	B	C	A	B	C
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	20.02	20.48	22.20	1.23	11.73	7.78
6	37.43	38.57	37.33	7.09	17.56	13.21
12	42.77	60.95	49.78	8.33	22.05	21.83
24	71.21	81.54	81.02	15.02	27.72	24.09

## Curvas de % de cicatrización Control Vs. IC<sub>50</sub> (Ac. Cafeico) en la línea celular MDA-MB-231



**Figura N°19:** Gráfico de curvas de cicatrización en la línea celular MDA-MB-231 con el valor IC<sub>50</sub> obtenido del ácido cafeico.

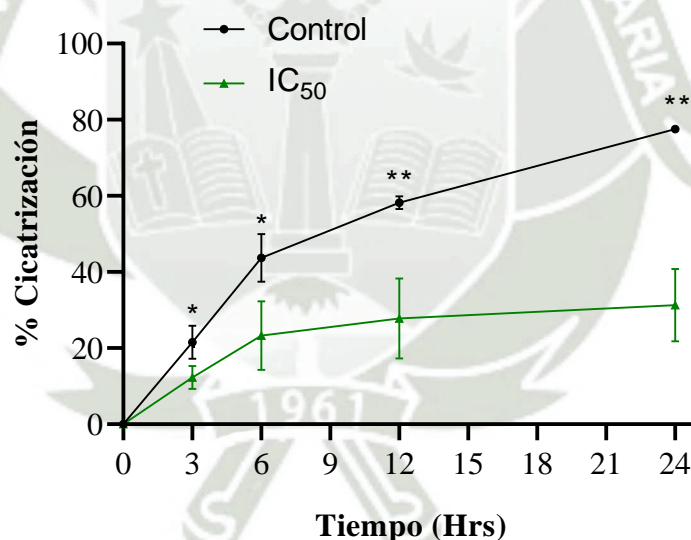
Como se puede observar en la Figura N°19, la cicatrización de la prueba con la concentración IC<sub>50</sub> de ácido cafeico para la línea MDA-MB-231 presenta diferencia significativa en las 4 mediciones realizadas, observando la mayor diferencia a las 24 horas donde el porcentaje promedio de cicatrización del grupo control se encuentra por encima del 75% mientras que del grupo con la concentración IC<sub>50</sub> se encontraba por debajo del 25%.

A continuación, los resultados para la misma línea celular, pero con el compuesto 1,8-cineol, son reportados en la Tabla N°09.

**Tabla N°09: Tabla de resultados del ensayo de cicatrización en la línea celular MDA-MB-231 con la concentración IC<sub>50</sub> obtenida del 1,8-cineol, los resultados están expresados en % de cicatrización.**

Hrs	% Cicatrización					
	CONTROL			IC <sub>50</sub>		
	A	B	C	A	B	C
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	23.73	16.56	24.46	9.20	15.21	12.56
6	45.43	48.87	36.72	13.82	24.17	31.77
12	57.28	60.24	57.22	15.62	34.63	33.02
24	78.29	77.18	77.17	20.52	38.52	34.84

**Curvas de % de cicatrización Control Vs. IC<sub>50</sub> (1,8-Cineol) en la línea celular MDA-MB-231**



**Figura N°20: Gráfico de curvas de cicatrización en la línea celular MDA-MB-231 con el valor IC<sub>50</sub> obtenido del 1,8-cineol.**

Para el caso del 1,8-cineol (Figura N°20), la cicatrización de la prueba con la concentración IC<sub>50</sub> en la línea celular MDA-MB-231 también presenta diferencia significativa en las 4 mediciones realizadas, observando la mayor diferencia a las 24 horas donde el porcentaje promedio de cicatrización del grupo control se encuentra por encima del 75% mientras que del grupo con la concentración IC<sub>50</sub> se encontraba por debajo del 35%.

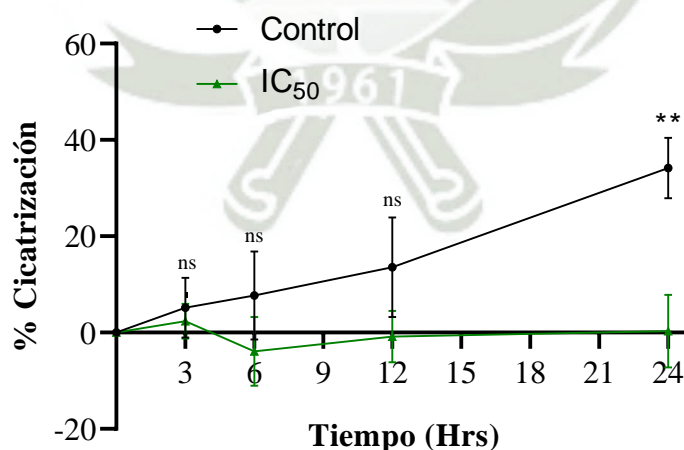
### 3.4.2 MCF-7

Para la línea celular MCF-7 se realizó el mismo procedimiento obteniendo que, la cicatrización de la prueba con la concentración  $IC_{50}$  del ácido cafeico para la línea MCF-7 presenta diferencia significativa en la medición correspondiente a las 24 horas, siendo esta diferencia del grupo control que se encuentra por encima del 30% mientras que del grupo con la concentración  $IC_{50}$  se encontraba cercana al 0 % (Figura N°21). En la Tabla N°10 se reporta los resultados obtenidos.

**Tabla N°10: Tabla de resultados del ensayo de cicatrización en la línea celular MCF-7 con la concentración  $IC_{50}$  obtenida del ácido cafeico, los resultados están expresados en % de cicatrización.**

Hrs	% Cicatrización					
	CONTROL			$IC_{50}$		
	A	B	C	A	B	C
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	1.12	1.99	12.32	0.09	6.57	0.49
6	1.22	3.77	18.12	-11.88	1.85	-1.68
12	4.99	10.70	25.10	-6.05	4.70	-1.09
24	29.42	31.74	41.27	-7.56	7.47	0.94

**Curvas de % de cicatrización Control Vs.  $IC_{50}$  (Ac. Cafeico) en la línea celular MCF-7**



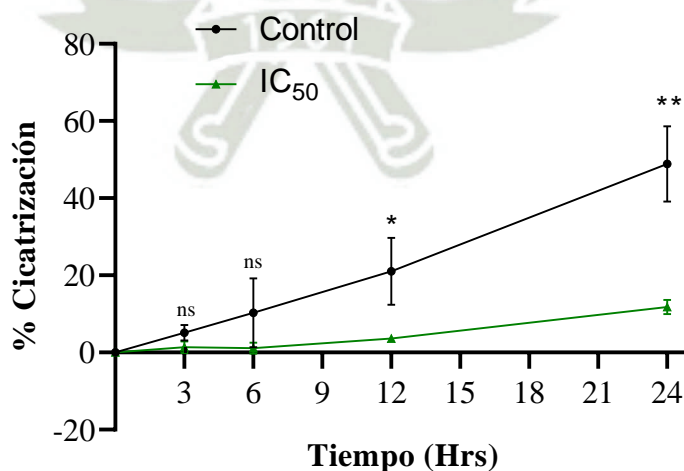
**Figura N°21: Gráfico de curvas de cicatrización en la línea celular MCF-7 con el valor  $IC_{50}$  obtenido del ácido cafeico.**

Para el caso del 1,8-cineol (Tabla N°11), la cicatrización de la prueba con la concentración  $IC_{50}$  en la línea celular MCF-7 también presenta diferencia significativa en las 2 últimas mediciones realizadas (12 y 24 horas), observando la mayor diferencia a las 24 horas donde el porcentaje promedio de cicatrización del grupo control se encuentra por encima del 45% mientras que del grupo con la concentración  $IC_{50}$  se encontraba por debajo del 15%. Estos resultados se pueden observar plasmados en la Figura N°22.

**Tabla N°11: Tabla de resultados del ensayo de cicatrización en la línea celular MCF-7 con la concentración  $IC_{50}$  obtenida del 1,8-cineol.**

Hrs	% Cicatrización					
	CONTROL			$IC_{50}$		
	A	B	C	A	B	C
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	7.42	4.49	3.53	2.21	2.26	-0.35
6	20.32	7.41	3.11	2.25	1.58	-0.49
12	30.94	17.95	14.34	2.76	4.44	3.69
24	58.19	49.82	38.69	9.66	13.11	12.50

**Curvas de % de cicatrización Control Vs.  $IC_{50}$  (1,8-Cineol) en la línea celular MCF-7**



**Figura N°22: Gráfico de curvas de cicatrización en la línea celular MCF-7 con el valor  $IC_{50}$  obtenido del 1,8-cineol.**

Los resultados del ensayo del porcentaje de cicatrización celular para cada línea celular con sus respectivas repeticiones, así como el análisis estadístico se pueden observar en el anexo 05.

Después de revisar artículos relacionados, queda claro que existen varios compuestos que tienen un efecto citotóxico en la línea celular ambas líneas celulares. Estos compuestos incluyen extractos de caracoles marinos (59), metalofarmacos (60,61), extractos marinos (62) y extractos de plantas (63,64). Los estudios utilizan diferentes métodos para evaluar la citotoxicidad, incluyendo el utilizado en la presente tesis, el ensayo MTT. Los resultados muestran que los compuestos evaluados tienen un efecto citotóxico, lo que sugiere su potencial uso en quimioterapia. El uso de las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 en estos estudios es particularmente importante porque es un modelo ampliamente utilizado para estudiar el cáncer de mama. En ese aspecto, estudios relacionados a estas líneas sugieren un efecto citotóxico ocasionado por plantas que contienen alguno de los dos compuestos estudiados (Ac. Cafeico y 1,8-cineol) (65–67), con lo cual el presente trabajo aporta en el conocimiento del efecto citotóxico de compuestos que hacen parte de los extractos reportados. Así mismo resulta importante revisar los mecanismos de acción de estos compuestos, en los que por ejemplo se ha demostrado que el ácido cafeico puede inducir apoptosis en células cancerosas (MCF-7), sugiriendo que el ácido cafeico puede activar la vía apoptótica intrínseca (expresión de los genes P53, P21 y Mcl-1), lo que lleva a la activación de caspasas y la degradación de proteínas clave involucradas en la supervivencia celular (68). En células de cáncer de mama MCF-7, se ha demostrado que el ácido cafeico induce apoptosis mediante la inhibición de NF- $\kappa$ B y la activación de Fas. Además, se ha observado que el ácido cafeico tiene actividad prooxidante, lo que puede causar daño al ADN en presencia de iones de cobre. También se ha demostrado que tiene efectos inhibidores sobre la proliferación celular en células de cáncer de fibrosarcoma HT-1080, posiblemente a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la inducción de daño oxidativo en el ADN (69). Por su parte se reportan la activación del supresor p53 relacionadas al 1,8-cineol en la línea celular SF-9, sugiriendo que el 1,8-cineol puede funcionar a través de vías comunes y mediar sus efectos citotóxicos. dirigiéndose a p53 y su acetilación (70). Así mismo se reportó que, el mecanismo de inducción de apoptosis por 1,8-cineol implica la inactivación de survivina y Akt, así como la activación de p38. Además, se observó la activación de p38, una proteína quinasa, en presencia de 1, 8-cineol. Esta

activación, junto con la inactivación de survivina y Akt, conduce a la inducción de PARP (poli ADP-ribosa polimerasa) escindida y caspasa-3, que son marcadores de apoptosis. Existiendo estudios que sugieren que el 1,8-cineol suprime el crecimiento de células de cáncer de colon al promover la apoptosis mediante las vías mencionadas (28).



## CONCLUSIONES

### Primera:

Se determinó los rangos de concentraciones de trabajo para los compuestos propuestos en las líneas celulares del presente trabajo. Para el caso del ácido cafeico entre 200 y 1000  $\mu\text{M}$  para la línea celular MDA-MB-231 y entre 400 y 1200  $\mu\text{M}$  para la línea MCF-7. El 1,8-cineol tuvo un rango de trabajo de entre 2 y 10 mM para la línea celular MDA-MB-231 mientras que para la línea MCF-7 el rango fue de ente 4 y 12 mM. Por su parte la triptantrina no mostro efecto en la disminución de la viabilidad celular a las concentraciones ensayadas por los motivos previamente expuestos.

### Segunda:

Se pudo determinar la viabilidad celular en ambas líneas celulares a diferentes concentraciones de los compuestos propuestos con el ensayo MTT, obteniendo curvas de dosis vs. respuesta inhibitoria que permitió calcular para cada caso el valor  $\text{IC}_{50}$ . Concluyendo que ambos compuestos si tienen un efecto citotóxico.

### Tercera:

Se pudo comparar el efecto de las concentraciones  $\text{IC}_{50}$  obtenidas en el ensayo de cicatrización celular, observando que en todos los casos (para ambas líneas celulares y ambos compuestos) el grupo control vs. el grupo con la concentración  $\text{IC}_{50}$  presentan diferencias significativas, corroborando de esta manera que las concentraciones calculadas detienen el crecimiento celular en los ensayos *in vitro* realizados.

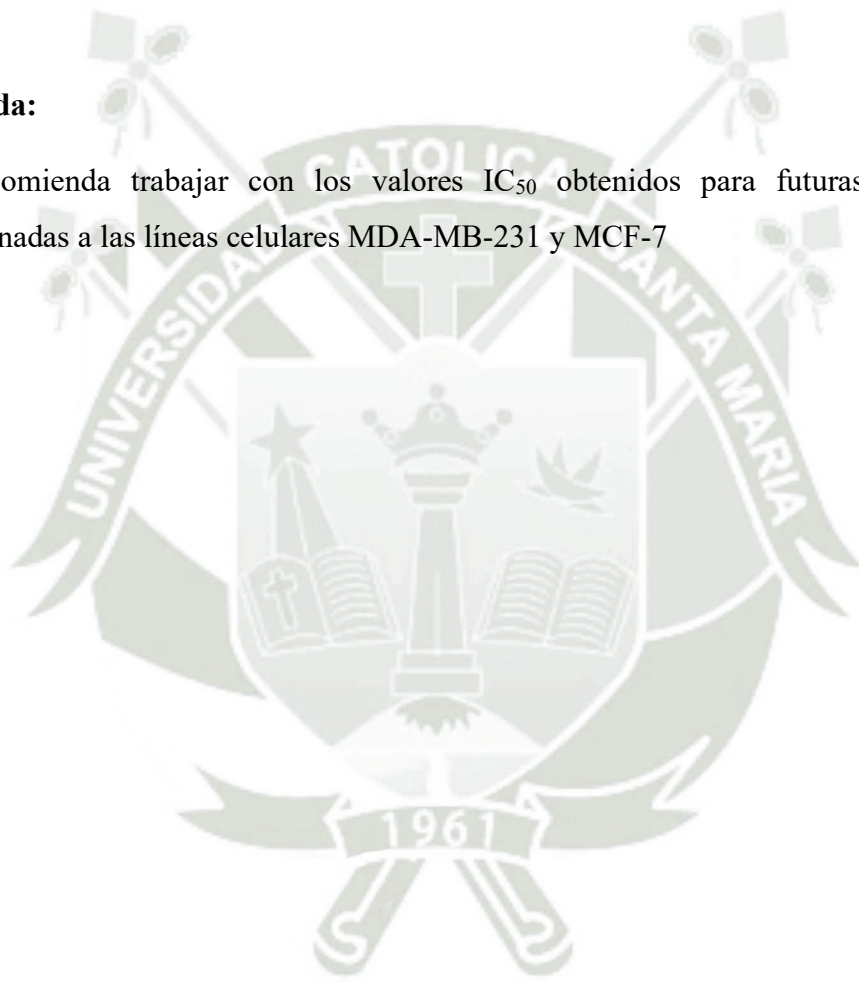
## RECOMENDACIONES

### **Primera:**

Se recomienda realizar ensayos y pruebas equivalentes con la triptantrina, para ello se tendría que adquirir un nuevo stock de este compuesto y preparar soluciones más elevadas que las propuestas en esta tesis.

### **Segunda:**

Se recomienda trabajar con los valores  $IC_{50}$  obtenidos para futuras investigaciones relacionadas a las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7



## REFERENCIAS

1. Luo C, Wang L, Zhang Y, Lu M, Lu B, Cai J, et al. Advances in breast cancer screening modalities and status of global screening programs. Vol. 8, Chronic Diseases and Translational Medicine. John Wiley and Sons Inc; 2022. p. 112–23.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin. mayo de 2021;71(3):209–49.
3. Torres-Roman JS, Martinez-Herrera JF, Carioli G, Ybaseta-Medina J, Valcarcel B, Pinto JA, et al. Breast cancer mortality trends in Peruvian women. BMC Cancer. el 1 de diciembre de 2020;20(1).
4. Centro Nacional de Epidemiología P y C de E. BOLETÍN EPIDEMIOLÓGICO. 2023.
5. Adrienne G.Waks M, Eric P. Winer M. Breast Cancer Treatment [Internet]. 2019. Disponible en: [www.nccn.org/patients/guidelines/cancers.aspx](http://www.nccn.org/patients/guidelines/cancers.aspx)
6. Weigelt B, Geyer FC, Reis-Filho JS. Histological types of breast cancer: How special are they? Vol. 4, Molecular Oncology. John Wiley and Sons Ltd; 2010. p. 192–208.
7. Tong CWS, Wu M, Cho WCS, To KKW. Recent advances in the treatment of breast cancer. Vol. 8, Frontiers in Oncology. Frontiers Media S.A.; 2018.
8. Greenwell M, Rahman PKSM. Medicinal Plants: Their Use in Anticancer Treatment. Int J Pharm Sci Res [Internet]. el 1 de octubre de 2015;6(10):4103–12. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26594645>
9. Solowey E, Lichtenstein M, Sallon S, Paavilainen H, Solowey E, Lorberboum-Galski H. Evaluating medicinal plants for anticancer activity. Scientific World Journal. 2014;2014.
10. Khan MI, Bouyahya A, Hachlafi NEL, Menyiy N El, Akram M, Sultana S, et al. Anticancer properties of medicinal plants and their bioactive compounds against breast cancer: a review on recent investigations. Vol. 29, Environmental Science and

- Pollution Research. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2022. p. 24411–44.
11. Syed Najmuddin SUF, Romli MF, Hamid M, Alitheen NB, Abd Rahman NMAN. Anti-cancer effect of *Annona Muricata* Linn Leaves Crude Extract (AMCE) on breast cancer cell line. *BMC Complement Altern Med*. 2016;16(1).
  12. Kamble SS, Gacche RN. “Evaluation of anti-breast cancer, anti-angiogenic and antioxidant properties of selected medicinal plants”. *Eur J Integr Med*. el 1 de enero de 2019;25:13–9.
  13. Magnani C, Isaac VLB, Correa MA, Salgado HRN. Caffeic acid: A review of its potential use in medications and cosmetics. Vol. 6, *Analytical Methods*. Royal Society of Chemistry; 2014. p. 3203–10.
  14. Touaibia M, Jean-François J, Doiron J. Caffeic Acid, A Versatile Pharmacophore: An Overview. Vol. 11, *Reviews in Medicinal Chemistry*. 2011.
  15. Monteiro Espíndola KM, Ferreira RG, Mosquera Narvaez LE, Rocha Silva Rosario AC, Machado Da Silva AH, Bispo Silva AG, et al. Chemical and pharmacological aspects of caffeic acid and its activity in hepatocarcinoma. Vol. 9, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A.; 2019.
  16. Pavlíková N. Caffeic Acid and Diseases—Mechanisms of Action. Vol. 24, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2023.
  17. Olthof MR, Hollman PCH, Katan MB. Human Nutrition and Metabolism Chlorogenic Acid and Caffeic Acid Are Absorbed in Humans 1. Vol. 131, *J. Nutr*. 2001.
  18. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 689043. 2023 [citado el 20 de octubre de 2023]. Caffeic Acid. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Caffeic-Acid>
  19. Khan FA, Maalik A, Murtaza G. Inhibitory mechanism against oxidative stress of caffeic acid. Vol. 24, *Journal of Food and Drug Analysis*. Elsevier Taiwan LLC; 2016. p. 695–702.
  20. Mirzaei S, Gholami MH, Zabolian A, Saleki H, Farahani MV, Hamzehlou S, et al. Caffeic acid and its derivatives as potential modulators of oncogenic molecular

- pathways: New hope in the fight against cancer. *Pharmacol Res.* el 1 de septiembre de 2021;171.
21. Khan F, Bamunuarachchi NI, Tabassum N, Kim YM. Caffeic Acid and Its Derivatives: Antimicrobial Drugs toward Microbial Pathogens. Vol. 69, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. American Chemical Society; 2021. p. 2979–3004.
  22. Yuan K, Li F, Peng L, Zhao X, Song H. Separation of 1,8-Cineole and terpenes by Liquid-liquid extraction with green alkanediols. *J Mol Liq.* el 15 de marzo de 2022;350.
  23. Cai ZM, Peng JQ, Chen Y, Tao L, Zhang YY, Fu LY, et al. 1,8-Cineole: a review of source, biological activities, and application. Vol. 23, *Journal of Asian Natural Products Research*. Taylor and Francis Ltd.; 2021. p. 938–54.
  24. Elsebai MF, Albalawi MA. Essential Oils and COVID-19. Vol. 27, *Molecules*. MDPI; 2022.
  25. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 2758. 2023 [citado el 20 de octubre de 2023]. Eucalyptol. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Eucalyptol>
  26. Juergens UR. Anti-inflammatory properties of the monoterpene 18-cineole: Current evidence for co-medication in inflammatory airway diseases. Vol. 64, *Drug Research*. Georg Thieme Verlag; 2014. p. 638–46.
  27. Seol GH, Kim KY. Eucalyptol and its role in chronic diseases. En: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC; 2016. p. 389–98.
  28. Murata S, Shiragami R, Kosugi C, Tezuka T, Yamazaki M, Hirano A, et al. Antitumor effect of 1, 8-cineole against colon cancer. *Oncol Rep.* diciembre de 2013;30(6):2647–52.
  29. Rodenak-Kladniew B, Castro MA, Crespo R, Galle M, García de Bravo M. Anti-cancer mechanisms of linalool and 1,8-cineole in non-small cell lung cancer A549 cells. *Heliyon.* el 1 de diciembre de 2020;6(12).
  30. Bhalla Y, Gupta VK, Jaitak V. Anticancer activity of essential oils: A review. Vol. 93, *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2013. p. 3643–53.

31. Rahaman A, Chaudhuri A, Sarkar A, Chakraborty S, Bhattacharjee S, Mandal DP. Eucalyptol targets PI3K/Akt/mTOR pathway to inhibit skin cancer metastasis. *Carcinogenesis*. el 1 de junio de 2022;43(6):571–83.
32. Zou Y, Zhang G, Li C, Long H, Chen D, Li Z, et al. Discovery of Tryptanthrin and Its Derivatives and Its Activities against NSCLC In Vitro via Both Apoptosis and Autophagy Pathways. *Int J Mol Sci*. el 1 de enero de 2023;24(2).
33. Jahng Y. Progress in the studies on tryptanthrin, an alkaloid of history. Vol. 36, *Archives of Pharmacal Research*. 2013. p. 517–35.
34. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 73549. 2023 [citado el 20 de octubre de 2023]. Indolo[2,1-b]quinazoline-6,12-dione. Disponible en: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Indolo\\_2\\_1\\_b\\_quinazoline-6\\_12-dione](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Indolo_2_1_b_quinazoline-6_12-dione)
35. Kaur R, Manjal SK, Rawal RK, Kumar K. Recent synthetic and medicinal perspectives of tryptanthrin. Vol. 25, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. Elsevier Ltd; 2017. p. 4533–52.
36. Zhu X, Zhang X, Ma G, Yan J, Wang H, Yang Q. Transport Characteristics of Tryptanthrin and its Inhibitory Effect on P-gp and MRP2 in Caco-2 Cells [Internet]. Vol. 14, *J Pharm Pharmaceut Sci* ([www.cspcsCanada.org](http://www.cspcsCanada.org)). 2011. Disponible en: [www.cspcsCanada.org](http://www.cspcsCanada.org)
37. Latypova DK, Shmakov S V., Pechkovskaya SA, Filatov AS, Stepanov A V., Knyazev NA, et al. Identification of spiro-fused pyrrolo[3,4-a]pyrrolizines and tryptanthrines as potential antitumor agents: Synthesis and in vitro evaluation. *Int J Mol Sci*. el 1 de noviembre de 2021;22(21).
38. Dai X, Cheng H, Bai Z, Li J. Breast cancer cell line classification and Its relevance with breast tumor subtyping. Vol. 8, *Journal of Cancer*. Ivyspring International Publisher; 2017. p. 3131–41.
39. Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* [Internet]. noviembre de 1973;51(5):1409–16. Disponible en: <https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/51.5.1409>

40. Comşa Ş, Cîmpean AM, Raica M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Res* [Internet]. junio de 2015;35(6):3147–54. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26026074>
41. H. F, Zarghi A, Kobarfard F, Zendehtel R, Nakhjavani M, Arfaiee S, et al. Remarks in Successful Cellular Investigations for Fighting Breast Cancer Using Novel Synthetic Compounds. En: *Breast Cancer - Focusing Tumor Microenvironment, Stem cells and Metastasis*. InTech; 2011.
42. Gest C, Joimel U, Huang L, Pritchard LL, Petit A, Dulong C, et al. Rac3 induces a molecular pathway triggering breast cancer cell aggressiveness: Differences in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines. *BMC Cancer*. el 6 de febrero de 2013;13.
43. Cailleau R, Olivé M, Cruciger QVJ. Society for In Vitro Biology Springer Long-Term Human Breast Carcinoma Cell Lines of Metastatic Origin: Preliminary [Internet]. Vol. 14, Source: In Vitro. 1978. Disponible en: <http://www.jstor.org> URL: <http://www.jstor.org/stable/4292143>
44. Mohammed F, Rashid-Doubell F, Taha S, Cassidy S, Fredericks S. Effects of curcumin complexes on MDA-MB-231 breast cancer cell proliferation. *Int J Oncol*. el 1 de agosto de 2020;57(2):445–55.
45. Hong TB, Rahumatullah A, Yogarajah T, Ahmad M, Yin KB. Potential effects of chrysin on MDA-MB-231 cells. *Int J Mol Sci*. marzo de 2010;11(3):1057–69.
46. Salih Istifli E. Cytotoxicity - Definition, Identification, and Cytotoxic Compounds [Internet]. Salih Istifli E, Basri Ila H, editores. IntechOpen; 2019. Disponible en: <https://www.intechopen.com/books/cytotoxicity-definition-identification-and-cytotoxic-compounds>
47. Aminuddin M, Shafiee M, Ashraf M, Asri M, Sakinah S, Alwi S. Review on the In Vitro Cytotoxicity Assessment in Accordance to the International Organization for Standardization (ISO). Vol. 17, *Malaysian Journal of Medicine and Health Sciences*. 2021.
48. Johnson S, Nguyen V, Coder D. Assessment of cell viability. *Curr Protoc Cytom*. 2013;(SUPPL.64).

49. Stoddart MJ. Cell Viability Assays: Introduction. En: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc.; 2011. p. 1–6.
50. Gilbert DF, Friedrich O. Cell Viability Assays Methods and Protocols Methods [Internet]. Gilbert DF, Friedrich O, editores. Springer Science; 2017. Disponible en: <http://www.springer.com/series/7651>
51. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harb Protoc.* el 1 de junio de 2018;2018(6):469–71.
52. Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I. The mtt assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *Int J Mol Sci.* el 1 de diciembre de 2021;22(23).
53. Kuete V, Karaosmanoğlu O, Sivas H. Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. En: *Medicinal Spices and Vegetables from Africa: Therapeutic Potential Against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases*. Elsevier Inc.; 2017. p. 271–97.
54. van Meerloo J, Kaspers GJL, Cloos J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. En 2011. p. 237–45. Disponible en: [https://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-080-5\\_20](https://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-080-5_20)
55. Caldwell GW, Yan Z, Lang W, Masucci JA. The IC 50 Concept Revisited. Vol. 12, *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2012.
56. Sebaugh JL. Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharm Stat.* marzo de 2011;10(2):128–34.
57. Chen X, Thibeault S. Effect of DMSO concentration, cell density and needle gauge on the viability of cryopreserved cells in three dimensional hyaluronan hydrogel. En: *Proceedings of the Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, EMBS*. 2013. p. 6228–31.
58. Li Y, Chen LJ, Jiang F, Yang Y, Wang XX, Zhang Z, et al. Caffeic acid improves cell viability and protects against DNA damage: Involvement of reactive oxygen species and extracellular signal-regulated kinase. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2015;48(6):502–8.

59. Alers Rivera JM. Identificación de agentes citotóxicos, provenientes del caracol marino *Conus ximenes* en la línea celular MDA-MB-231. 2014.
60. Moyano DF, Murcia LE, Parra DA, Burgos AE, Aristizabal FA. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y ANTIMICROBIANA DEL COMPUESTO [Ag(phen) 2 ]salH) EVALUATION OF THE CITOTOXICITY AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE [Ag(phen) 2 ]salH COMPOUND AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE CITOTÓXICA E ANTIMICROBIANA DO COMPOSTO [Ag(phen) 2 ]salH. Vol. 41, Aplicada y Analítica Rev. Colomb. Quím. 2012.
61. Pérez Henarejos SA. Estudios de Citotoxicidad, Localización Celular e Interacción con Biomacromoléculas de Metalofármacos Anticancerígenos. 2017.
62. Rodríguez-Sánchez H, Díaz-García A, Frión-Herrera Y, Lianet I, Fidalgo M. Evaluación de la citotoxicidad de extractos marinos sobre un panel de líneas celulares Evaluation of cytotoxicity of different marine extracts in a cell line panel [Internet]. Vol. 50, Revista Cubana de Farmacia. 2016. Disponible en: <http://scielo.sld.cu>
63. Soto-García M, Rosales-Castro M, Rubén García-Sánchez J, José Rivas-Arreola M. In vitro cytotoxic activity of bark extracts from *Pinus durangensis* Martinez and *Quercus sideroxylla* Bonpl. Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud [Internet]. el 26 de octubre de 2021;XXIV(1):55–61. Disponible en: <http://biotecnia.unison.mx>
64. Razak NA, Abu N, Ho WY, Zamberi NR, Tan SW, Alitheen NB, et al. Cytotoxicity of eupatorin in MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells via cell cycle arrest, anti-angiogenesis and induction of apoptosis. *Sci Rep.* el 1 de diciembre de 2019;9(1).
65. Afshar AS, Nematpour FS, Meshkani M, Khafi A. Growth inhibition of human breast cancer cells and down-regulation of ODC1 and ADA genes by nepeta binaloudensis. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* el 1 de enero de 2017;27(1):84–90.
66. Siegfried SA, Schroeder JR, Jennifer Schroeder CR. Toxicity of thieves oils to mcf-7 and mda-mb-231 breast cancer cells. ~ 1 ~ *American Journal of Essential Oils and Natural Products.* 2018;6(1).
67. Chang H, Wang Y, Yin X, Liu X, Xuan H. Ethanol extract of propolis and its constituent caffeic acid phenethyl ester inhibit breast cancer cells proliferation in

- inflammatory microenvironment by inhibiting TLR4 signal pathway and inducing apoptosis and autophagy. *BMC Complement Altern Med.* el 26 de septiembre de 2017;17(1).
68. Rezaei-Seresht H, Cheshomi H, Falanji F, Movahedi-Motlagh F, Hashemian M, Mireskandari E. Cytotoxic activity of caffeic acid and gallic acid against MCF-7 human breast cancer cells: An in silico and in vitro study. *Avicenna J Phytomed* [Internet]. 2019;9(6):574–86. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31763216>
69. Rajendra Prasad N, Karthikeyan A, Karthikeyan S, Venkata Reddy B. Inhibitory effect of caffeic acid on cancer cell proliferation by oxidative mechanism in human HT-1080 fibrosarcoma cell line. *Mol Cell Biochem.* marzo de 2011;349(1–2):11–9.
70. Mobarakian M, Dastjerdi MN, Shakarami J, Abtahi SM. Mechanisms of cytotoxicity-inducing effect of 1,8-cineole, a plant terpenoid, on lepidopteran (*Spodoptera frugiperda*) cell line. *Journal of Applied Biotechnology Reports.* el 1 de diciembre de 2021;8(1):32–6.

## ANEXOS

### 01 - Resultados individuales ensayo MTT (MDA-MB-231)

MDA-MB-231 / Ac. Caféico (1)								
Ensayo	1	2	3	4	5	B	C	DMEM
[ ] $\mu\text{M}$	200	400	600	800	1000	DMSO	-	-
cells /mL	7.00E+04	7.00E+04	7.00E+04	7.00E+04	7.00E+04	7.00E+04	7.00E+04	-
Abs	0.726	0.605	0.307	0.223	0.206	0.663	0.765	0.088
	0.640	0.623	0.310	0.202	0.218	0.653	0.728	0.094
	0.708	0.615	0.320	0.201	0.204	0.632	0.756	0.088
	0.726	0.622	0.382	0.197	0.175	0.651	0.758	0.087
	0.694	0.631	0.345	0.234	0.210	0.685	0.753	0.093

Promedio	0.699	0.619	0.333	0.211	0.203	0.657	0.752	0.090
D.S.	0.036	0.010	0.031	0.016	0.016	0.019	0.014	0.003
C.V.	5.082	1.576	9.405	7.661	8.062	2.945	1.878	3.600

abs cor.	0.609	0.529	0.243	0.121	0.113	0.567	0.662	0.000
% Viabilidad	92.9255	82.3404	44.2553	28.1117	26.9415	87.3404	100.0000	
							12.659574	

Viabilidad corregida	105.5851	95.0000	56.9149	40.7713	39.6011			
----------------------	----------	---------	---------	---------	---------	--	--	--

MDA-MB-231 / Ac. Caféico (2)								
Ensayo	1	2	3	4	5	B	C	DMEM
[ ] $\mu\text{M}$	200	400	600	800	1000	DMSO	-	-
cells /mL	7.00E+04	7.00E+04	7.00E+04	7.00E+04	7.00E+04	7.00E+04	7.00E+04	-
Abs	0.374	0.324	0.175	0.116	0.124	0.331	0.340	0.067
	0.360	0.315	0.183	0.133	0.117	0.365	0.369	0.068
	0.364	0.278	0.155	0.124	0.132	0.334	0.366	0.067
	0.327	0.301	0.190	0.130	0.116	0.326	0.360	0.068
	0.324	0.314	0.164	0.132	0.133	0.337	0.324	0.068

Promedio	0.350	0.306	0.173	0.127	0.124	0.339	0.352	0.068
D.S.	0.023	0.018	0.014	0.007	0.008	0.015	0.019	0.001
C.V.	6.514	5.832	8.142	5.568	6.446	4.521	5.462	0.810

abs cor.	0.282	0.239	0.106	0.059	0.057	0.271	0.284	0.000
% Viabilidad	99.4315	87.0949	49.2894	36.1001	35.3610	96.2479	100.0000	
							3.7521319	

Viabilidad corregida	103.1836	90.8471	53.0415	39.8522	39.1131			
----------------------	----------	---------	---------	---------	---------	--	--	--

MDA-MB-231 / Ac. Caféico (3)								
Ensayo	1	2	3	4	5	B	C	DMEM
[ ] $\mu$ M	200	400	600	800	1000	DMSO	-	-
cells /mL	7.00E+04	7.00E+04	7.00E+04	7.00E+04	7.00E+04	7.00E+04	7.00E+04	-
Abs	0.710	0.695	0.359	0.292	0.261	0.745	0.671	0.067
	0.795	0.692	0.386	0.280	0.274	0.701	0.867	0.068
	0.729	0.709	0.392	0.279	0.291	0.795	0.765	0.067
	0.728	0.617	0.395	0.292	0.267	0.784	0.724	0.068
	0.776	0.692	0.391	0.285	0.265	0.723	0.750	0.068

<b>Promedio</b>	0.748	0.681	0.385	0.286	0.272	0.750	0.755	0.068
<b>D.S.</b>	0.036	0.036	0.015	0.006	0.012	0.040	0.072	0.001
<b>C.V.</b>	4.822	5.354	3.815	2.195	4.353	5.309	9.520	0.810

<b>abs cor.</b>	0.680	0.613	0.317	0.218	0.204	0.682	0.688	0.000
<b>% Viabilidad</b>	98.9674	90.1509	50.9134	37.8078	35.9545	99.2322	100.0000	
							0.7678051	

<b>Viabilidad corregida</b>	<b>99.7352</b>	<b>90.9187</b>	<b>51.6812</b>	<b>38.5756</b>	<b>36.7223</b>			
-----------------------------	----------------	----------------	----------------	----------------	----------------	--	--	--

MDA-MB-231 / 1,8 - Cineole (1)								
Ensayo	1	2	3	4	5	B	C	DMEM
[ ] mM	2	4	6	8	10	EtOH	-	-
cells /mL	7.00E+04	7.00E+04	7.00E+04	7.00E+04	7.00E+04	7.00E+04	7.00E+04	-
Abs	0.760	0.731	0.597	0.365	0.204	0.747	0.750	0.086
	0.772	0.739	0.591	0.428	0.201	0.731	0.735	0.082
	0.767	0.698	0.579	0.386	0.205	0.722	0.790	0.088
	0.764	0.704	0.584	0.409	0.237	0.726	0.824	0.085
	0.778	0.735	0.612	0.379	0.195	0.661	0.722	0.086

<b>Promedio</b>	0.768	0.721	0.593	0.393	0.208	0.717	0.764	0.085
<b>D.S.</b>	0.007	0.019	0.013	0.025	0.016	0.033	0.042	0.002
<b>C.V.</b>	0.913	2.628	2.163	6.367	7.872	4.590	5.504	2.565

<b>abs cor.</b>	0.683	0.636	0.507	0.308	0.123	0.632	0.679	0.000
<b>% Viabilidad</b>	100.5234	94.3994	77.5451	51.4787	27.2808	93.8759	100	
						6.1241		
<b>Viabilidad corregida</b>	<b>106.6475</b>	<b>100.5234</b>	<b>83.6692</b>	<b>57.6027</b>	<b>33.4049</b>			

MDA-MB-231 / 1,8 - Cineole (2)								
Ensayo	1	2	3	4	5	B	C	DMEM
[ ] mM	2	4	6	8	10	EtOH	-	-
cells /mL	7.00E+04	7.00E+04	7.00E+04	7.00E+04	7.00E+04	7.00E+04	7.00E+04	-
Abs	0.283	0.298	0.176	0.125	0.067	0.290	0.259	0.075
	0.297	0.297	0.247	0.100	0.067	0.252	0.299	0.073
	0.307	0.304	0.203	0.081	0.066	0.278	0.290	0.073
	0.310	0.302	0.224	0.106	0.067	0.256	0.297	0.079
	0.314	0.312	0.201	0.145	0.067	0.328	0.289	0.083

<b>Promedio</b>	0.302	0.303	0.210	0.111	0.067	0.281	0.287	0.077
<b>D.S.</b>	0.012	0.006	0.027	0.024	0.000	0.031	0.016	0.004
<b>C.V.</b>	4.116	1.977	12.700	21.975	0.669	10.926	5.624	5.660

<b>abs cor.</b>	0.226	0.226	0.134	0.035	-0.010	0.204	0.210	0.000
<b>% Viabilidad</b>	105.3696	105.5091	73.2915	38.8424	23.2915	97.9079	100	
						2.0921		

<b>Viabilidad corregida</b>	<b>107.4616</b>	<b>107.6011</b>	<b>75.3835</b>	<b>40.9344</b>	<b>25.3835</b>			
-----------------------------	-----------------	-----------------	----------------	----------------	----------------	--	--	--

MDA-MB-231 / 1,8 - Cineole (3)								
Ensayo	1	2	3	4	5	B	C	DMEM
[ ] mM	2	4	6	8	10	EtOH	-	-
cells /mL	7.00E+04	7.00E+04	7.00E+04	7.00E+04	7.00E+04	7.00E+04	7.00E+04	-
Abs	0.607	0.565	0.440	0.222	0.086	0.491	0.548	0.071
	0.508	0.498	0.437	0.206	0.084	0.565	0.598	0.078
	0.527	0.521	0.419	0.229	0.087	0.581	0.561	0.067
	0.575	0.539	0.324	0.237	0.089	0.497	0.609	0.080
	0.526	0.461	0.421	0.189	0.087	0.416	0.583	0.070

<b>Promedio</b>	0.549	0.517	0.408	0.217	0.087	0.510	0.580	0.073
<b>D.S.</b>	0.041	0.040	0.048	0.019	0.002	0.066	0.025	0.006
<b>C.V.</b>	7.479	7.680	11.756	8.860	2.098	12.944	4.362	7.569

<b>abs cor.</b>	0.475	0.444	0.335	0.143	0.013	0.437	0.507	0.000
<b>% Viabilidad</b>	94.6188	89.1342	70.4036	37.3577	14.9362	87.9614	100.0000	
						12.0386		

<b>Viabilidad corregida</b>	<b>106.6575</b>	<b>101.1728</b>	<b>82.4422</b>	<b>49.3963</b>	<b>26.9748</b>			
-----------------------------	-----------------	-----------------	----------------	----------------	----------------	--	--	--

## 02 - Resultados individuales ensayo MTT (MCF-7)

MCF-7 / Ac. Cafeico (1)								
Ensayo	1	2	3	4	5	B	C	DMEM
[ ] $\mu\text{M}$	400	600	800	1000	1200	DMSO	-	-
cells /mL	2.00E+04	2.00E+04	2.00E+04	2.00E+04	2.00E+04	2.00E+04	2.00E+04	-
Abs	0.746	0.680	0.627	0.286	0.203	0.738	0.778	0.083
	0.666	0.595	0.554	0.306	0.215	0.706	0.729	0.082
	0.741	0.652	0.566	0.336	0.178	0.686	0.774	0.085
	0.736	0.673	0.566	0.373	0.199	0.689	0.724	0.082
	0.727	0.665	0.572	0.375	0.209	0.719	0.773	0.086

Promedio	0.723	0.653	0.577	0.335	0.201	0.708	0.756	0.084
D.S.	0.033	0.034	0.029	0.040	0.014	0.022	0.027	0.002
C.V.	4.527	5.215	4.975	11.840	7.029	3.055	3.532	2.173

abs cor.	0.640	0.569	0.493	0.252	0.117	0.624	0.672	0.000
% Viabilidad	95.712017	86.421387	76.363155	44.356803	26.574907	93.647433	100	
							6.3525675	

Viabilidad corregida	102.06458	92.773954	82.715723	50.70937	32.927475			
----------------------	-----------	-----------	-----------	----------	-----------	--	--	--

MCF-7 / Ac. Cafeico (2)								
Ensayo	1	2	3	4	5	B	C	DMEM
[ ] $\mu\text{M}$	400	600	800	1000	1200	DMSO	-	-
cells /mL	2.00E+04	2.00E+04	2.00E+04	2.00E+04	2.00E+04	2.00E+04	2.00E+04	-
Abs	0.448	0.372	0.330	0.148	0.155	0.468	0.521	0.083
	0.453	0.466	0.358	0.129	0.119	0.455	0.560	0.078
	0.518	0.500	0.327	0.123	0.154	0.483	0.550	0.076
	0.479	0.490	0.389	0.160	0.127	0.475	0.579	0.082
	0.508	0.482	0.388	0.143	0.121	0.461	0.517	0.085

Promedio	0.481	0.462	0.358	0.141	0.135	0.468	0.545	0.081
D.S.	0.032	0.052	0.030	0.015	0.018	0.011	0.026	0.004
C.V.	6.551	11.218	8.377	10.557	13.215	2.366	4.821	4.581

abs cor.	0.400	0.381	0.278	0.060	0.054	0.388	0.465	0.000
% Viabilidad	88.2288	84.7085	65.7132	25.7792	24.7891	85.8819	100.0000	
							14.1181	

Viabilidad corregida	102.3469	98.8265	79.8313	39.8973	38.9072			
----------------------	----------	---------	---------	---------	---------	--	--	--

MCF-7 / Ac. Cafeico (2)								
Ensayo	1	2	3	4	5	B	C	DMEM
[ ] $\mu$ M	400	600	800	1000	1200	DMSO	-	-
cells /mL	2.00E+04	2.00E+04	2.00E+04	2.00E+04	2.00E+04	2.00E+04	2.00E+04	-
Abs	0.743	0.693	0.602	0.227	0.203	0.673	0.708	0.101
	0.669	0.595	0.505	0.216	0.202	0.670	0.786	0.098
	0.675	0.703	0.504	0.254	0.199	0.635	0.702	0.102
	0.686	0.673	0.558	0.251	0.229	0.680	0.782	0.100
	0.705	0.699	0.551	0.289	0.207	0.666	0.783	0.110

<b>Promedio</b>	0.696	0.673	0.544	0.247	0.208	0.665	0.752	0.102
<b>D.S.</b>	0.030	0.045	0.041	0.028	0.012	0.017	0.043	0.005
<b>C.V.</b>	4.288	6.674	7.540	11.413	5.809	2.621	5.738	4.505

<b>abs cor.</b>	0.593	0.570	0.442	0.145	0.106	0.563	0.650	0.000
<b>% Viabilidad</b>	92.4754	89.4177	72.3212	32.8902	27.6522	88.3807	100.0000	
							11.6193	

<b>Viabilidad corregida</b>	<b>104.0947</b>	<b>101.0370</b>	<b>83.9404</b>	<b>44.5094</b>	<b>39.2715</b>
-----------------------------	-----------------	-----------------	----------------	----------------	----------------

MCF-7 / 1,8-cineole (1)								
Ensayo	1	2	3	4	5	B	C	DMEM
[ ] mM	4	6	8	10	12	EtOH	-	-
cells /mL	2.00E+04	2.00E+04	2.00E+04	2.00E+04	2.00E+04	2.00E+04	2.00E+04	-
Abs	0.448	0.349	0.305	0.197	0.107	0.409	0.471	0.085
	0.420	0.423	0.318	0.168	0.153	0.415	0.463	0.082
	0.440	0.443	0.286	0.164	0.108	0.414	0.478	0.098
	0.445	0.441	0.347	0.161	0.199	0.466	0.444	0.099
	0.433	0.456	0.302	0.181	0.143	0.469	0.413	0.112

<b>Promedio</b>	0.437	0.422	0.312	0.174	0.142	0.435	0.454	0.095
<b>D.S.</b>	0.011	0.043	0.023	0.015	0.038	0.030	0.026	0.012
<b>C.V.</b>	2.554	10.105	7.327	8.528	26.705	6.935	5.754	12.679

<b>abs cor.</b>	0.342	0.327	0.216	0.079	0.047	0.339	0.359	0.000
<b>% Viabilidad</b>	96.3420	93.0807	68.6646	38.3870	31.2913	95.7691	100.0000	
						4.2309		

<b>Viabilidad corregida</b>	<b>100.5729</b>	<b>97.3116</b>	<b>72.8955</b>	<b>42.6179</b>	<b>35.5223</b>
-----------------------------	-----------------	----------------	----------------	----------------	----------------

MCF-7 / 1,8-cineole (2)								
Ensayo	1	2	3	4	5	B	C	DMEM
[ ] mM	4	6	8	10	12	EtOH	-	-
cells /mL	1.00E+04	1.00E+04	1.00E+04	1.00E+04	1.00E+04	1.00E+04	1.00E+04	-
Abs	0.344	0.302	0.243	0.078	0.079	0.288	0.348	0.082
	0.296	0.296	0.163	0.077	0.078	0.304	0.364	0.079
	0.266	0.238	0.120	0.078	0.077	0.261	0.300	0.088
	0.257	0.244	0.126	0.083	0.074	0.249	0.297	0.080
	0.335	0.325	0.226	0.098	0.076	0.236	0.311	0.083

<b>Promedio</b>	0.300	0.281	0.176	0.083	0.077	0.268	0.324	0.082
<b>D.S.</b>	0.039	0.038	0.057	0.009	0.002	0.028	0.030	0.004
<b>C.V.</b>	13.121	13.575	32.206	10.646	2.505	10.452	9.323	4.256

<b>abs cor.</b>	0.204	0.186	0.080	-0.012	-0.018	0.172	0.229	-0.013
<b>% Viabilidad</b>	92.4691	86.7284	54.1975	25.5556	23.7037	82.5926	100.0000	
						17.4074		

<b>Viabilidad corregida</b>	<b>109.8765</b>	<b>104.1358</b>	<b>71.6049</b>	<b>42.9630</b>	<b>41.1111</b>			
-----------------------------	-----------------	-----------------	----------------	----------------	----------------	--	--	--

MCF-7 / 1,8-cineole (3)								
Ensayo	1	2	3	4	5	B	C	DMEM
[ ] mM	4	6	8	10	12	EtOH	-	-
cells /mL	1.00E+04	1.00E+04	1.00E+04	1.00E+04	1.00E+04	1.00E+04	1.00E+04	-
Abs	0.669	0.656	0.535	0.294	0.143	0.607	0.752	0.094
	0.695	0.596	0.527	0.207	0.150	0.599	0.820	0.100
	0.746	0.645	0.401	0.245	0.122	0.635	0.730	0.099
	0.662	0.551	0.454	0.245	0.167	0.596	0.788	0.102
	0.769	0.673	0.503	0.247	0.157	0.552	0.745	0.103

<b>Promedio</b>	0.708	0.624	0.484	0.248	0.148	0.598	0.767	0.100
<b>D.S.</b>	0.047	0.050	0.056	0.031	0.017	0.030	0.036	0.004
<b>C.V.</b>	6.687	8.002	11.596	12.473	11.456	4.998	4.758	3.521

<b>abs cor.</b>	0.613	0.529	0.389	0.152	0.053	0.503	0.672	0.004
<b>% Viabilidad</b>	92.3338	81.3820	63.1030	32.2816	19.2699	77.9400	100.0000	
						22.0600		

<b>Viabilidad corregida</b>	<b>114.3937</b>	<b>103.4420</b>	<b>85.1630</b>	<b>54.3416</b>	<b>41.3299</b>			
-----------------------------	-----------------	-----------------	----------------	----------------	----------------	--	--	--

03 - IC<sub>50</sub>

[Inhibitor] vs. normalized response -- Variable slope	MDA-MB-231		MCF-7	
	Ac. Cafeico	1,8-cineol	Ac. Cafeico	1,8-cineol
<b>Best-fit values</b>				
IC50	<b>730</b>	<b>8.095</b>	<b>1028</b>	<b>10.34</b>
HillSlope	-2.726	-4.901	-5.218	-4.917
logIC50	2.863	0.9082	3.012	1.014
<b>95% CI (profile likelihood)</b>				
IC50	673.8 to 795.4	7.766 to 8.445	989.2 to 1070	9.778 to 11.01
HillSlope	-3.468 to -2.114	-6.028 to -3.989	-6.456 to -4.199	-6.483 to -3.701
logIC50	2.829 to 2.901	0.8902 to 0.9266	2.995 to 3.030	0.9903 to 1.042
<b>Goodness of Fit</b>				
Degrees of Freedom	16	16	16	16
R squared	0.936	0.966	0.9558	0.9185
Sum of Squares	893.5	540.7	571.3	1113
Sy.x	7.473	5.813	5.976	8.342
<b>Constraints</b>				
IC50	IC50 > 0	IC50 > 0	IC50 > 0	IC50 > 0
<b>Number of points</b>				
# of X values	18	18	18	18
# Y values analyzed	18	18	18	18

## 04 - Análisis estadístico (IC<sub>50</sub> y comparativas entre concentraciones)

ANOVA summary	MDA-MB-231		MCF-7	
	Ac. Cafeico	1,8-cineol	Ac. Cafeico	1,8-cineol
<b>F</b>	660.4	152.8	232.2	91.23
<b>P value</b>	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
<b>P value summary</b>	****	****	****	****
<b>Significant diff. among means (P &lt; 0.05)?</b>	Yes	Yes	Yes	Yes
<b>R squared</b>	0.9964	0.9845	0.9898	0.9744

		Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value	
MDA-MB-231	Ac. Cafeico	0 vs. 200	-2.835	-8.462 to 2.793	No	ns	0.5607	A-B
		0 vs. 400	7.745	2.117 to 13.37	Yes	**	0.006	A-C
		0 vs. 600	46.12	40.49 to 51.75	Yes	****	<0.0001	A-D
		0 vs. 800	60.27	54.64 to 65.89	Yes	****	<0.0001	A-E
		0 vs. 1000	61.52	55.89 to 67.15	Yes	****	<0.0001	A-F
		200 vs. 400	10.58	4.952 to 16.21	Yes	***	0.0004	B-C
		200 vs. 600	48.96	43.33 to 54.58	Yes	****	<0.0001	B-D
		200 vs. 800	63.1	57.47 to 68.73	Yes	****	<0.0001	B-E
		200 vs. 1000	64.36	58.73 to 69.98	Yes	****	<0.0001	B-F
		400 vs. 600	38.38	32.75 to 44.00	Yes	****	<0.0001	C-D
		400 vs. 800	52.52	46.89 to 58.15	Yes	****	<0.0001	C-E
		400 vs. 1000	53.78	48.15 to 59.40	Yes	****	<0.0001	C-F
	600 vs. 800	14.15	8.519 to 19.77	Yes	****	<0.0001	D-E	
	600 vs. 1000	15.4	9.773 to 21.03	Yes	****	<0.0001	D-F	
	800 vs. 1000	1.254	-4.373 to 6.882	No	ns	0.9712	E-F	
	1,8-cineol	0 vs. 2	-6.922	-19.34 to 5.496	No	ns	0.4609	A-B
		0 vs. 4	-3.099	-15.52 to 9.319	No	ns	0.9542	A-C
		0 vs. 6	19.5	7.083 to 31.92	Yes	**	0.0021	A-D
		0 vs. 8	50.69	38.27 to 63.11	Yes	****	<0.0001	A-E
		0 vs. 10	71.41	58.99 to 83.83	Yes	****	<0.0001	A-F
		2 vs. 4	3.823	-8.595 to 16.24	No	ns	0.8974	B-C
		2 vs. 6	26.42	14.01 to 38.84	Yes	***	0.0001	B-D
		2 vs. 8	57.61	45.19 to 70.03	Yes	****	<0.0001	B-E
		2 vs. 10	78.33	65.92 to 90.75	Yes	****	<0.0001	B-F
4 vs. 6		22.6	10.18 to 35.02	Yes	***	0.0006	C-D	
4 vs. 8		53.79	41.37 to 66.21	Yes	****	<0.0001	C-E	
4 vs. 10		74.51	62.09 to 86.93	Yes	****	<0.0001	C-F	
6 vs. 8	31.19	18.77 to 43.61	Yes	****	<0.0001	D-E		
6 vs. 10	51.91	39.49 to 64.33	Yes	****	<0.0001	D-F		
8 vs. 10	20.72	8.305 to 33.14	Yes	**	0.0012	E-F		

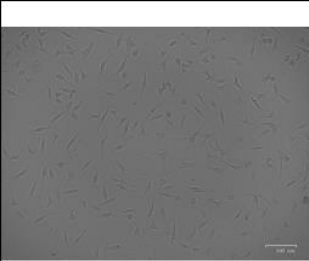
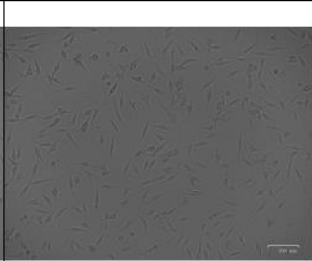
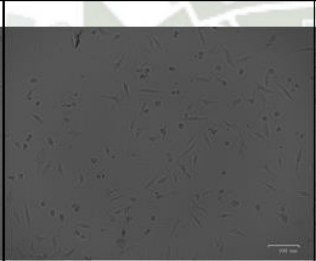
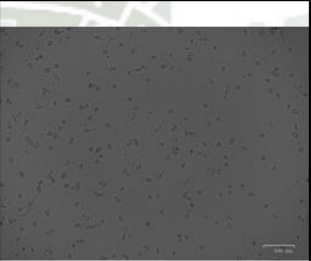
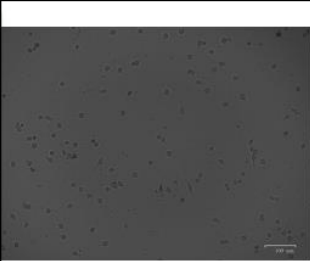
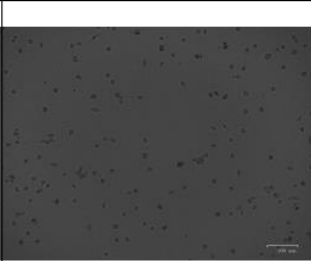
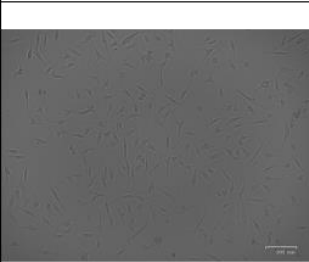
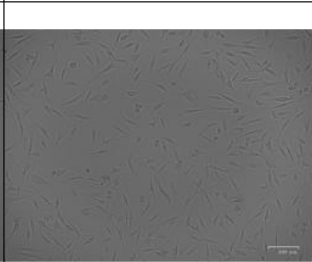


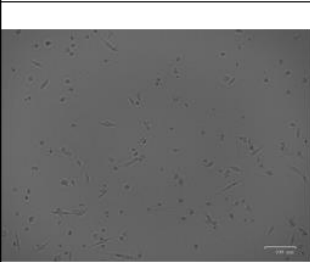
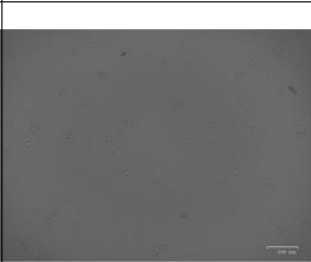
		Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value	
MCF-7	Ac. Cafeico	0 vs. 400	-2.835	-11.94 to 6.266	No	ns	0.893	A-B
		0 vs. 600	2.454	-6.648 to 11.56	No	ns	0.9377	A-C
		0 vs. 800	17.84	8.736 to 26.94	Yes	***	0.0003	A-D
		0 vs. 1000	54.96	45.86 to 64.06	Yes	****	<0.0001	A-E
		0 vs. 1200	62.96	53.86 to 72.07	Yes	****	<0.0001	A-F
		400 vs. 600	5.29	-3.812 to 14.39	No	ns	0.4194	B-C
		400 vs. 800	20.67	11.57 to 29.77	Yes	****	<0.0001	B-D
		400 vs. 1000	57.8	48.69 to 66.90	Yes	****	<0.0001	B-E
		400 vs. 1200	65.8	56.70 to 74.90	Yes	****	<0.0001	B-F
		600 vs. 800	15.38	6.282 to 24.49	Yes	**	0.0011	C-D
		600 vs. 1000	52.51	43.41 to 61.61	Yes	****	<0.0001	C-E
		600 vs. 1200	60.51	51.41 to 69.61	Yes	****	<0.0001	C-F
		800 vs. 1000	37.12	28.02 to 46.23	Yes	****	<0.0001	D-E
		800 vs. 1200	45.13	36.03 to 54.23	Yes	****	<0.0001	D-F
	1000 vs. 1200	8.003	-1.099 to 17.11	No	ns	0.0977	E-F	
	1,8-cineol	0 vs. 4	-8.281	-23.10 to 6.535	No	ns	0.4582	A-B
		0 vs. 6	-1.63	-16.45 to 13.19	No	ns	0.9988	A-C
		0 vs. 8	23.45	8.630 to 38.26	Yes	**	0.002	A-D
		0 vs. 10	53.36	38.54 to 68.18	Yes	****	<0.0001	A-E
		0 vs. 12	60.68	45.86 to 75.49	Yes	****	<0.0001	A-F
		4 vs. 6	6.651	-8.165 to 21.47	No	ns	0.6663	B-C
		4 vs. 8	31.73	16.91 to 46.54	Yes	***	0.0001	B-D
		4 vs. 10	61.64	46.82 to 76.46	Yes	****	<0.0001	B-E
		4 vs. 12	68.96	54.14 to 83.78	Yes	****	<0.0001	B-F
		6 vs. 8	25.08	10.26 to 39.89	Yes	**	0.0011	C-D
		6 vs. 10	54.99	40.17 to 69.80	Yes	****	<0.0001	C-E
6 vs. 12		62.31	47.49 to 77.12	Yes	****	<0.0001	C-F	
8 vs. 10	29.91	15.10 to 44.73	Yes	***	0.0002	D-E		
8 vs. 12	37.23	22.42 to 52.05	Yes	****	<0.0001	D-F		
10 vs. 12	7.32	-7.496 to 22.14	No	ns	0.5793	E-F		

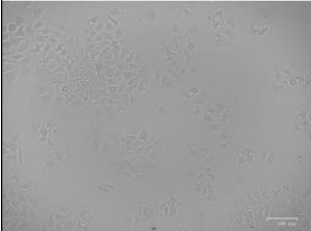
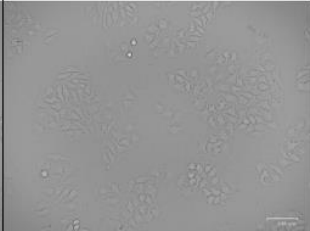
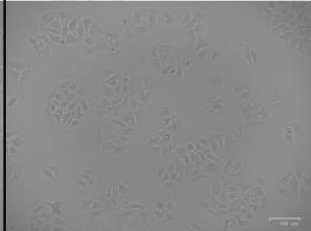
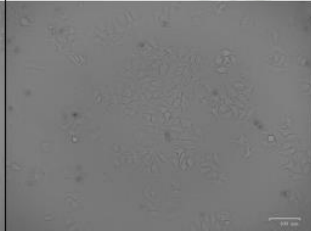
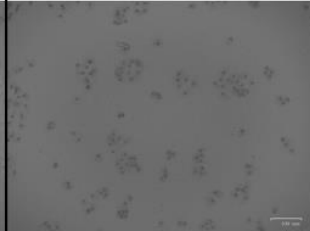
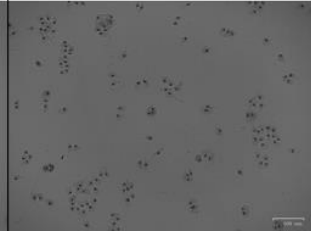
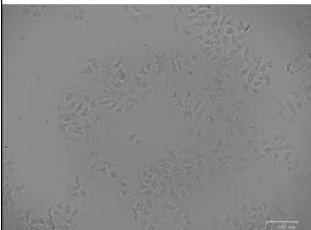
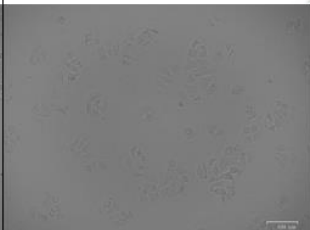

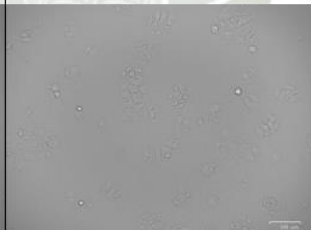
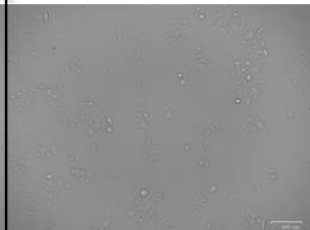
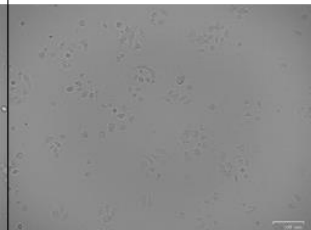
## 05 - Análisis estadístico (ensayo de cicatrización)

Table Analyzed	MDA-MB-231							
	Ac. Cafeico				1,8-cineol			
	3 hrs	6hrs	12hrs	24 hrs	3 hrs	6hrs	12hrs	24 hrs
Column B	IC50	IC50	IC50	IC50	IC50	IC50	IC50	IC50
vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
Column A	Control	Control	Control	Control	Control	Control	Control	Control
<b>Unpaired t test</b>								
P value	0.0111	0.0012	0.0084	0.0004	0.039	0.0322	0.0078	0.0011
P value summary	*	**	**	***	*	*	**	**
Significantly different (P < 0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed
t, df	t=4.466, df=4	t=8.213, df=4	t=4.843, df=4	t=11.01, df=4	t=3.023, df=4	t=3.224, df=4	t=4.946, df=4	t=8.406, df=4
<b>How big is the difference?</b>								
Mean of column A	20.9	37.78	51.17	77.92	21.58	43.68	58.25	77.55
Mean of column B	6.913	12.62	17.41	22.28	12.32	23.25	27.76	31.29
Difference between means (B - A) ± SEM	-13.99 ± 3.132	-25.16 ± 3.063	-33.76 ± 6.972	-55.65 ± 5.054	-9.259 ± 3.063	-20.42 ± 6.334	-30.49 ± 6.165	-46.25 ± 5.502
95% confidence interval	-22.68 to -5.291	-33.67 to -16.65	-53.12 to -14.40	-69.68 to -41.62	-17.76 to -0.7561	-38.01 to -2.835	-47.61 to -13.38	-61.53 to -30.98
R squared (eta squared)	0.8329	0.944	0.8543	0.9681	0.6956	0.7221	0.8595	0.9464

Table Analyzed	MCF-7							
	Ac. Cafeico				1,8-cineol			
	3 hrs	6hrs	12hrs	24 hrs	3 hrs	6hrs	12hrs	24 hrs
Column B	IC50	IC50	IC50	IC50	IC50	IC50	IC50	IC50
vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
Column A	Control	Control	Control	Control	Control	Control	Control	Control
<b>Unpaired t test</b>								
P value	0.5438	0.1573	0.0994	0.0039	0.0601	0.155	0.0262	0.003
P value summary	ns	ns	ns	**	ns	ns	*	**
Significantly different (P < 0.05)?	No	No	No	Yes	No	No	Yes	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed
t, df	t=0.6626, df=4	t=1.738, df=4	t=2.138, df=4	t=5.978, df=4	t=2.599, df=4	t=1.750, df=4	t=3.445, df=4	t=6.463, df=4
<b>How big is the difference?</b>								
Mean of column A	5.145	7.703	13.6	34.14	5.147	10.28	21.08	48.9
Mean of column B	2.386	-3.903	-0.8121	0.2866	1.374	1.115	3.633	11.76
Difference between means (B - A) ± SEM	-2.759 ± 4.164	-11.61 ± 6.678	-14.41 ± 6.740	-33.85 ± 5.663	-3.773 ± 1.452	-9.167 ± 5.238	-17.44 ± 5.064	-37.14 ± 5.747
95% confidence interval	-14.32 to 8.801	-30.15 to 6.937	-33.12 to 4.306	-49.58 to -18.13	-7.805 to 0.2577	-23.71 to 5.376	-31.50 to -3.385	-53.10 to -21.18
R squared (eta squared)	0.09891	0.4302	0.5332	0.8993	0.6281	0.4337	0.7479	0.9126

**06 - Ensayo MTT (fotografías microscópicas)**

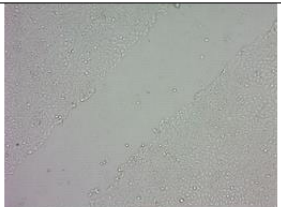
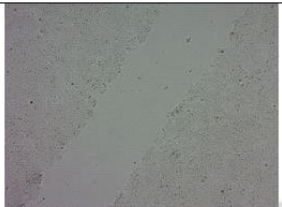



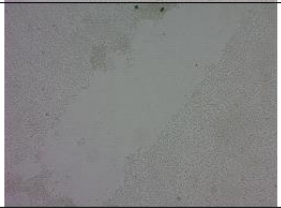

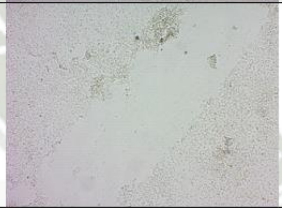


<b>MDA-MB-231</b>					
<b>Control</b>	<b>Ac. Cafeico</b>				
	200 $\mu$ M	400 $\mu$ M	600 $\mu$ M	800 $\mu$ M	1000 $\mu$ M
					
<b>Control</b>	<b>1,8-cineol</b>				
	2 mM	4 mM	6 mM	8 mM	10 mM
					

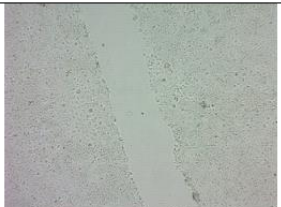



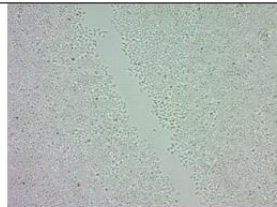
<b>MCF-7</b>					
<b>Control</b>	<b>Ac. Cafeico</b>				
	400 $\mu$ M	600 $\mu$ M	800 $\mu$ M	1000 $\mu$ M	1200 $\mu$ M
					
<b>Control</b>	<b>1,8-cineol</b>				
	4 mM	6 mM	8 mM	10 mM	12 mM
					

### 07 - Ensayo de cicatrización (fotografías microscópicas)

MDA-MB-231	Tiempo				
Ac. Cafeico	0 hrs.	3 hrs.	6 hrs.	12 hrs.	24 hrs.
Control					
IC <sub>50</sub>					

MDA-MB-231	Tiempo				
1,8-cineol	0 hrs.	3 hrs.	6 hrs.	12 hrs.	24 hrs.
Control					
IC <sub>50</sub>					

MCF-7	Tiempo				
Ac. Cafeico	0 hrs.	3 hrs.	6 hrs.	12 hrs.	24 hrs.
Control					
IC <sub>50</sub>					

MCF-7	Tiempo				
1,8-cineol	0 hrs.	3 hrs.	6 hrs.	12 hrs.	24 hrs.
Control					
IC <sub>50</sub>	