

Universidad Católica de Santa María

**Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y
Biotecnológicas**

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica



**“EVALUACION DEL EFECTO DE LA *N*-(3-methoxybenzyl)-
palmitamida Y LA *N*-(3-methoxybenzyl)-tetradecanamida EN CELULAS DE
ADENOCARCINOMA DE MAMA HUMANO (MDA-MB 231) Y SU
RELACION CON LA INHIBICION DE LA AMIDA HIDROLASA DE
ACIDOS GRASOS (FAAH)”**

Tesis presentada por el bachiller:
López Ramos, Diego Rodrigo
para optar el Título Profesional de:
Químico Farmacéutico

Asesor de tesis:
PhD Cárdenas García, Jaime Dante

Arequipa – Perú

2019

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA Expediente N°. 14038312
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas N° Trámite en Fac. 1597-2014
Programa Profesional de Farmacia y Bioquímica Fecha 01-09-2014

FORMATO DE TITULACION PROFESIONAL


DE: LOPEZ RAMOS, Diego Rodrigo

TITULO DEL PROYECTO DE TESIS:

"EVALUACION DEL EFECTO DE LA N-(3-methoxybenzyl)-palmitamida Y LA N-(3-methoxybenzyl)-tetradecanamida EN CELULAS DE ADENOCARCINOMA DE MAMA HUMANO (MDA-MB 231) Y SU RELACION CON LA INHIBICION DE LA AMIDA HIDROLASA D ACIDOS GRASOS (FAAH) "

DICTAMINADORES: 1) Mgter. Angélica Corzo Salas 2) Mgter. José Villanueva Salas

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano: según lo encargado, hemos procedido a revisar el Plan de Tesis intitulado "Evaluación del efecto de la N-(3-methoxybenzyl)-palmitamida y la N-(3-methoxybenzyl)-tetradecanamida en células de adenocarcinoma de mama humano (MDA-MB 231) y su relación con la inhibición de la amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH).

Firmas :  (Devolver antes de 8 días hábiles) Fecha 02/09/2014

ASESOR: Dr. Jaime Cárdenas García


DICTAMEN DE ASESOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como Asesor en el presente Trabajo de Investigación, cumpro con informar que este se ha desarrollado de acuerdo a los objetivos trazados y se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad.

Firma  Fecha 28/12/17

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:


- 1) Dr. Alberto Briceño Ortega
- 2) Dr. José Villanueva Salas
- 3) Mgter. Angélica Corzo Salas

DICTAMEN DE BORRADOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, hemos procedido a revisar el Borrador de Tesis presentado por los recurrente, y luego de haber verificado el cumplimiento de los objetivos, la redacción del informe, de los resultados, discusión y conclusiones correspondientes, consideramos se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Firma  (Devolver antes de 15 días hábiles) Fecha 28/12/2018

JURADOS: Presidente DR. ALBERTO BRICEÑO ORTEGA
Vocal DRA. ROSANA FUTIERNER ARANIBAR
Secretario MAG. ANGÉLICA CORZO SALAS

SUSTENTACIÓN DE TRABAJO:

 Fecha: 9/4/19 Hora: 18.00 Local: C- 402 (SUM)

Dedicatoria

A mi Mamitita, porque gracias a ti soy quien soy, no hay día que no te extrañe y piense en ti. Por tus enseñanzas y consejos a ti, mi gratitud y cariño eterno.

A mi mami Chio, pues todos estos logros son fruto tu dedicación, sacrificio y esfuerzo. Te dedico en especial esta tesis porque gracias a tu empuje y motivación fue culminada, por hacerme una persona de bien y porque tú amor y cariño me hace seguir adelante.

A mi querida familia, quienes están siempre a mi lado celebrando mis logros y animándome a levantarme en mis caídas, los amo.

Y a todas aquellas personas que se han dado un tiempo para darme unas palabras de aliento, un sabio consejo y una mano para poder terminar esta tesis y culminar la etapa de pregrado. Gracias a cada una de ustedes por estar a mi lado, con todo mi cariño y agradecimiento se las dedico.

Agradecimientos

En primer lugar, agradecer a Dios y a la Virgen María por permitirme llegar a este momento importante de mi vida. Por concederme la serenidad de aceptar todo aquello que no puedo cambiar, fortaleza para cambiar lo que soy capaz de cambiar y sabiduría para entender la diferencia.

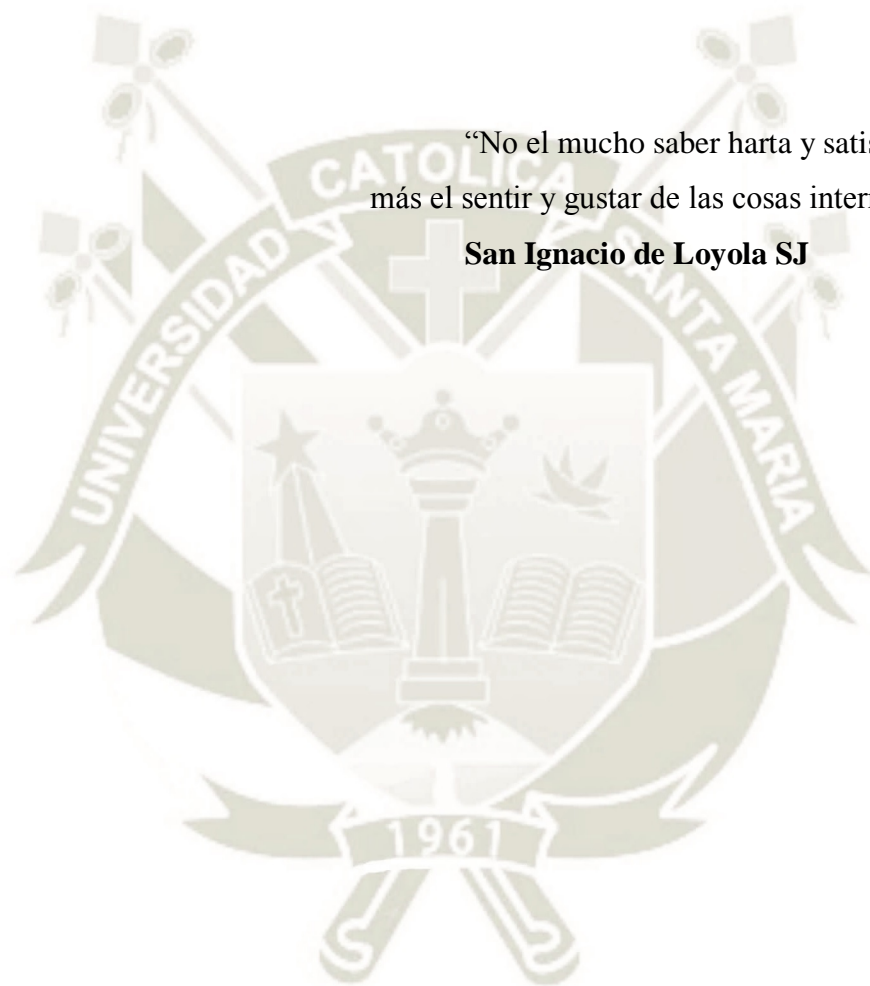
A mi Universidad Católica de Santa María y a los docentes de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica. En especial al Dr. José Villanueva por sus consejos y aliento cuando más lo necesitaba.

A mi asesor, Dr. Jaime Cárdenas por su orientación y guía, por querer que esta tesis salga de la mejor manera y apoyarme hasta el último momento.

A todos los que estuvieron involucrados de alguna manera en mi formación y que son parte importante de este logro.

“No el mucho saber harta y satisface al anima,
más el sentir y gustar de las cosas internamente”.

San Ignacio de Loyola SJ



INDICE

INTRODUCCIÓN

RESUMEN

ABSTRACT

HIPÓTESIS

OBJETIVOS

GLOSARIO

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1. Planta de Maca.....	1
1.1. Origen y Descripción	
1.2. Clasificación Taxonómica.....	2
1.3. Fitoquímica	
1.4. Usos tradicionales y actividad biológica.....	4
1.5. Macamidas	6
1.6. Propiedades farmacológicas y medicinales de la maca.....	7
2. Sistema endocanabinoide	8
3. Cultivos celulares	9
3.1. Introducción	
3.2. Medio de cultivo	10
3.3. Ensayos comúnmente utilizados	
4. Cáncer de mama	11
4.1. Introducción	
4.2. Incidencia y mortalidad.....	12
4.3. Factores de riesgo.....	13
4.4. Línea celular MDA-MB 231	
5. Droga utilizada	14
5.1. Celecoxib	
6. Cultivo celular y estudios	15
6.1. Líneas celulares.....	
6.2. Medio de cultivo	16
6.3. Viabilidad celular y MTS.....	

CAPÍTULO II

PLANTEAMIENTO OPERACIONAL

1. Materiales, reactivos y equipos	17
1.1. Unidades biológicas	
1.2. Materiales y reactivos	
1.3. Lugar de investigación	19
1.4. Metodología y análisis	
2. Estrategia de recolección de datos.....	25
2.1. Análisis estadístico.....	

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DICUSION

1. Preparación de las sustancias utilizadas	26
1.1. Preparación de la solución stock de HW-91	
1.2. Preparación de la solución stock de HW-79	
1.3. Preparación de las soluciones de celecoxib	27
2. Cultivo celular	
3. Conteo de células viables	28
4. Efecto de HW-91 y HW-79 sobre viabilidad celular	
4.1. Efecto de HW-91 sobre la viabilidad celular	
4.2. Efecto de HW-79 sobre la viabilidad celular	31
4.3. Efecto de celecoxib sobre la viabilidad celular.....	33
4.4. Efecto de HW-91 en combinación con celecoxib sobre la viabilidad celular	35
4.5. Efecto de HW-79 en combinación con celecoxib sobre la viabilidad celular.....	37
4.6. Comparación del efecto de celecoxib, HW-91 en combinación con celecoxib y HW-79 en combinación con celecoxib sobre la viabilidad celular a las 72 hrs.....	39
5. Método FAAH.....	40

CONCLUSIONES	44
--------------------	----

BIBLIOGRAFIA.....	45
-------------------	----

ANEXOS.....	51
-------------	----

INDICE DE FIGURAS

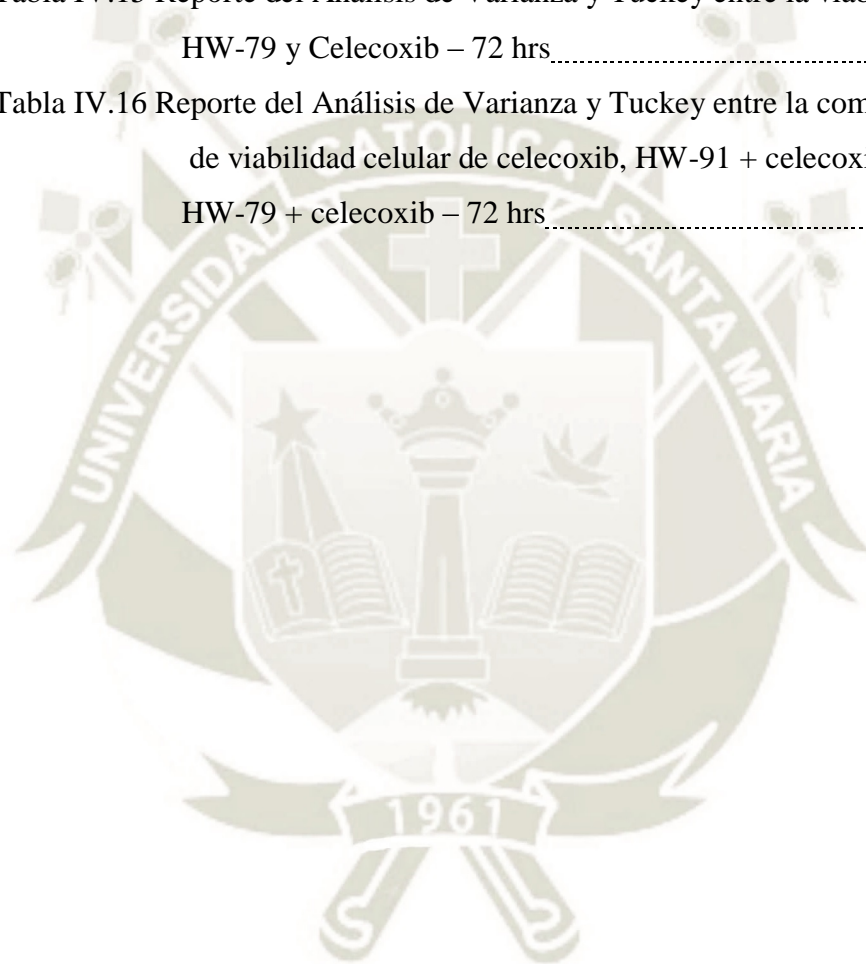
Figura I.1 Maca cosechada y el hipocótilo.....	2
Figura I.2. Estructura química de anandamida (Endocannabinoide).....	7
Figura I.3. Anatomía de la mama femenina.....	12
Figura I.4. Estructura química del celecoxib.....	15
Figura II.1. Estructura química de N-(3-methoxybenzyl)-palmitamida (HW-79).....	18
Figura II.2. Estructura química de N-(3-methoxybenzyl)-tetradecanamida (HW-91).....	18
Figura II.3. Cámara de flujo laminar (Esco®, Class II Type A2).....	19
Figura II.4. Estufa de incubación.....	22
Figura III.1. Adenocarcinoma MDA-MB-231 Después de 2 días de desarrollo (izquierda, baja densidad), después de 4 días de desarrollo (derecha, alta densidad).....	28
Figura III.2. Efecto de HW-91 sobre la viabilidad celular – 24 hrs.....	29
Figura III.3. Efecto de HW-91 sobre la viabilidad celular – 48 hrs.....	29
Figura III.4. Efecto de HW-91 sobre la viabilidad celular – 72 hrs.....	30
Figura III.5. Efecto de HW-91 sobre la viabilidad celular –24hrs, 48 hrs y 72 hrs.....	30
Figura III.6. Efecto de HW-79 sobre la viabilidad celular – 24 hrs.....	31
Figura III.7. Efecto de HW-79 sobre la viabilidad celular – 48 hrs.....	32
Figura III.8. Efecto de HW-79 sobre la viabilidad celular – 72 hrs.....	32
Figura III.9. Efecto de HW-79 sobre la viabilidad celular –24 hrs, 48 hrs y 72 hrs.....	33
Figura III.10. Efecto del celecoxib sobre la viabilidad celular – 24 hrs.....	33
Figura III.11. Efecto de celecoxib sobre la viabilidad celular – 48 hrs.....	33
Figura III.12. Efecto de celecoxib sobre la viabilidad celular – 72 hrs.....	34
Figura III.13. Efecto de celecoxib sobre la viabilidad celular –24hrs, 48 hrs y 72 hrs.....	34

Figura III.14. Efecto de HW-91 en combinación con celecoxib sobre la viabilidad celular –24hrs.....	35
Figura III.15. Efecto de HW-91 en combinación con celecoxib sobre la viabilidad celular –48hrs.....	35
Figura III.16. Efecto de HW-91 en combinación con celecoxib sobre la viabilidad celular –72hrs.....	36
Figura III.17. Efecto de HW-91 en combinación con celecoxib sobre la viabilidad celular –24, 48 y 72hrs.....	36
Figura III.18. Efecto de HW-79 en combinación con celecoxib sobre la viabilidad celular –24hrs.....	37
Figura III.19. Efecto de HW-79 en combinación con celecoxib sobre la viabilidad celular –48hrs.....	37
Figura III.20. Efecto de HW-79 en combinación con celecoxib sobre la viabilidad celular –72hrs.....	38
Figura III.21. Efecto de HW-79 en combinación con celecoxib sobre la viabilidad celular –24, 48 y 72hrs.....	38
Figura III.22. Efecto de celecoxib, HW-91 + celecoxib y HW-79 + celecoxib sobre la viabilidad celular –72hrs.....	39
Figura III.23. Porcentaje de fluorescencia versus tiempo por concentraciones de HW-79.....	40
Figura III.24. Porcentaje de fluorescencia versus tiempo por concentraciones de HW-91.....	40
Figura III.25. Porcentaje de Inhibición de FAAH por HW-79.....	41
Figura III.26. Porcentaje de Inhibición de FAAH por HW-91.....	41
Figura III.27. Porcentaje de Inhibición de FAAH por HW-79 y HW-91.....	42

INDICE DE TABLAS

Tabla I.1. División taxonómica de <i>Lepidium meyenii</i>	2
Tabla I.2 Ácidos grasos presentes en los hipocótilos de la maca	3
Tabla I.3. Propiedades de la maca después de la administración in vivo	8
Tabla III.1. Soluciones de HW-91	26
Tabla III.2. Soluciones de HW-79	27
Tabla III.3. Soluciones de celecoxib	27
Tabla IV.1 Reporte del Análisis de Varianza y Tuckey entre la viabilidad celular y HW-91 – 24 hrs	51
Tabla IV.2 Reporte del Análisis de Varianza y Tuckey entre la viabilidad celular y HW-91 – 48 hrs.	52
Tabla IV.3 Reporte del Análisis de Varianza y Tuckey entre la viabilidad celular y HW-91 – 72 hrs	53
Tabla IV.4 Reporte del Análisis de Varianza y Tuckey entre la viabilidad celular y HW-79 – 24 hr	54
Tabla IV.5 Reporte del Análisis de Varianza y Tuckey entre la viabilidad celular y HW-79 – 48 hrs	55
Tabla IV.6 Reporte del Análisis de Varianza y Tuckey entre la viabilidad celular y HW-79 – 72 hrs	56
Tabla IV.7 Reporte del Análisis de Varianza y Tuckey entre la viabilidad celular y Celecoxib – 24 hrs	57
Tabla IV.8 Reporte del Análisis de Varianza y Tuckey entre la viabilidad celular y Celecoxib – 48 hrs	58
Tabla IV.9 Reporte del Análisis de Varianza y Tuckey entre la viabilidad celular y Celecoxib – 72 hrs	59
Tabla IV.10 Reporte del Análisis de Varianza y Tuckey entre la viabilidad celular HW-91 y Celecoxib – 24 hrs	60
Tabla IV.11 Reporte del Análisis de Varianza y Tuckey entre la viabilidad celular HW-91 y Celecoxib – 48 hrs	61

Tabla IV.12 Reporte del Análisis de Varianza y Tuckey entre la viabilidad celular HW-91 y Celecoxib – 72 hrs.....	62
Tabla IV.13 Reporte del Análisis de Varianza y Tuckey entre la viabilidad celular HW-79 y Celecoxib – 24 hrs.....	63
Tabla IV.14 Reporte del Análisis de Varianza y Tuckey entre la viabilidad celular HW-79 y Celecoxib – 48 hrs.....	64
Tabla IV.15 Reporte del Análisis de Varianza y Tuckey entre la viabilidad celular HW-79 y Celecoxib – 72 hrs.....	65
Tabla IV.16 Reporte del Análisis de Varianza y Tuckey entre la comparación de viabilidad celular de celecoxib, HW-91 + celecoxib y HW-79 + celecoxib – 72 hrs.....	66



INTRODUCCION

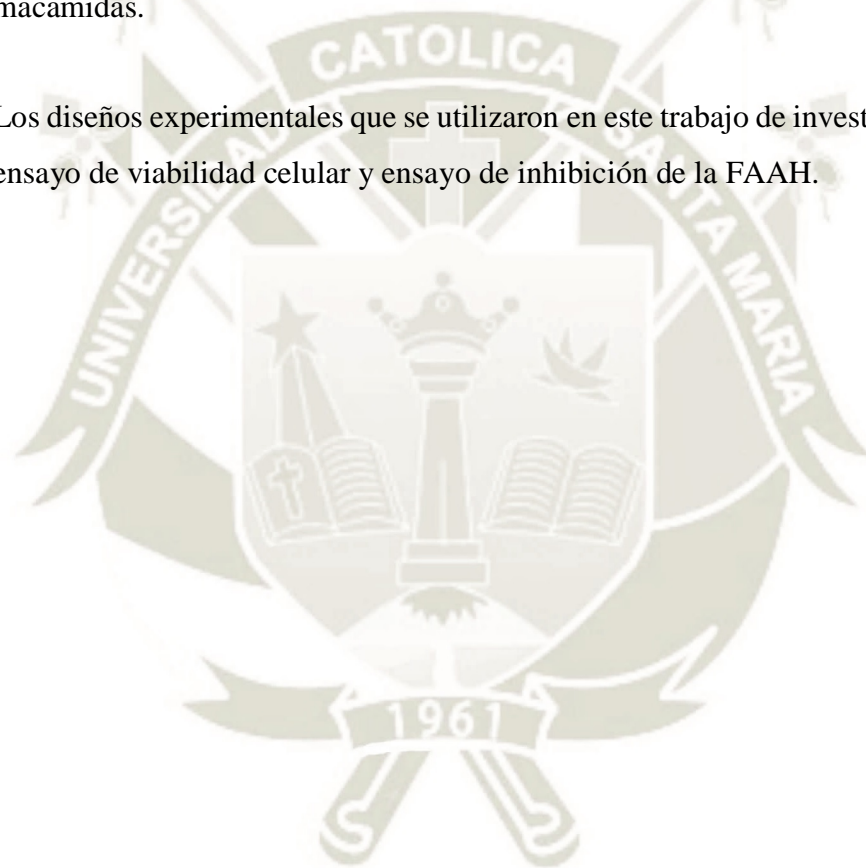
Lepidium meyenii (Maca) es una planta herbácea peruana la cual crece a una altitud de 4000 m.s.n.m. y es ampliamente consumida en los Andes debido a sus propiedades nutricionales y su influencia sugerida sobre el comportamiento sexual. Las investigaciones de su perfil farmacológico demostraron que la Maca regula la actividad hormonal, aumenta la fertilidad en ratas macho y hembra, tiene efectos ansiolíticos y también es capaz de mejorar la memoria y el aprendizaje en ratas. La planta de maca contiene macamidas, las que pueden ser extraídas con n-pentano. Las macamidas tienen una estructura similar a los endocannabinoides. Se ha demostrado que el extracto de Maca inhibe la amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH), que es la enzima responsable del metabolismo de anandamida (AEA) en ácido araquidónico y etanolamina. La AEA es un endocannabinoide que influye en sistemas fisiológicos como el dolor, la regulación del apetito y el placer. Se podría ofrecer otro enfoque en el tratamiento del dolor, la obesidad y diversas enfermedades neurológicas si se descubren inhibidores de la FAAH donde sería beneficiosa una mayor actividad endocannabinoide.

El celecoxib es un inhibidor de la COX-2 que tradicionalmente se usa como AINE para tratar afecciones como la artritis reumatoide y también para reducir el efecto del crecimiento sobre las células cancerosas. Por esta razón, a veces se usa en tratamientos para de cáncer de pulmón y cáncer de mama. Sin embargo, se desconoce el mecanismo

exacto de acción, aunque se han identificado algunos factores que influyen en los efectos apoptóticos del celecoxib.

El objetivo de esta investigación es evaluar el potencial efecto protector de dos macamidas naturales, *N*-(3-methoxybenzyl)-palmitamida y la *N*-(3-methoxybenzyl)-tetradecanamida, en las células de cáncer de mama humano (MDA-MB 231) y a su vez evaluar el efecto inhibitor del Celecoxib en combinación con las macamidas ya mencionadas. Así mismo, medir la potencial inhibición de la FAAH de ambas macamidas.

Los diseños experimentales que se utilizaron en este trabajo de investigación incluyen: ensayo de viabilidad celular y ensayo de inhibición de la FAAH.



RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo principal evaluar el efecto de la *N*-(3-methoxybenzyl)-palmitamida (HW-79) y la *N*-(3-methoxybenzyl)-tetradecanamida (HW-91) en células de adenocarcinoma de mama humano (MDA-MB 231) y su relación con la inhibición de la amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH).

A su vez se evaluó dichas macamidas en combinación con el celecoxib, con tal fin se desarrollaron las evaluaciones mediante ensayos de viabilidad y ensayos de inhibición de la FAAH, evidenciándose que existe diferencias significativas estadísticamente comparadas entre el control y todas las concentraciones utilizadas, así mismo, dichas evaluaciones fueron realizadas en tres diferentes intervalos de tiempo, 24 horas, 48 horas y 72 horas.

Se evaluó el porcentaje de fluorescencia emitida utilizando el método de espectroscopia de fluorescencia donde se determinó que es inversamente proporcional al porcentaje de inhibición de la FAAH, ésta se vio afectada a medida que se iba incrementando las concentraciones de macamidas que fueron de 1 μM , 3 μM , 10 μM y 30 μM . El resultado mostró que el mayor efecto de inhibición se dio por la *N*-(3-methoxybenzyl)-tetradecanamida (HW-91).

PALABRAS CLAVE: Macamidas, cáncer de mama, viabilidad celular, FAAH

ABSTRACT

The main objective of the present study was to evaluate the effect of N- (3-methoxybenzyl) -palmitamide (HW-79) and N- (3-methoxybenzyl) -tetradecanamide (HW-91) on human breast adenocarcinoma cells (MDA-MB 231) and its relation to the inhibition of fatty acid amide hydrolase (FAAH).

In turn, these macamides were evaluated in combination with celecoxib, for which purpose the evaluations were developed by means of viability tests and FAAH inhibition tests, showing that there are statistically significant differences between the control and the used concentrations, were also performed the test in three different time intervals, 24 hours, 48 hours and 72 hours.

The fluorescence percentage was evaluated using the fluorescence spectroscopy method where it was determined that it is inversely proportional to the inhibition percentage of FAAH, this was affected as it was increasing the concentrations of macamides that were 1 μM , 3 μM , 10 μM and 30 μM . The result showed that the highest inhibition effect was given by N- (3-methoxybenzyl) -tetradecanamide (HW-91).

KEY WORDS: *Macamides, breast cancer, cell viability, FAAH*

HIPOTESIS

Dado que existen referencias sobre la capacidad de las macamidas para inhibir la actividad de líneas celulares, MDA-MB-231, de cáncer de mama; es probable que la asociación con el celecoxib, fármaco utilizado en el tratamiento de cáncer, produciría un efecto inhibitor sinérgico sobre el crecimiento de las células de cáncer de mama usadas.

OBJETIVOS

1. Evaluar el efecto de las macamidas *N*-(3-methoxybenzyl)-palmitamida y la *N*-(3-methoxybenzyl)-tetradecanamida sobre la viabilidad celular en células de cáncer de mama MDA-MB-231.
2. Evaluar el efecto de las macamidas *N*-(3-methoxybenzyl)-palmitamida y la *N*-(3-methoxybenzyl)-tetradecanamida en combinación con el celecoxib sobre la viabilidad celular en células de cáncer de mama MDA-MB-231.
3. Evaluar el efecto de las macamidas *N*-(3-methoxybenzyl)-palmitamida y la *N*-(3-methoxybenzyl)-tetradecanamida sobre la amida hidrolasa de ácidos grasos FAAH.

GLOSARIO

AEA: Anandamida

AINE: Antiinflamatorios No Esteroideos

COX-2: Ciclooxygenasa 2

DMEM: Dulbecco's modified eagle médium

EGF: Factor de Crecimiento Epidérmico

FAAH: Amida Hidrolasa de Ácidos Grasos

FAP: Poliposis Adenomatosa Familiar

FHS: Hormona Foliculoestimulante

HL: Hormona Luteinizante

LPE: Periodo De Latencia de la Erección

MCAO: Intraluminal Middle Cerebral Artery Occlusion

MTS: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfofenyl)-
2H-tetrazolium

STZ: Estreptomina

SNC: Sistema Nervioso Central

CAPITULO I MARCO TEORICO

1. PLANTA DE MACA

1.1. ORIGEN Y DESCRIPCION

El nombre científico que botánicamente es aceptado de la planta de la maca es *Lepidium meyenii*, descrita por primera vez por el botánico Wilhelm Gerhard Walpers¹. Ésta planta se clasifica en la familia *Brassicaceae*. La maca crece en un entorno único pues requiere suelos duros, climas fríos y altitudes elevadas (por encima de 4000 m s. n. m.) estas condiciones son importantes para el desarrollo de su perfil químico como farmacológico. Por lo tanto, se cultiva exclusivamente en la parte central del Perú, en las montañas de los Andes, una región geográfica que tiene las condiciones óptimas para la producción de maca.

La maca cultivada puede contar de 12 a 20 hojas que surgen de una raíz de color marrón granate que tiene una forma parecida a la de un rábano. Las raíces pueden medir hasta 8 cm de diámetro y, si se hace un corte transversal son de color blancas. Después de la cosecha, las raíces se secan en el clima de congelación, se vuelven verdes y negras y se reducen el tamaño para tomar la forma de un pequeño higo¹.

La parte principal de la planta de la maca utilizado es el hipocótilo, una estructura subterránea que se fusiona con la raíz para formar un cuerpo en forma de pera invertida áspera, tal como se puede apreciar en la figura I.1. Los hipocótilos de la maca varían

en color, tamaño y forma, que pueden ser de color amarillo, rojo, púrpura, azul o negro. Además, pueden ser circulares, esféricos o cónicos.



Figura I.1 Maca cosechada y el hipocótilo².

1.2. CLASIFICACION TAXONOMICA

Tabla I.1. División taxonómica de *Lepidium meyenii*³.

REINO	Vegetal
DIVISIÓN	Magnoliophyta
CLASE	Magnoliopsida o Dicotiledonea
SUB CLASE	Dilleniidae
ORDEN	Capparales
FAMILIA	Brassicaceae o Crucífera
TRIBU	Lepidieae
ESPECIE	<i>Lepidium</i> sp.
NOMBRE COMUN	Maca

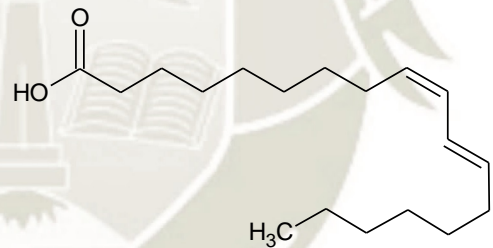
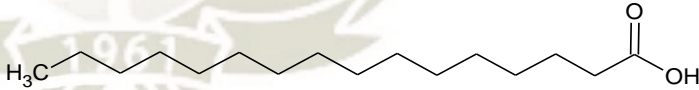

1.3. FITOQUIMICA

Los estudios químicos de los⁴ hipocótilos han demostrado que la maca contiene varios compuestos, que incluyen hidratos de carbono en un rango de 59 %, proteínas entre 10.2 %, ácidos grasos de 2.2 % y fibra entre 8.5 %. En cuanto al contenido de

agua representa aproximadamente el 80% del peso de hipocótilos de maca fresca, mientras que el contenido se reduce a 10-12% en hipocótilos desecados.

El contenido de proteína de maca es rica en aminoácidos esenciales⁵ tales como ácido aspártico (91.7 mg/g de proteína), arginina(99.4 mg/g de proteína), leucina (91 mg/g de proteína), valina (79.3 mg/g de proteína), fenilalanina (55.3 mg/g de proteína), lisina (54.5 mg/g de proteína), isoleucina (47.4 mg/g de proteína), treonina (33.1 mg/g de proteína), tirosina (30.6 mg/g de proteína), metionina (28.0 mg/g de proteína) y ácido glutámico (156.5 mg/g de proteína). Así mismo los hipocótilos de maca contienen ácidos grasos de 12-24 carbonos de longitud. Estos ácidos grasos incluyen altas concentraciones de ácido linoleico (32.6%), ácido palmítico (23.8%) y ácido oleico (11.1%). Los mismos que se presentan en la tabla I.2.

Tabla I.2 Ácidos grasos presentes en los hipocótilos de la maca

ACIDOS GRASOS PRESENTES EN LA MACA	
Ácido Linoleico	
Ácido Palmítico	
Ácido Oleico	

Fuente: Elaboración propia

La maca contiene una fracción de esteroides como brassicasterol (9.1%), ergosterol (13.6%), campesterol (27.3%), ergostadienol (4.5%) y sitosterol (45.5%)⁵.

Además, se han identificado un número de metabolitos secundarios y han sido aislados de las raíces de maca e incluyen alcaloides, isotiocianatos, glucosinolatos,

esteroles, catequinas y alquilamidas (macamidas), este último, que son derivados de lípidos con estructuras similares a las de los endocannabinoides^{6,7}.

1.4. USOS TRADICIONALES Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Tradicionalmente la maca se utiliza como alimento y con fines medicinales alternativos. La población en Perú ha utilizado hipocótilos de maca durante siglos como planta medicinal para mejorar el desempeño y aumentar la energía, la resistencia y para reducir el estrés y síntomas de la menopausia¹.

Los hipocótilos de maca también se utilizan para mejorar el metabolismo de lípidos, la glucosa, para mejorar la fertilidad y el comportamiento sexual en hombres y mujeres⁸. La maca también se usa para prevenir las enfermedades crónicas y neurodegenerativas. Además, es usada para tratar la pérdida de memoria, el cáncer y la depresión⁹.

Los estudios realizados en ratas han demostrado una serie de efectos farmacológicos de la maca¹⁰, como el aumento del número de espermatozoides y la motilidad de ondas permanentes, y mejora el comportamiento sexual masculino. El extracto de lípidos de maca mejoró la función sexual en ratones y ratas mediante la mejora del número de intromisiones completas y apareamientos en ratones normales y disminuyendo el periodo de latencia de la erección (LPE) en ratas con disfunción eréctil.

Clínicamente, la administración oral de la maca en adultos sanos (comprimidos que contienen hipocótilos desecados en 1.5 o 3.0 g/día) durante 4 meses incrementó los parámetros seminales como el volumen seminal, recuento de espermatozoides por eyaculación, recuento de motilidad de espermatozoides y movilidad de los espermatozoides. Cuando se midieron los niveles de hormonas en suero de HL, FSH, prolactina, testosterona y estradiol antes y después del tratamiento, no se observaron diferencias¹¹.

En el trabajo denominado “*Study of the hypoglycaemic activity of Lepidium sativum L. aqueous extract in normal and diabetic rats*”¹² concluyeron que los efectos de un extracto acuoso de maca sobre el metabolismo de la glucosa se han evaluado en ratas normales y diabéticas inducidas por estreptomicina (STZ). El extracto acuoso de maca (20 mg/kg) se administró por vía oral una vez para representar una dosificación aguda o se administró una vez al día durante 15 días para representar la administración crónica. Los niveles de glucosa en sangre se evaluaron a diario en ratas en ayunas 1, 2, 4, y 6 horas después de administrada la dosis. Para la dosificación crónica, el nivel de glucosa se evaluó después de 2 y 4 días y después de 1 y 2 semanas desde el inicio de la administración por vía oral una vez al día. Como resultado, el extracto de maca acuosa causó una disminución significativa en los niveles de glucosa en sangre en ratas normales y en las diabéticas inducidas por STZ y después de los tratamientos agudos y crónicos, sin afectar a las concentraciones de insulina en plasma basal.

Además, los componentes de la maca son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica debido a su lipofilia. Algunos estudios han planteado la hipótesis de que ciertas actividades de maca son producidas por la actividad de los componentes lipófilos sobre el SNC. Por ejemplo, los efectos de la maca negra sobre el aprendizaje y la memoria se demostraron en ratas ovariectomizadas y en ratones macho con alteraciones de la memoria inducida por escopolamina. En este estudio, los ratones con deterioro de la memoria se trataron durante 35 días con dos dosis diferentes de ambos extractos acuoso de maca negra (0.5 y 2 g/kg) e hidroalcohólico (0.25 y 1 g/kg). Después del tratamiento, la memoria y el aprendizaje fueron evaluados y el resultado demostró que el extracto de maca mejora la memoria después de la ovariectomía y el tratamiento con escopolamina. Se piensa que la disminución de la actividad de la acetilcolina esterasa en los cerebros de las ratas ovariectomizadas y de las tratadas con escopolamina es el posible mecanismo para la mejora de la memoria¹³.

Los estudios de Pino-Figueroa sobre el extracto de maca¹⁴, han demostrado que tienen efectos neuroprotectores tanto *in vitro* como *in vivo*. *In vitro*, los efectos

neuroprotectores de un extracto de pentano de maca los evaluó en células de neuroblastoma de rata sometidas a peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Las células las pre-trató con vehículo de extracto pentánico de maca a concentraciones que van de 0.5 a 5 $\mu g/ml$ durante una hora antes de la exposición a H_2O_2 (0.3 mM), que causa el daño oxidativo. La viabilidad celular la determinó 24 horas más tarde con el ensayo dimetiltiazol-carboxymethoxypheny-sulfofenilo-tetrazolio (MTS). Como resultado el extracto pentánico demostró una respuesta neuroprotectora dosis dependiente en la que la viabilidad celular se incrementó significativamente en respuesta a concentraciones de extracto a la maca de 1.5 y 5 $\mu g/ml$, en comparación con las células control tratadas con H_2O_2 solamente.

1.5. MACAMIDAS

Las macamidas son compuestos que son estructuralmente similares a los endocannabinoides que tienen efectos neuroprotectores¹⁵. Si bien la macamida aislada con mayor frecuencia en la literatura es la N-bencilpalmitamida, diecinueve de estas macamidas se han identificado en extractos de maca en la última década. Todas las macamidas son N-bencilamidas, algunas son amidas de ácidos grasos saturados (C8 y C15-18), mientras que otras son derivados de los ácidos grasos insaturados comunes C18, ácido oleico, linoleico y linolénico¹⁶.

El sistema endocannabinoide también contiene ligandos o endocannabinoides endógenos como la anandamida (figura I.2) o la araquidonoiletanolamida (AEA), 2-araquidonoilglicerol y palmitoiletanolamida. Los endocannabinoides se sintetizan cuando es necesario para regular la liberación de otros neurotransmisores de forma retrógrada, y sus efectos finalizan por la captación de células mediada por el portador y el metabolismo por varias enzimas hidrolasas. La AEA se hidroliza en ácido araquidónico y etanolamina principalmente por el efecto de la hidrolasa de ácido graso (FAAH), mientras que el 2-AG se degrada principalmente por la monoacilglicerol lipasa. Es importante mencionar que los inhibidores de FAAH poseen efectos farmacológicos como analgesia, antiinflamatorio y neuroprotector¹⁶. Por lo tanto, los autores sostienen que las

macamidas podrían ser usados como indicadores de estandarización y también sus hallazgos farmacológicos podrían establecer la importancia de *Lepidium meyenii*.

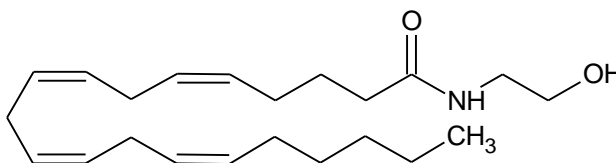


Figura I.2. Estructura química de anandamida (Endocannabinoide).

1.6. PROPIEDADES FARMACOLOGICAS Y MEDICINALES DE LA MACA

En la Universidad Peruana Cayetano Heredia se elaboró una revisión de la literatura científica de la actividad farmacológica de *Lepidium meyenii*, la cual será presentada en la tabla I.5.

Como vemos en la mencionada tabla se muestra las actividades farmacológicas experimentadas en animales que desde el año 2000 hasta la fecha se publicaron en diversas investigaciones, dichos estudios muestran principalmente efectos sobre la actividad sexual, incremento de la calidad y cantidad de esperma, capacidad reproductiva, mejoras en memoria y aprendizaje y su valor nutricional.

Las investigaciones en cuanto a sus propiedades farmacológicas y medicinales de la maca son de continuo estudio y cada vez es más consumida por la población, incrementando la producción comercial en sus diversas presentaciones.

La maca es una planta con un gran potencial como adaptógeno y parece ser prometedora como nutraceutico en la prevención de varias enfermedades, por eso merece mayor valor agregado como producto andino.

Tabla I.3. Propiedades de la maca después de la administración *in vivo*¹⁷.

ESPECIE	PROPIEDADES
Rata	Incremento de la cantidad y motilidad de esperma. Incremento del comportamiento sexual masculino. Efecto Nutricional Efecto Anti estrés Prevención de testosterona hiperplasia de próstata Reversión de osteoporosis Efecto Neuroprotector Protección contra radiación UV, antioxidante, efectos sobre el metabolismo de glucosa y de lípidos.
Ratón	Incremento de comportamiento sexual masculino. Incremento de supervivencia de embriones. Prevención de testosterona hiperplasia de próstata. Incremento de número de crías. Mejoras en memoria y aprendizaje.
Cuy	Incremento de número de crías.
Peces	Nutricional Incremento de supervivencia de embriones.
Ganado	Incremento en calidad y cantidad de esperma
Vacuno	No se demostraron efectos sobre el apareamiento.

2. SISTEMA ENDOCANNABINOIDE

La expresión "endocannabinoide", inicialmente acuñado a mediados de la década de 1990 después del descubrimiento de los receptores de membrana para el principio psicoactivo en Cannabis, $\Delta 9$ -tetrahidrocannabinol y sus ligandos endógenos, ahora indica todo un sistema de señalización que comprende receptores de cannabinoideos, ligandos endógenos y enzimas para biosíntesis e inactivación de ligandos, su identificación ha desencadenado un crecimiento exponencial de los estudios que exploran el sistema endocannabinoide y sus funciones reguladoras en la salud y la enfermedad^{18,19}.

Dichos estudios se han facilitado en gran medida mediante la introducción de antagonistas selectivos de los receptores de cannabinoides e inhibidores del metabolismo y el transporte de los endocannabinoides^{18,19}

3. CULTIVOS CELULARES

3.1. INTRODUCCION

El cultivo de las células humanas es una técnica ampliamente utilizada, que permite el estudio del metabolismo y fisiología humana que no es fácilmente posible *in vivo*. Las alternativas son utilizar cortes de tejido y biopsias, que, aunque conservando la estructura *in vivo*, por lo general tienen que ser utilizados de inmediato debido a su viabilidad celular a corto plazo. Con las células, si es que se pueden aislar a partir del tejido, existe la posibilidad de establecer cultivos de células durante un período de días a semanas.

Las células pueden ser obtenidas a partir de tejido normal (por ejemplo, biopsia de piel), si los procedimientos clínicos y consideraciones éticas lo permiten y también de tejido enfermo (por ejemplo, biopsia del tumor del hígado) eliminado durante la cirugía como parte del tratamiento de los pacientes para su enfermedad. Con el cultivo de células, se puede investigar el comportamiento de los distintos tipos de células sin la influencia de las variaciones sistémicas que puedan surgir durante la homeostasia normal *in vivo*.

El cultivo de células es por lo general en forma de una suspensión de células dispersas tomada de tejido original (por metodología enzimática, mecánica, o la disociación química), un cultivo primario o una línea celular y se lleva a cabo bajo estrictas condiciones de esterilidad y un ambiente controlado de temperatura, gases y presión. Se debe imitar el entorno *in vivo* para que las células sean capaces de sobrevivir y que la proliferación sea de una manera controlada. Aunque el cultivo de células humanas se ha realizado durante muchos años y, a pesar del rápido avance en las técnicas de la biología molecular y técnicas de análisis y ensayos que se pueden utilizar ahora son

muy sensibles, da una necesidad en curso para el cultivo de células de todos los órganos/tejidos del cuerpo humano.

3.2. MEDIO DE CULTIVO

Para conservar las células se deben “cultivar” en Medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés Dulbecco’s modified eagle médium), adicionando un 10% de suero bovino fetal (FBS, por sus siglas en inglés Fetal Bovine Serum) (v/v) y una solución de penicilina-estreptomicina al 1% (v/v). Para su crecimiento deben ser incubadas a 37°C en una atmosfera húmeda con 5% de CO₂¹⁴.

Para los ensayos *in vitro* son usadas aproximadamente entre 1000 a 1000000 células por pozo en platos de 96 pozos, y llegar a ocupar hasta en un 85-90% el volumen del pozo. Ya en este estado, las células pueden ser expuestas a diferentes tipos de agentes nocivos para imitar los mecanismos de acción de lesiones que se cree, ocurren *in vivo*.

3.3. ENSAYOS COMUNMENTE UTILIZADOS

La viabilidad celular es uno de los indicadores indirectos de daño celular, de tal manera que es necesario hacer pruebas preliminares para evidenciar que las drogas a utilizar en los cultivos no produzcan daño celular tal que pueda ser confundido con alguna conclusión del experimento que vaya a realizarse.

Esta puede ser determinada mediante varios métodos: microscopía directa para determinar cambios morfológicos como la forma (esférica o dendrítica) o la longitud de las dendritas; exclusión por tinción es otro procedimiento microscópico para evaluar el número de células viables y no viables, siendo contadas en un hemacitómetro y estimando la viabilidad celular al medir los cambios en la absorbancia o fluorescencia después del tratamiento de las células con reactivos que pueden ser modificados por procesos metabólicos normales en las mismas, dichos métodos fueron utilizados exitosamente en estudios sobre la maca en cuanto a sus efectos neuroprotectores¹⁴.

4. CANCER DE MAMA

4.1. INTRODUCCION

El cáncer de mama se inicia cuando las células del seno comienzan a crecer fuera de control. Estas células normalmente forman un tumor que a menudo se puede ver en una radiografía o la sensación de un bulto. El tumor es maligno (canceroso) si las células pueden crecer e invadir los tejidos circundantes o propagarse (metástasis) a áreas distantes del cuerpo. El cáncer de mama se produce casi exclusivamente en las mujeres, pero los hombres pueden conseguirlo, también. Las células en casi cualquier parte del cuerpo pueden convertirse en cáncer, y pueden extenderse a otras áreas del cuerpo²⁰.

Los cánceres de mama pueden comenzar desde diferentes partes de la mama. La mayoría de los cánceres de mama comienzan en los conductos que llevan leche al pezón (cánceres ductales). Algunos comienzan en las glándulas que producen la leche materna (cánceres lobulares) pero estos son menos comunes. Un pequeño número de cánceres comienzan en otros tejidos de la mama, estos cánceres se llaman sarcomas y linfomas y no son realmente considerados como los cánceres de mama.

Aunque muchos tipos de cáncer de mama pueden causar un bulto en el pecho, no todos lo hacen. También es importante entender que la mayoría de los tumores de seno no son cancerosos, son benignos. Los tumores benignos de mama son crecimientos anormales, pero no se extienden fuera del seno y no son potencialmente mortales. Sin embargo, algunos tumores de seno benignos pueden aumentar el riesgo de contraer cáncer de mama de una mujer. Cualquier bulto en el pecho o el cambio tiene que ser revisado por un médico para determinar si es benigna o cáncer, y si pueden afectar su riesgo de cáncer de futuro.

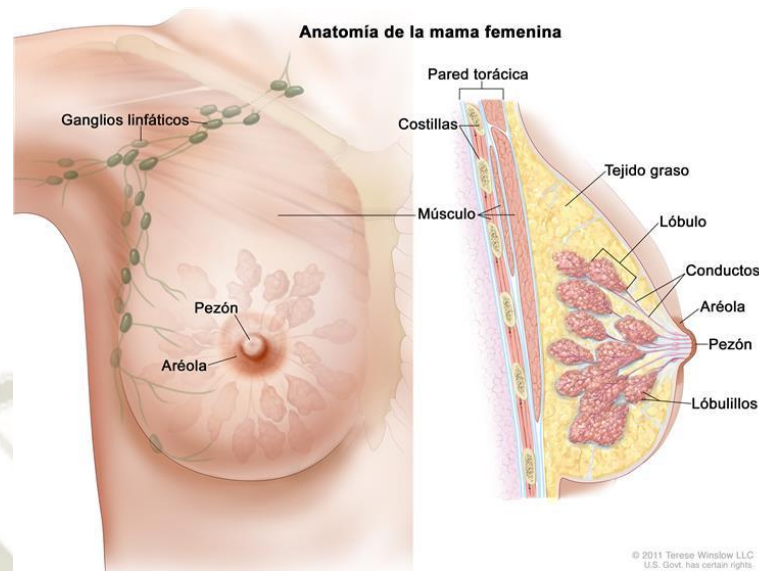


Figura I.3. Anatomía de la mama femenina²¹

4.2. INCIDENCIA Y MORTALIDAD

Cálculo del número de casos nuevos y defunciones por cáncer de mama (solo mujeres) en Estados Unidos en 2016²²:

Casos nuevos: 246.660.

Defunciones: 40.450.

El cáncer de mama es el cáncer extra cutáneo más frecuente en las mujeres estadounidenses; se calcula que, en 2016, se presentarán 61.000 casos de enfermedad in situ, 246.660 casos nuevos de enfermedad invasora y 40.450 defunciones²². Por tanto, menos de 1 de cada 6 mujeres diagnosticadas con cáncer de mama muere por esta enfermedad. En comparación, se estima que cerca de 72.160 mujeres estadounidenses morirán por cáncer de pulmón en 2016²².

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el Perú al año se presentan cerca de 4 mil nuevos casos de cáncer de mama y fallecen alrededor de 4 mujeres diariamente. Esta enfermedad aparece generalmente en mujeres entre los 40 y 50 años y no presenta síntoma en etapa inicial, por ello la importancia de realizarse exámenes preventivos anualmente para evitar la enfermedad, pues el 85% de los casos de cáncer de mama se diagnostican en estadios avanzados y sólo 15% en etapa inicial²³.

4.3. FACTORES DE RIESGO

La edad más avanzada es el factor de riesgo más importante para el cáncer de mama²⁴. Los siguientes son otros factores del cáncer de mama:

- Antecedentes familiares²⁵.
- Susceptibilidad significativa a un factor hereditario^{26,27,28}
- Mutaciones de la línea germinal en los genes BRCA1 y BRCA2 y otros genes que predisponen al cáncer de mama^{29,30,31,32,33}.
- Ingesta de alcohol^{34,35,36}.
- Densidad del tejido mamario (mamográfico)^{35,36}.
- Estrógeno (endógeno)^{37,38,39,40}.
- Antecedentes menstruales (menarquía prematura o menopausia tardía)^{41,42,43}.
- Nuliparidad.
- Edad avanzada en el momento del primer parto.
- Antecedentes de tratamiento hormonal⁴⁴.
- Terapia de remplazo hormonal (TRH) combinada, estrógeno más progesterona^{45, 46, 46, 47, 48}.
- Obesidad^{49, 50}.
- Antecedentes personales de cáncer de mama⁵¹.
- Antecedentes personales de formas proliferativas de enfermedad mamaria benigna^{52, 53, 54, 55, 56, 57, 58}.
- Raza^{59, 60}.

4.4. LÍNEA CELULAR MDA-MB 231

Para el estudio experimental *in vitro* del cáncer de mama la línea celular MDA-MB-231 es una de las más utilizadas. Estas células fueron aisladas por Cailleau y sus colaboradores en 1973, a partir de una muestra de derrame pleural de una paciente con cáncer de mama que falleció de esta enfermedad en el Anderson Hospital (Houston, EEUU)⁶¹. Se ha comprobado que estas células presentan un crecimiento extraordinariamente rápido en medios de cultivo poco enriquecido, en parte por una regulación autocrina a partir de factores de

crecimiento celular que ellas mismas secretan al medio. Poseen abundantes receptores de membrana para el factor de crecimiento epidérmico (EGF), pero paradójicamente no se sobre estimulan con dicho factor⁶². Los estudios bioquímicos y genéticos con estas células han contribuido enormemente a la investigación del cáncer de mama y al desarrollo de fármacos para ayudar a combatirlo.

5. DROGA UTILIZADA

5.1. CELECOXIB

Celecoxib, un inhibidor selectivo de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), se clasifica como es un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE), con una estructura de pirazol sustituida con diario. La inhibición de la síntesis de prostaglandina E2 que (un mediador del dolor) resulta de la inhibición de la COX-2 y ayuda a aliviar los síntomas del dolor. celecoxib se usa para tratar la artritis reumatoide, la osteoartritis y la poliposis adenomatosa familiar (FAP). Debido a su falta de efectos plaquetarios, el celecoxib no es un sustituto de la aspirina para la profilaxis cardiovascular. La inhibición de COX-2 puede dar como resultado apoptosis y una reducción en la angiogénesis y metástasis tumoral⁶³.

El nombre IUPAC asignado es 4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide, de descripción física sólida, color amarillo pálido⁶³.

Celecoxib está indicado para aliviar los signos y síntomas de la artritis reumatoide y la osteoartritis, para el alivio del dolor de la dismenorrea primaria, reducir el número de pólipos colorrectales adenomatosos en pacientes con pólipos adenomatosos familiares, como complemento de la atención habitual, también para el alivio del dolor agudo calificado como moderado a severo, como después de una cirugía dental u ortopédica⁶³.

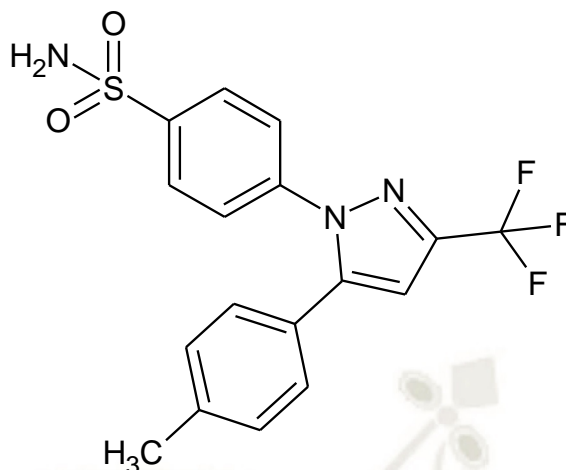


Figura 1.4. Estructura química del celecoxib.

6. CULTIVO CELULAR Y ESTUDIOS

En 1907, cuando Harrison cultivó en un coágulo linfático médula espinal de anfibio, en realidad se trataba de explantes, es decir, fragmentos de tejido cultivados sin la separación celular propia de los cultivos actuales. No es hasta principios de la década de los 70's cuando se depura la técnica de cultivo y se produce una desbordante irrupción de publicaciones cuyos resultados se basan en el cultivo celular. Al igual que en otros tipos de cáncer, los principales conocimientos *in vitro* que tenemos sobre el cáncer de mama se basan en esta técnica. En este apartado nos centramos en resumir los aspectos esenciales de la misma⁶⁴. Muchas veces ocurre que estas células cancerosas pueden crecer sin fijarse a ninguna superficie y proliferan en una placa de cultivo hasta una densidad mucho mayor que las células normales. En ciertos casos estas propiedades de las células neoplásicas pueden inducirse en células normales, transformándolas con un virus o con sustancias químicas mutagénicas, constituyéndose una línea celular transformada.

6.1. LINEAS CELULARES

A pesar de que todas las células de una línea celular son muy similares entre sí, a menudo no son idénticas. La uniformidad genética de una línea celular puede mejorarse con el clonaje celular, mediante el cual se aísla una única célula y se le permite proliferar hasta obtener una colonia de células idénticas.

Esta línea celular transformada es capaz de provocar tumores si es inyectada a un animal de experimentación. Las líneas celulares en cultivo, transformadas o no, tienen gran interés ya que permiten obtener cantidades ingentes de células del mismo tipo y además porque pueden conservarse en nitrógeno líquido a -196°C durante un período indefinido de tiempo, siendo perfectamente viables una vez descongeladas. No obstante, es importante reconocer que las células de ambos tipos de líneas celulares casi siempre difieren de las células progenitoras de los tejidos de las que derivan, y a veces, en características importantes⁶⁴.

6.2. MEDIO DE CULTIVO

El medio de cultivo constituye el medio extracelular en condiciones *in vitro* y contiene los nutrientes necesarios para la proliferación de las células, permitiendo a la célula un constante intercambio de moléculas y electrólitos. Para cultivos rutinarios es frecuente utilizar medios líquidos que contienen sales, glucosa, aminoácidos, vitaminas y, muchas veces, proporciones mal definidas de macromoléculas en forma de suero de caballo, suero fetal de ternera, etc. Evidentemente estos medios son inadecuados para estudiar las necesidades de macromoléculas que un tipo celular determinado tiene para proliferar y funcionar normalmente. Esto ha conducido al desarrollo de medios definidos químicamente y libres de suero⁶⁴.

6.3. VIABILIDAD CELULAR Y MTS

El ensayo de viabilidad celular ha ganado mucha atención como una alternativa al uso de animales. Es útil, por ejemplo, para seleccionar una gran cantidad de productos químicos para determinar su citotoxicidad en diversas células. También se ha usado en la quimioterapia contra el cáncer para seleccionar un medicamento contra el cáncer y su dosis⁶⁵. MTS Es un ensayo colorimétrico para evaluar la actividad metabólica celular, (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -5-(3-carboximetoxifenil) -2-(4-sulfofenil) -2H-tetrazolio), en presencia de metosulfato de fenacina (PMS), produce un formazan producto que tiene un máximo de absorbancia a 490 nm en solución salina tamponada con fosfato⁶⁶.

CAPITULO II PLANTEAMIENTO OPERACIONAL

1. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

1.1. UNIDADES BIOLÓGICAS

Se utilizó la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231 (ATCC®), esta se encontró almacenada a -200°C en una cámara de nitrógeno líquido en los laboratorios de investigación de Massachusetts College of Pharmacy and Health Science University, Boston, USA.

La muestra biológica se reconstituyó por incubación en medio de cultivo a condiciones adecuadas para su proliferación.

1.2. MATERIAL Y REACTIVOS

Para la realización de este trabajo de investigación se:

- Una cámara de flujo laminar de presión positiva (Esco®, Class II Type A2)
- Microscopio invertido (Olympus®, CKX31)
- Celulómetro o contador de células (Nexcelum BioScience®, AutoT4)
- Espectrofotómetro con lector de 96 celdas (Biotek Synergy HT)

Los reactivos usados en la presente investigación fueron:

- Solución de trypan blue
- Buffer fosfato salino.

- Medio Dulbecco Modified Eagle (DMEM)
- Tripsina-EDTA
- Suero fetal de bovino (FBS)
- MTS-assay fueron obtenidos de ATCC®.
- Celecoxib obtenido de Sigma-Aldrich Co.
- Kit de ensayo de inhibición de la FAAH de Cayman Chemical Co.

Se utilizó así mismo las macamidas sintetizadas *N*-(3-methoxybenzyl)-palmitamida (figura II.1) y *N*-(3-methoxybenzyl)-tetradecanamida (figura II.2) proporcionadas por Alejandro Pino-Figueroa, PhD. Estas macamidas se encontraban almacenadas en los laboratorios de investigación de postgrado en Massachusetts College of Pharmacy and Health Science University, Boston, USA.



Figura II.1. Estructura química de *N*-(3-methoxybenzyl)-palmitamida(HW-79)

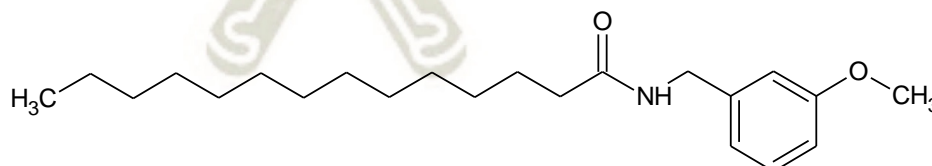


Figura II.2. Estructura química de *N*-(3-methoxybenzyl)-tetradecanamida (HW-91)



Figura II.3. Cámara de flujo laminar (Esco®, Class II Type A2)

1.3. LUGAR DE INVESTIGACION

La investigación se realizó en los laboratorios de post-grado de School of Pharmaceutical Sciences de Massachusetts College and Health Science University (MCPHS University), Boston, USA.

1.4. METODOLOGIA Y ANALISIS

1.4.1. PREPARACION DE LAS DROGAS UTILIZADAS

A. PREPARACION DE LA SOLUCION STOCK DE HW-91, (PM 348 g/mol).

Se disolvió 10 mg de HW-91 en 2.66 ml de DMSO para obtener la disolución de la droga obteniéndose la concentración de 10 mM. (mmol/L)

$$\frac{10 \text{ mg}}{2.66 \text{ mL}} \times \frac{1 \text{ mmol}}{348 \text{ mg}} \times \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = 10 \text{ mM}$$

A partir solución stock preparada anteriormente cuya concentración es de 10 mM se preparó soluciones para elaborar los ensayos requeridos. Las concentraciones usadas fueron de 1, 3, 10 y 30 μM . La siguiente ecuación esquematiza la dilución.

$$10\ 000 \ \mu\text{M} \times X \ (\text{mL de solución}) = \text{Concentración deseada} \ (\mu\text{M}) \times 2 \ \text{mL}$$

Las soluciones se realizan de igual forma en DMSO por lo que se calcula la cantidad a agregar necesaria.

B. PREPARACION DE LA SOLUCION STOCK DE HW-79, (PM 376 g/mol).

Se disolvió 10 mg de HW-79 en 2.87 ml de DMSO para obtener la disolución de la droga obteniéndose la concentración de 10 mM. (mmol/L)

$$\frac{10 \text{ mg}}{2.87 \text{ mL}} \times \frac{1 \text{ mmol}}{376 \text{ mg}} \times \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = 10 \text{ mM}$$

A partir solución stock preparada anteriormente cuya concentración es de 10 mM se preparó soluciones para elaborar los ensayos requeridos. Las concentraciones usadas fueron de 1, 3, 10 y 30 μM . La siguiente ecuación esquematiza la dilución.

$$10 \text{ 000 } \mu\text{M} \times X \text{ (mL de solución)} = \text{Concentración deseada (}\mu\text{M)} \times 2 \text{ mL}$$

Las soluciones se realizan de igual forma en DMSO por lo que se calcula la cantidad a agregar necesaria.

C. PREPARACION DE LAS SOLUCIONES DE CELECOXIB (PM 381.37 g/mol)

Se disolvió 25 mg de celecoxib en 6.55 ml de DMSO para obtener la disolución de la droga obteniéndose la concentración de 10 mM. (mmol/L)

$$\frac{25 \text{ mg}}{6.55 \text{ mL}} \times \frac{1 \text{ mmol}}{381.37 \text{ mg}} \times \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = 10 \text{ mM}$$

A partir solución stock preparada anteriormente cuya concentración es de 10 mM se preparó soluciones para elaborar los ensayos requeridos. Las concentraciones usadas fueron de 3, 10, 30 y 100 μM . La siguiente ecuación esquematiza la dilución.

$$10\ 000\ \mu\text{M} \times X\ (\text{mL de solución}) = \text{Concentración deseada}\ (\mu\text{M}) \times 2\ \text{mL}$$

Las soluciones se realizan de igual forma en DMSO por lo que se calcula la cantidad a agregar necesaria.

1.4.2. PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

La preparación de los medios de cultivo para las líneas celulares se realizó en una cámara de flujo laminar esterilizada, todos los medios de cultivo utilizados fueron de la casa ATCC®, en presentación de 500 mL, de los frascos se retiró 50 mL del medio y se agregó 50 mL de FBS para enriquecer los medios, además se añadió 5 mL de antibiótico (penicilina/estreptomina) para mantener los medios estériles.

1.4.3. CULTIVO CELULAR

El proceso de cultivo celular se realizó en condiciones estériles en una cámara de flujo laminar de presión positiva y se evitó la proliferación microbiana usando etanol al 70%.

Se trabajó con una línea celular MDA-MB 231 correspondiente a adenocarcinoma de mama humano, almacenada en una cámara de nitrógeno líquido a -200°C . Se adecuó la temperatura para poder alcanzar una temperatura ambiente de 37°C mediante baño maría y se procedió a incubar en un frasco de 40 mL con medio Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) adicionado con 10% de suero fetal de bovino (FBS).

La incubación se realizó a temperatura de 37°C y una atmósfera de 5% de CO_2 . Luego de cuatro a cinco días, se comenzó a evidenciar el desarrollo de las células mediante la formación de sus dendritas, a esta etapa se le denomina primer pasaje a partir del cual se pueden realizar nuevos pasajes.



Figura II.4. Estufa de incubación

Para realizar nuevos pasajes, se desechó el medio que contenía el frasco de incubación con el primer pasaje. Las células estaban adheridas a la base del frasco debido a que producen colágeno, con el fin de desprender las células se agrega 5 mL de Tripsina-EDTA y se realizó una ligera agitación para luego desechar el líquido. Luego de ello, adicionamos nuevamente 5 mL de Tripsina-EDTA y se deja incubando a 37°C en una atmosfera de 5% de CO₂ por un intervalo de tiempo entre 10 a 12 minutos agitando cada 3 minutos.

En este proceso vemos el desprendimiento de las células que se evidencia como una película grasa suspendida en el frasco. Luego de realizada la incubación se agregó 10 mL de medio DMEM sin FBS adicionándolo al contenido del frasco de incubación, se realiza una pequeña agitación y se transfiere a un tubo de 50 mL para centrifugarlo a 1000 rpm por 5 minutos. De evidencia la formación de un pellet (precipitado de células) en el fondo del tubo, luego se procede a remover el medio sobrenadante y se agregó 10 mL de medio DMEM con 10% de FBS, se realiza una agitación para que el pellet se pueda mezclar con el medio, a esto se denomina suspensión de células.

1.4.4. CONTEO DE CELULAS VIABLES

Se sacó 20 µL de la suspensión de células y esta cantidad se colocó en un tubo eppendorf mezclando con 20 µL de solución de tripan blue. De esta mezcla se colocó 20 µL en una celda para conteo.

El contador de células (Celulómetro) fue configurado para el conteo de células MDA-MB 231, entonces se colocó la celda para conteo dentro del celulómetro. Finalmente, el equipo determinó el número de células por mL de medio y el porcentaje de viabilidad.

Una cantidad óptima de células para poder realizar ensayos es de 1×10^6 células/mL con una viabilidad mayor del 95%.

1.4.5. SOLUCIONES A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE LAS MACAMIDAS

Se utilizaron dos principios activos aislados de la maca (*Lepidium meyenii*), los cuales fueron *N*-(3-methoxybenzyl)-palmitamida y *N*-(3-methoxybenzyl)-tetradecanamida, conocidos como HW-79, HW-91 respectivamente.

A partir de soluciones de 10 mM se prepararon 2 mL de cada dilución a distintas concentraciones: 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M, 30 μ M, con 10% DMSO, luego se añadió 1 800 μ L 75% de PBS y 25% de PEG.

Se extrajo un volumen de 20 μ L de cada una de las diluciones preparadas anteriormente. Las concentraciones de las diluciones vertidas en cada uno de los pocillos de 200 μ L, fueron diluidas nuevamente obteniendo las concentraciones finales en el pocillo de 10 μ L, 30 μ L, 100 μ L y 300 μ L.

1.4.6. EFECTO DE HW-91 Y HW-79 EN COMBINACION CON CELECOXIB SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR

Para evaluar el efecto tanto de HW-91 y HW-79 sobre la viabilidad celular se tomó la cantidad necesaria de la suspensión celular para obtener un total de 10 000 células por cada pocillo, completándose con el medio hasta 180 μ L y finalmente se completó con 20 μ L de las concentraciones, 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M, 30 μ M, de HW-91 y HW79.

El procedimiento para evaluar el efecto del celecoxib, igualmente se tomó la misma cantidad de células completando los pocillos con 180 μL de medio y 20 μL de celecoxib a 1 μM , 3 μM , 10 μM , 30 μM de concentraciones.

En cuanto al efecto tanto de HW-91 y HW-79 en combinación con el celecoxib, se preparó 2 mL de una dilución que contenía 1800 μL solución vehículo, 20 μL de la macadamida respectiva, celecoxib a diferentes volúmenes (6 μL , 20 μL , 60 μL y 180 μL) completando el volumen a 2 mL con DMSO, se trabajó con la misma cantidad de células en los pocillos, adicionando 20 μL de la disolución preparada completando el volumen del pocillo con DMSO.

Para los grupos control se desarrolló el mismo procedimiento a excepción de la adición de las macamidias y celecoxib, según sea el caso, el volumen del pocillo se completó con el medio. Se dejó incubar por 24, 48 y 72 horas a 37°C con una atmosfera de 5% de CO₂.

1.4.7. VIABILIDAD CELULAR MTS FRENTE AL TRATAMIENTO

Pasado el tiempo de incubación, se adicionó 10 μL de la solución de MTS a cada pocillo. Este reactivo tiene un compuesto de tetrazolio [3-(4,5-dimetil-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS) y se incubó por 3 horas más, el MTS fue reducido por las células vivas formando el producto formazán obteniéndose una coloración azulada en el medio.

Luego de la incubación se llevó la placa al espectrofotómetro, donde se midió la absorbancia a 490 nm, la absorbancia es directamente proporcional al número de células vivas, es decir la viabilidad celular es proporcional a la cantidad de formazán⁶⁷.

1.4.8. METODO FAAH

Se prepararon los stocks de 10 mM de las HW-91 y HW-79, luego se prepararon 2 000 uL de las siguientes diluciones, 3 μ M, 10 μ M y 30 μ M de cada una, agregando 6 μ L, 20 μ L, 60 μ L a cada pocillo respectivamente y se determinó el efecto en la inhibición del FAAH. Para la preparación del ensayo FAAH, tal como muestra el protocolo⁶⁸, con las concentraciones anteriores.

2. ESTRATEGIA DE RECOLECCION DE DATOS

2.1. ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados fueron expresados como promedio del porcentaje de la viabilidad celular \pm SEM. Además, se realizó un análisis de varianza de una vía (one-way ANOVA) con post-hoc test de Tuckey con un nivel de confianza de 95 %, utilizando el software SigmaPlot 12.0 y Statgraphics Centurion XV.

CAPITULO III RESULTADOS Y DISCUSION

1. PREPARACION DE LAS SUSTANCIAS UTILIZADAS

1.1. PREPARACION DE LA SOLUCION STOCK DE HW-91, (PM 348 g/mol).

Se utilizó la preparación de la solución stock mencionada en el capítulo II de éste trabajo de investigación, y se prepararon las concentraciones mostradas en la tabla III.1

Tabla III.1. Soluciones de HW-91.

CONC. DESEADA (μM)	μL DE SOL. STOCK (10 mM)	μL DE DMSO
1	2 μL	1998
3	6 μL	1994
10	20 μL	1980
30	60 μL	1940

Fuente: Elaboración propia

1.2. PREPARACION DE LA SOLUCION STOCK DE HW-79 (PM 376 g/mol).

La solución stock mencionada en el capítulo II se utilizó para realizar las siguientes diluciones mencionadas en la tabla III.2.

Tabla III.2. Soluciones de HW-79.

CONC. DESEADA (μM)	μL DE SOL. STOCK (10 mM)	μL DE DMSO
1	2 μL	1998
3	6 μL	1994
10	20 μL	1980
30	60 μL	1940

Fuente: Elaboración propia

1.3. PREPARACION DE LAS SOLUCIONES DE CELECOXIB (PM 381.37 g/mol)

Como se muestra en el capitulo II, se realizó la preparación de la solución stock de celecoxib, para luego realizar las siguientes disoluciones mostradas en la tabla II.3.

Tabla III.3. Soluciones de celecoxib

CONC. DESEADA (μM)	μL DE SOL. STOCK (10 mM)	μL DE DMSO
3	6 μL	1994
10	20 μL	1980
30	60 μL	1940
100	200 μL	1800

Fuente: Elaboración propia

2. CULTIVO CELULAR

La línea celular en estudio fue el adenocarcinoma MDA-MB-231 (ATTC®), dicha línea celular tiene las siguientes características: adenocarcinoma, perteneciente a una mujer de 51 años de edad, tejido de glándula mamaria / mama, derivado del sitio metastásico: derrame pleural. En la figura III.1 se puede observar el crecimiento y desarrollo de MDA-MB-231 luego de 2 días de incubación. Pasados los días se nota la confluencia de 80% - 90% óptima para realizar pasajes⁶⁹.

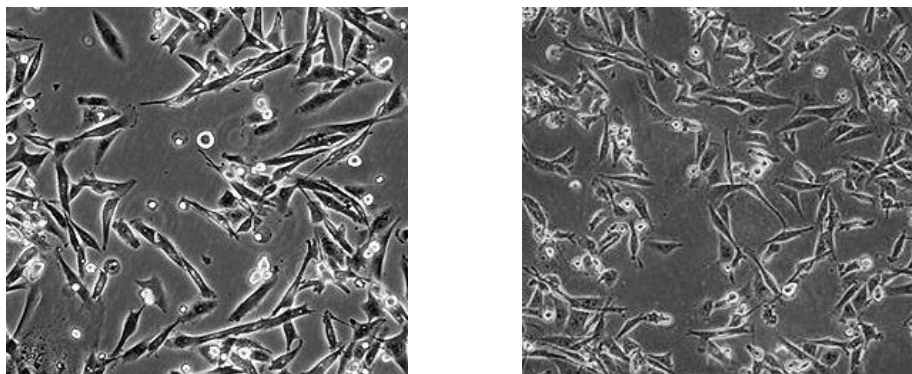


Figura III.1. Adenocarcinoma MDA-MB-231 Después de 2 días de desarrollo (izquierda, baja densidad), después de 4 días de desarrollo (derecha, alta densidad). Fuente: ATCC®.

3. CONTEO DE CELULAS VIABLES

Para realizar el conteo de células viables se necesitó de azul de tripan, colorante que ayudó en la evaluación de viabilidad celular. Aquellas células que no contengan su membrana celular íntegra no serán teñidas por el colorante; en cuanto al conteo se realizó en un Celulómetro, obteniendo el número de células tanto vivas como muertas.

4. EFECTO DE HW-91 Y HW-79 SOBREVIVABILIDAD CELULAR

Se realizaron los ensayos de viabilidad celular utilizando MTS, método ya mencionado en el capítulo II, se realizaron pruebas por triplicado, cabe resaltar que se realizaron ensayos a las 24 horas, 48 horas y 72 horas, obteniendo los siguientes resultados:

4.1. EFECTO DE HW-91 SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR

En la figura III.2, muestra que existe una diferencia estadística significativa ($p < 0.001$) de viabilidad celular, entre el grupo control y la concentración de 1 μM y 30 μM , las demás concentraciones no muestran diferencias significativas frente al grupo control pasadas las 24 horas de exposición (Anexo, Tabla IV.1).

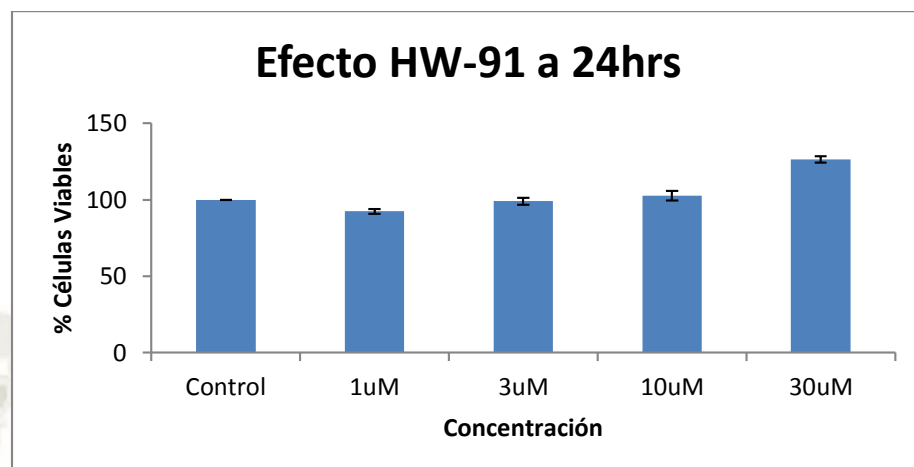


Figura III.2. Efecto de HW-91 sobre la viabilidad celular – 24 hrs.

A las 48 horas de exposición, se observa en la figura III.3 diferencia estadística significativa entre el grupo control y las concentraciones de 1 μ M, 3 μ M y 30 μ M, siendo 10 μ M semejante al grupo control.

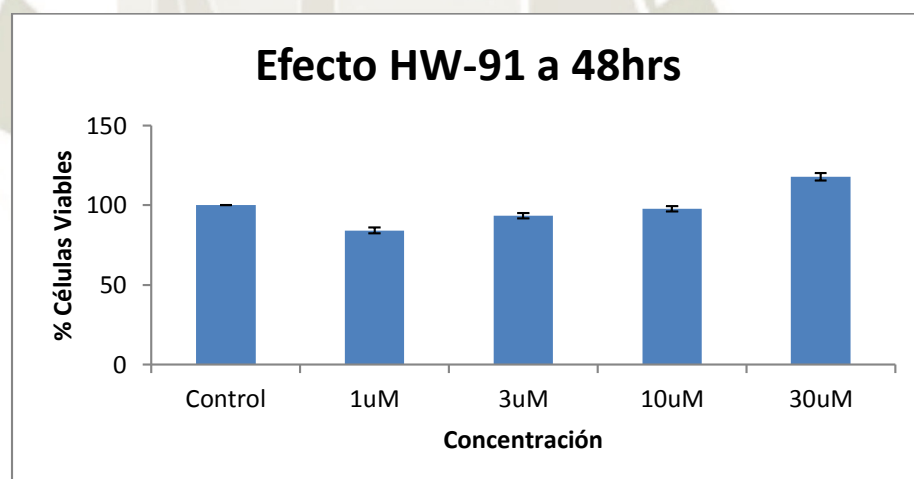


Figura III.3. Efecto de HW-91 sobre la viabilidad celular – 48 hrs.

Pasadas las 72 horas de exposición, se observa en la figura III.4 la diferencia significativa entre el grupo control y todas las concentraciones, notándose que la viabilidad que se mantenía sin diferencia significativa a 30 μ M, en las anteriores figuras, pasadas las 72 horas si existe la diferencia estadística.

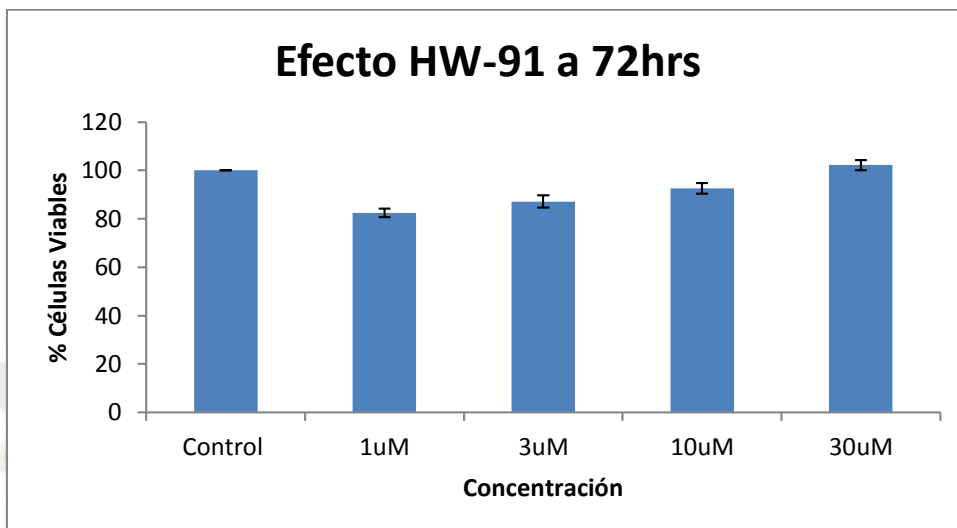


Figura III.4. Efecto de HW-91 sobre la viabilidad celular – 72 hrs.

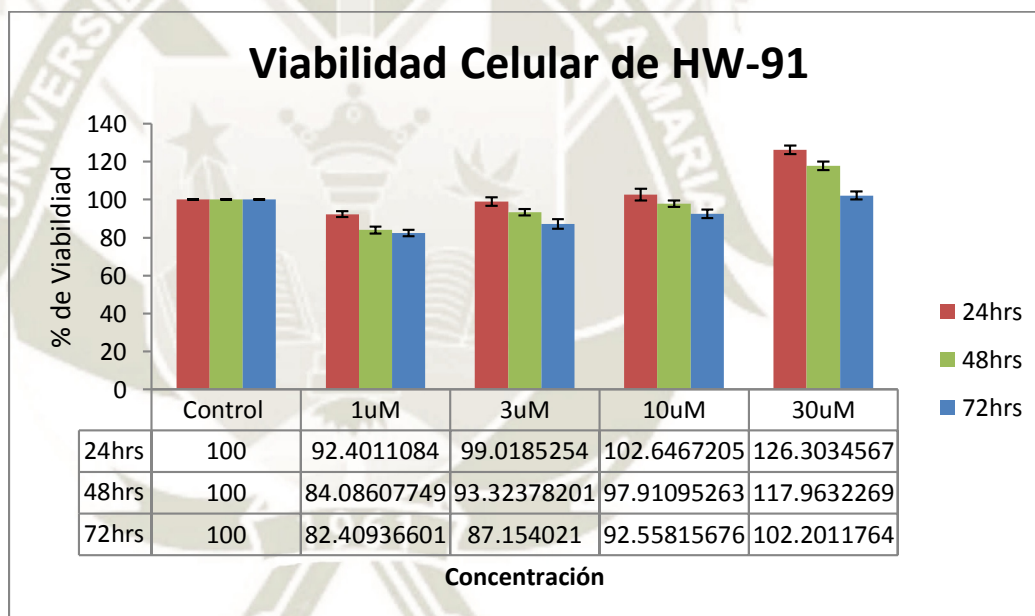


Figura III.5. Efecto de HW-91 sobre la viabilidad celular –24hrs, 48 hrs y 72 hrs.

En la figura III.5, se observa en resumen la comparación entre las horas de exposición, la viabilidad celular y las concentraciones, analizando que a las 72 horas es cuando se nota con mayor facilidad la disminución de la viabilidad celular.

4.2. EFECTO DE HW-79 SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR

En la figura III.6, se observa que a 30 μM no existe diferencia estadística significativa ($p < 0.001$) frente al grupo control, notándose que aumenta la viabilidad celular en 24 horas de exposición

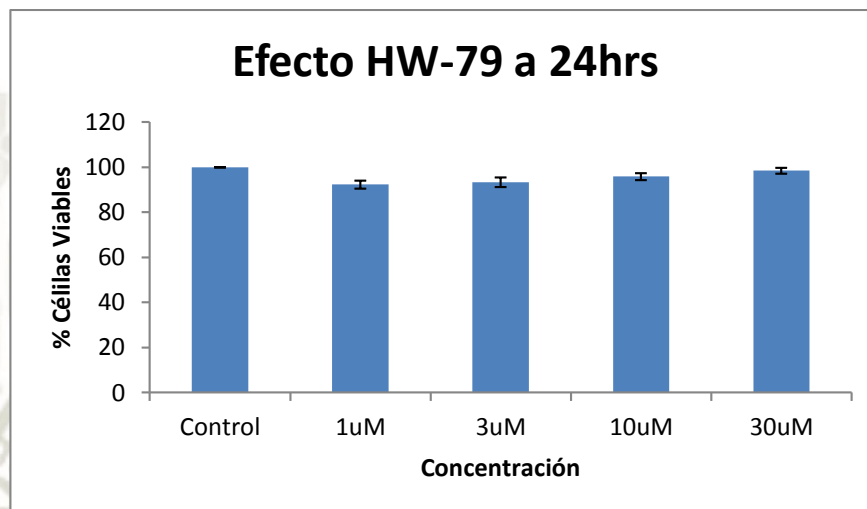


Figura III.6. Efecto de HW-79 sobre la viabilidad celular – 24 hrs.

Pasadas las 48 horas y 72 horas de exposición se observa en las figuras III.7 y III.8 respectivamente, la diferencia estadística significativa frente al grupo control existe con todas las concentraciones.

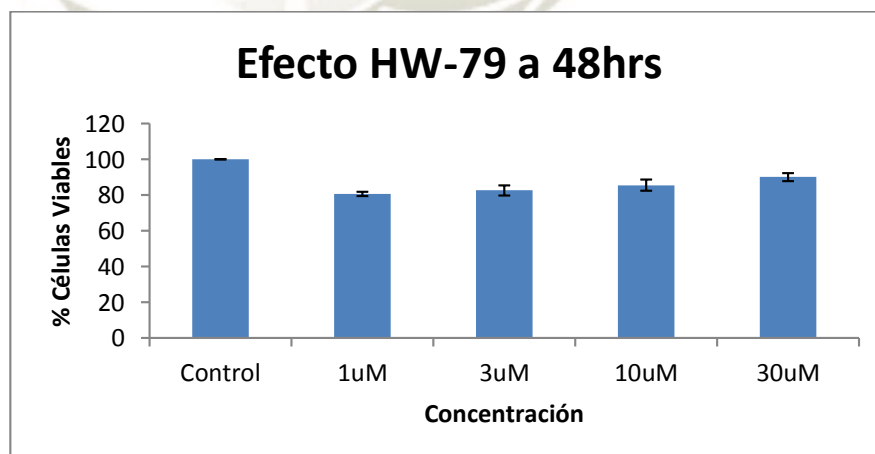


Figura III.7. Efecto de HW-79 sobre la viabilidad celular – 48 hrs.

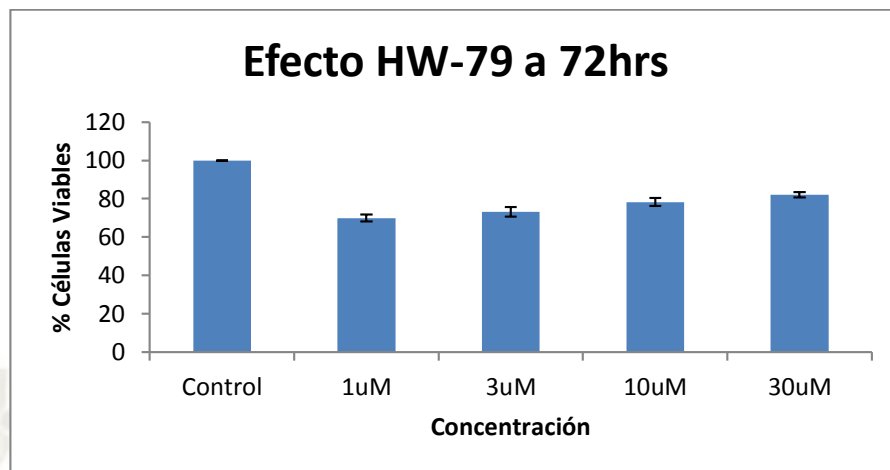


Figura III.8. Efecto de HW-79 sobre la viabilidad celular – 72 hrs.

En la figura III.9, se muestra como con el aumento de exposición frente a la macamida, existe disminución de viabilidad, exceptuando la concentración de 30 μ M que en vez de disminuir aumenta la proliferación celular.

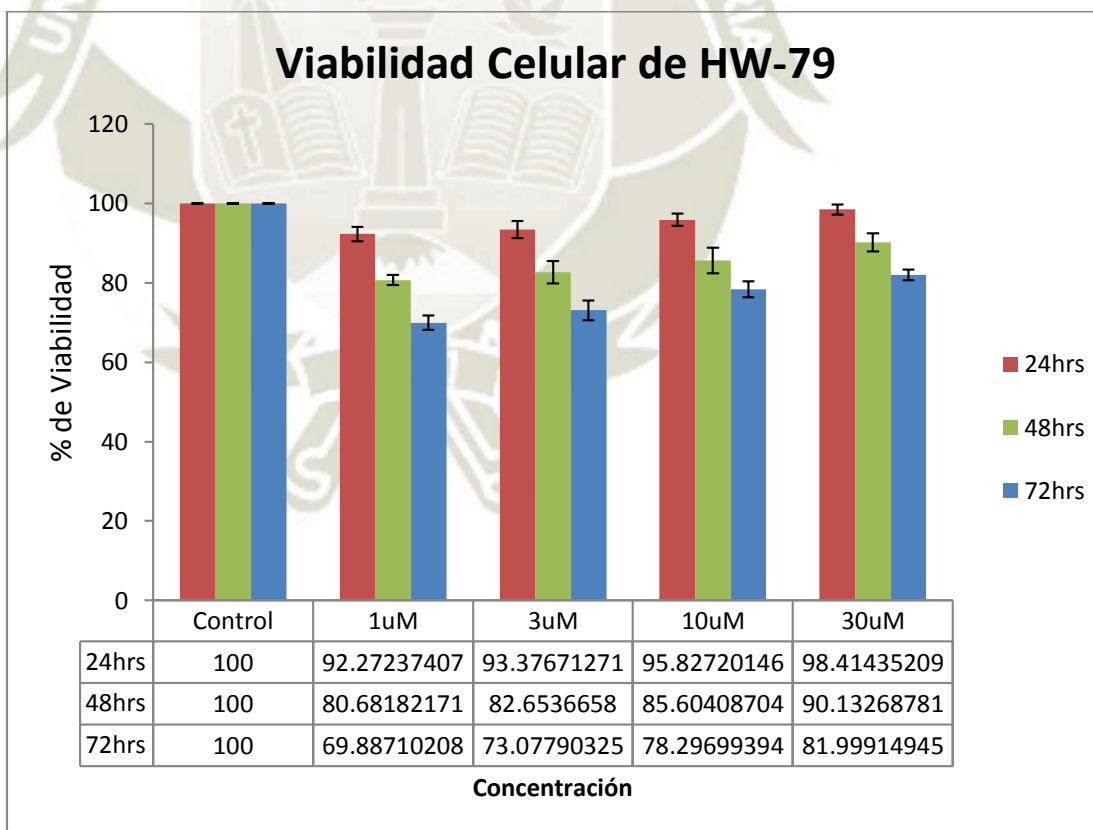


Figura III.9. Efecto de HW-79 sobre la viabilidad celular –24 hrs, 48 hrs y 72 hrs.

4.3. EFECTO DE CELECOXIB SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR

Luego de una exposición de 24 horas podemos observar que existe diferencia significativa estadística ($p < 0.001$) entre el grupo control y 3 μM , 10 μM , 30 μM y 100 μM , es decir en todas las concentraciones como se observa en la figura III.10.

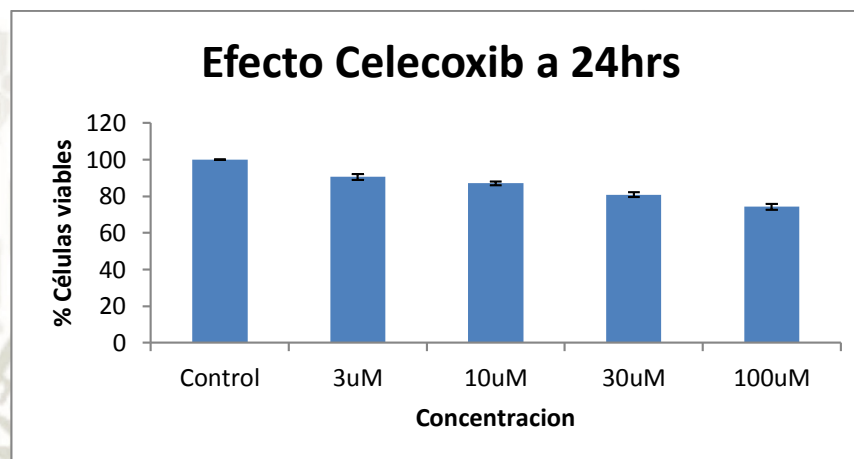


Figura III.10. Efecto del celecoxib sobre la viabilidad celular – 24 hrs.

Al igual que en las 24 horas, las figuras III.11 y III.12 tienen el mismo comportamiento, vemos que pasadas las 48 horas y 72 horas respectivamente, existe diferencia significativa entre el grupo control y las concentraciones trabajadas, observando así la disminución de la viabilidad celular a medida que va aumentando la concentración del tratamiento.

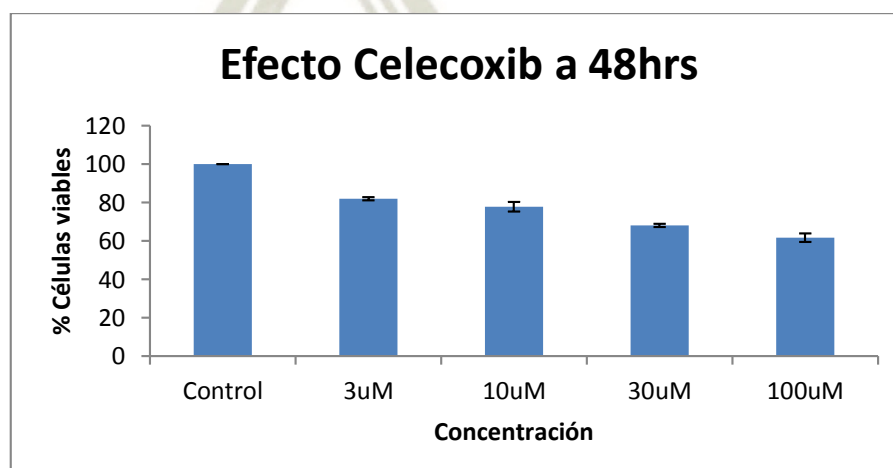


Figura III.11. Efecto de celecoxib sobre la viabilidad celular – 48 hrs.

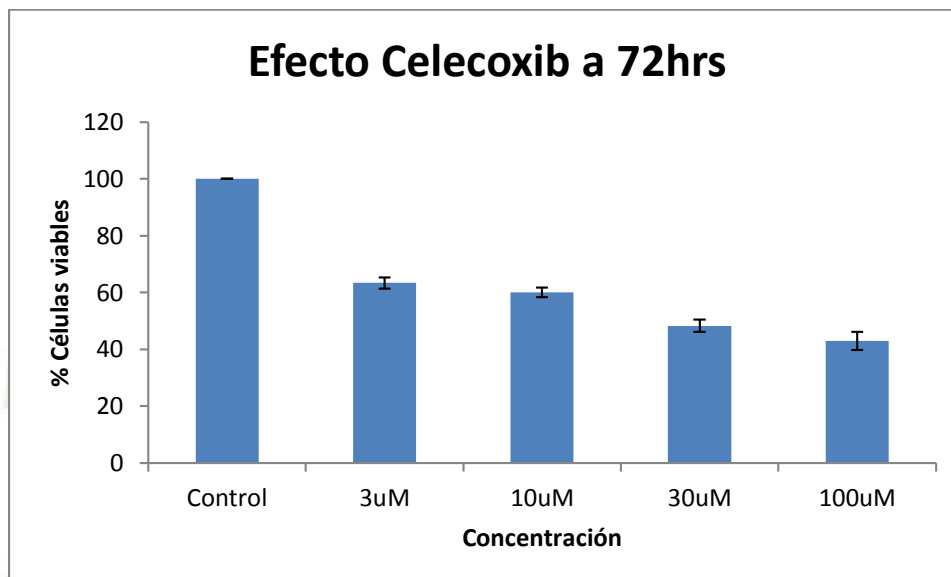


Figura III.12. Efecto de celecoxib sobre la viabilidad celular – 72 hrs.

En la figura III.13, se observa como el efecto del celecoxib sobre la viabilidad celular a las 24 horas, 48 horas y 72, horas, disminuyen cuando la concentración aumenta, existiendo diferencias significativas frente al grupo control

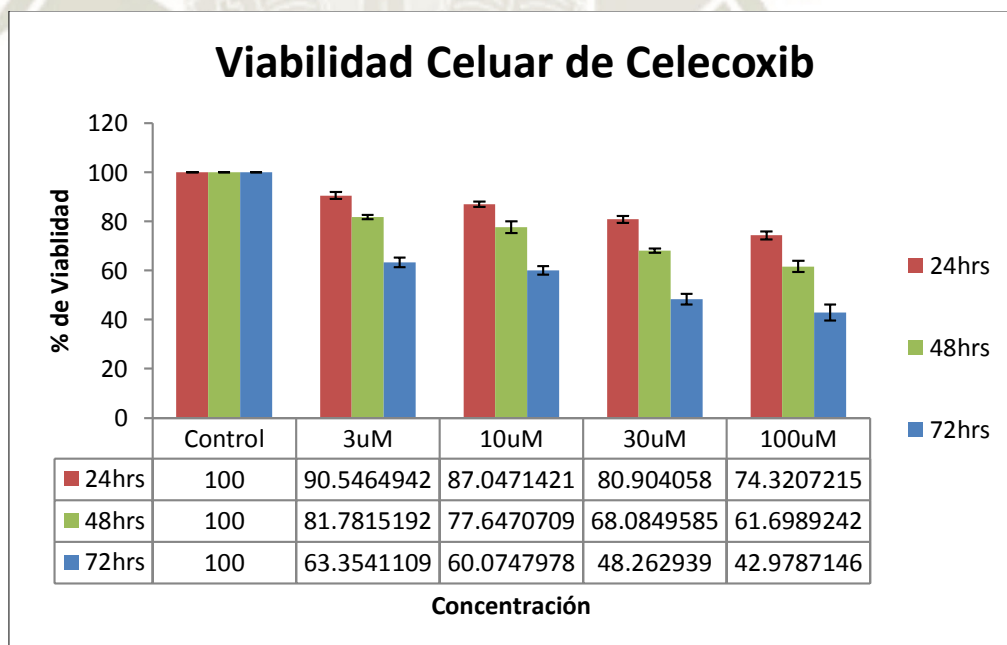


Figura III.13. Efecto de celecoxib sobre la viabilidad celular –24hrs, 48 hrs y 72 hrs.

4.4. EFECTO DE HW-91 EN COMBINACION CON CELECOXIB SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR

En la figura III.14, se observa como la viabilidad celular disminuye estadísticamente significativa frente al grupo control, existiendo diferencias estadísticas significativas con todas las concentraciones. Igualmente, a las 48 horas y las 72 horas.

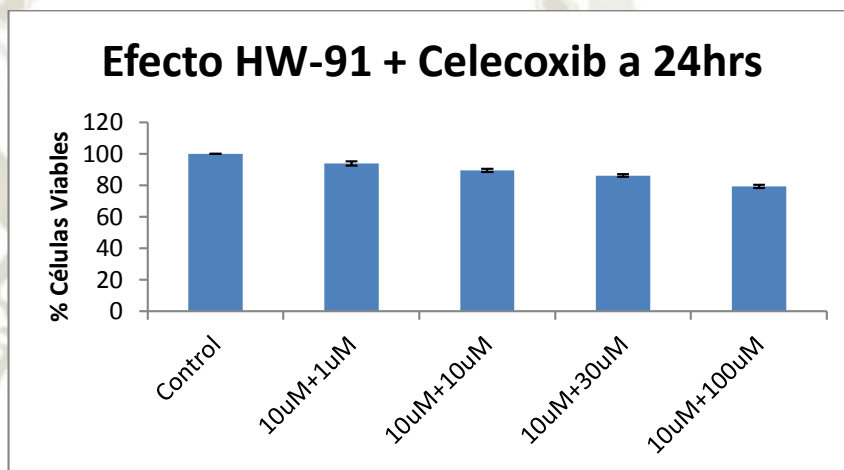


Figura III.14. Efecto de HW-91 en combinación con celecoxib sobre la viabilidad celular –24hrs

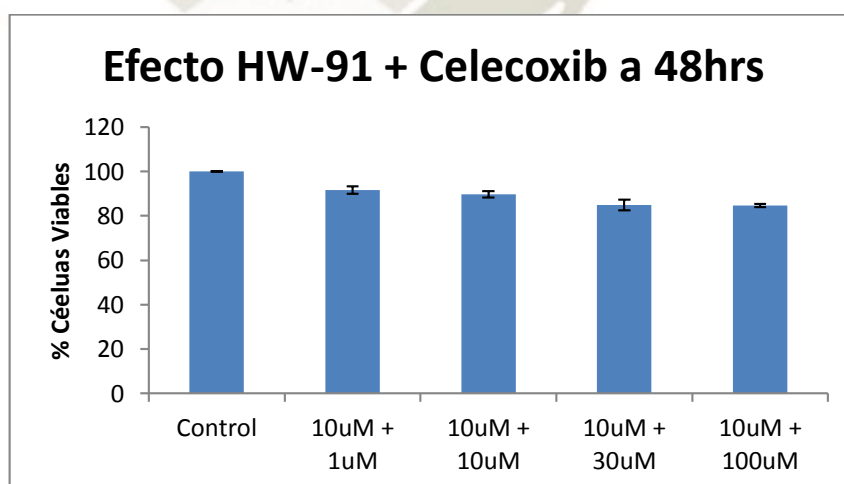


Figura III.15. Efecto de HW-91 en combinación con celecoxib sobre la viabilidad celular –48hrs

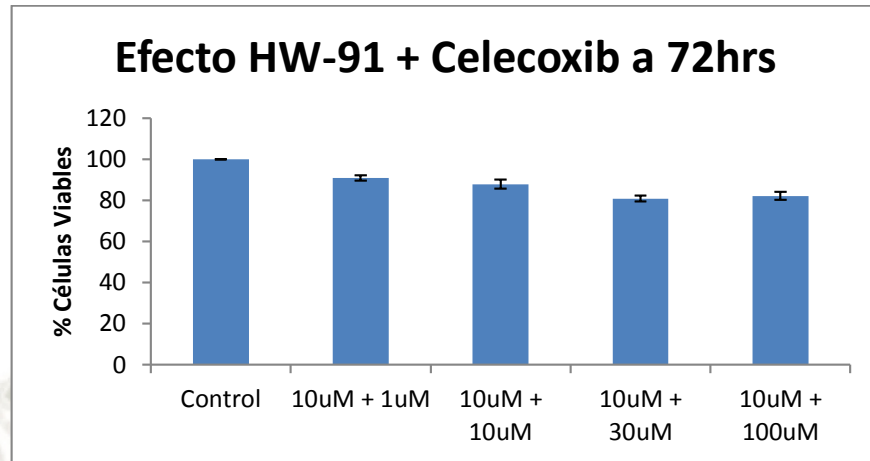


Figura III.16. Efecto de HW-91 en combinación con celecoxib sobre la viabilidad celular –72hrs

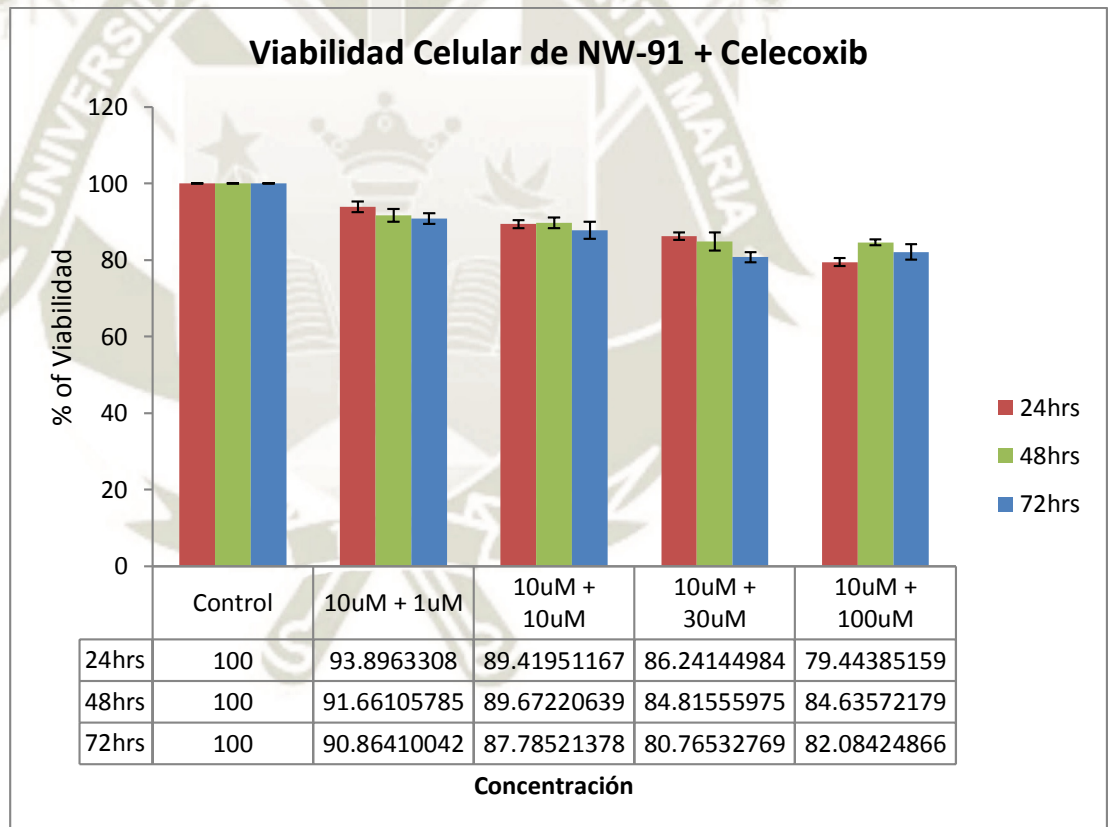


Figura III.17. Efecto de HW-91 en combinación con celecoxib sobre la viabilidad celular –24, 48 y 72hrs

4.5. EFECTO DE HW-79 EN COMBINACION CON CELECOXIB SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR

En las figuras III.18, III.19 y III.20, a 24 horas, 48 horas y 72 horas respectivamente, se evidencia la disminución de la viabilidad celular estadísticamente significativa frente al grupo control con todas las concentraciones.

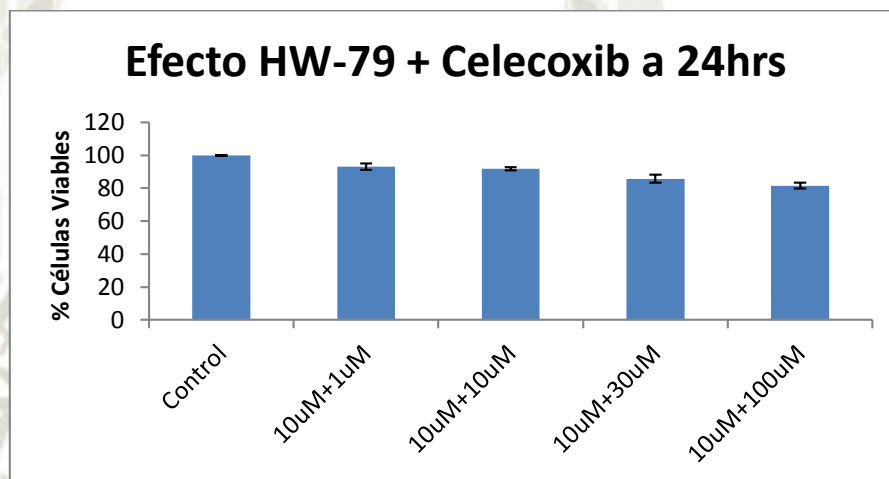


Figura III.18. Efecto de HW-79 en combinación con celecoxib sobre la viabilidad celular –24hrs

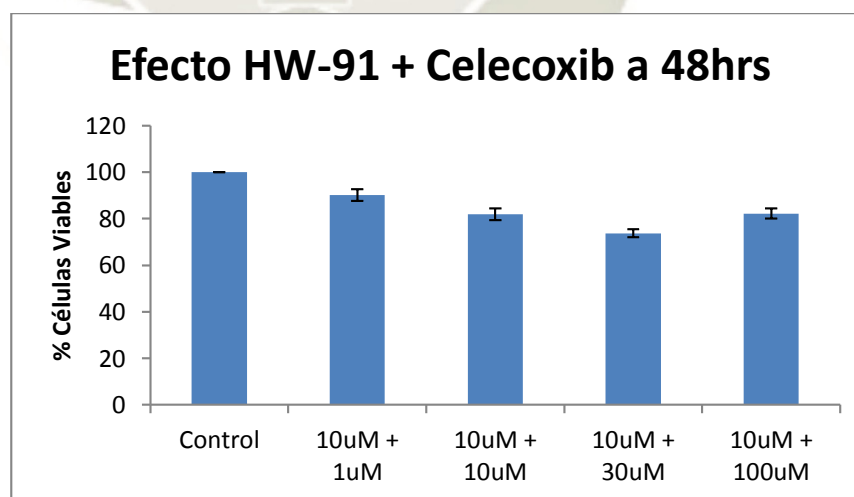


Figura III.19. Efecto de HW-79 en combinación con celecoxib sobre la viabilidad celular –48hrs

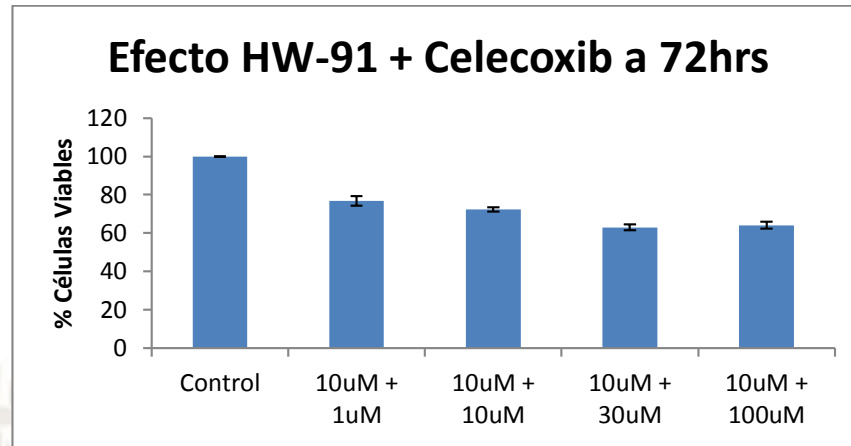


Figura III.20. Efecto de HW-79 en combinación con celecoxib sobre la viabilidad celular –72hrs

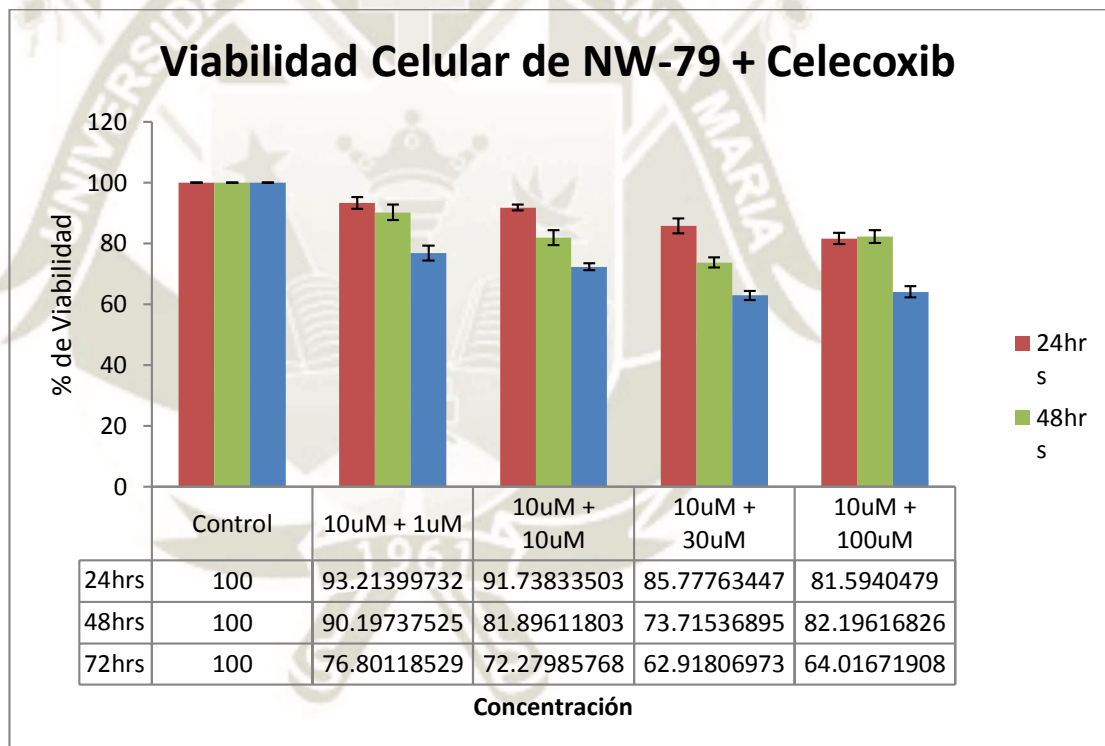


Figura III.21. Efecto de HW-79 en combinación con celecoxib sobre la viabilidad celular –24, 48 y 72hrs

4.6. COMPARACIÓN DEL EFECTO DE CELECOXIB, MACAMIDA HW-91 EN COMBINACION CON CELECOXIB Y MACAMIDA HW-79 EN COMBINACION CON CELECOXIB SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR A LAS 72HRS

En la figura III.22 se evidencia que existe diferencia estadística significativa entre la comparación de los grupos, después de las 72 horas de exposición. El primer grupo corresponde a sólo celecoxib, el segundo la combinación de celecoxib y HW-79 y el tercero a la combinación de celecoxib y HW-91 sobre la viabilidad celular. Esto evidencia que el efecto del celecoxib muestra disminución en la viabilidad celular, sin embargo en combinación con las dos macamidas su efecto disminuye y se expresa en una mayor viabilidad celular, en especial con la combinación de HW-91 y celecoxib donde existe mayor viabilidad celular (más del 80%), logrando evidenciar proliferación de células cancerosas.

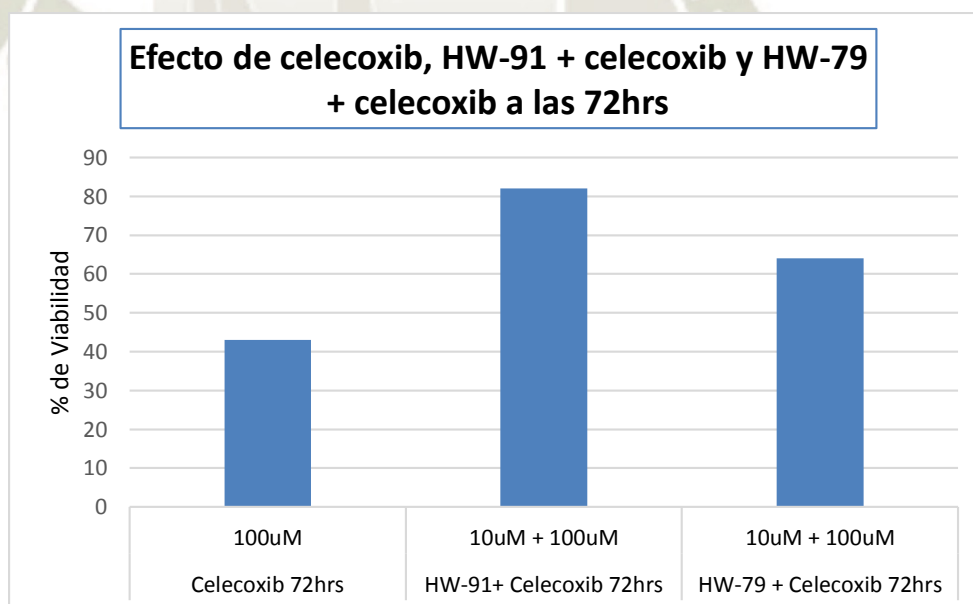


Figura III.22. Efecto de celecoxib, HW-91 + celecoxib y HW-79 + celecoxib sobre la viabilidad celular –72hrs

5. METODO FAAH

El porcentaje de fluorescencia emitida es inversamente proporcional al porcentaje de inhibición de la FAAH, es decir conforme pasan los minutos la fluorescencia incrementa pero ésta se ve afectada a medida que se va incrementando la concentración de las macamidias, tal como vemos en las figuras III.22 y III.23

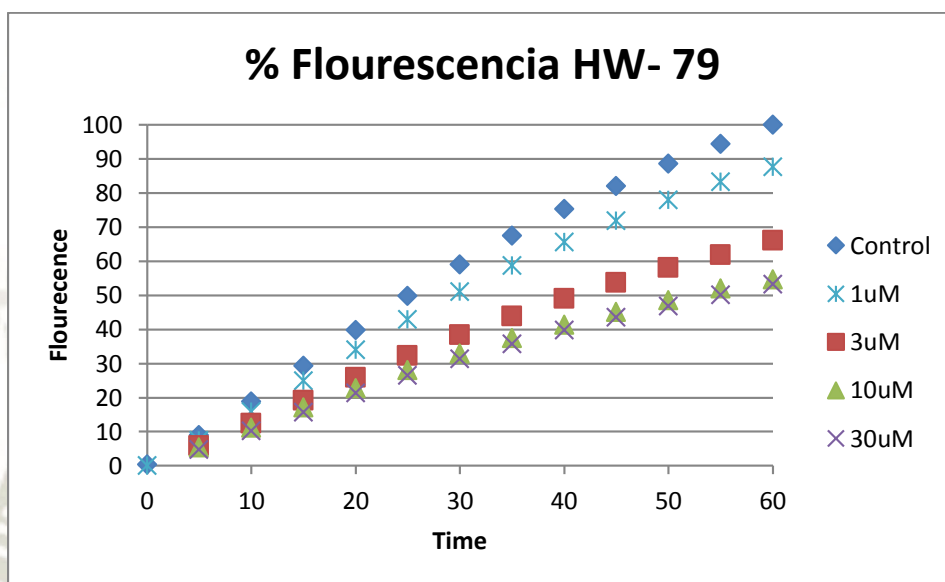


Figura III.23. Porcentaje de fluorescencia versus tiempo por concentraciones de HW-79

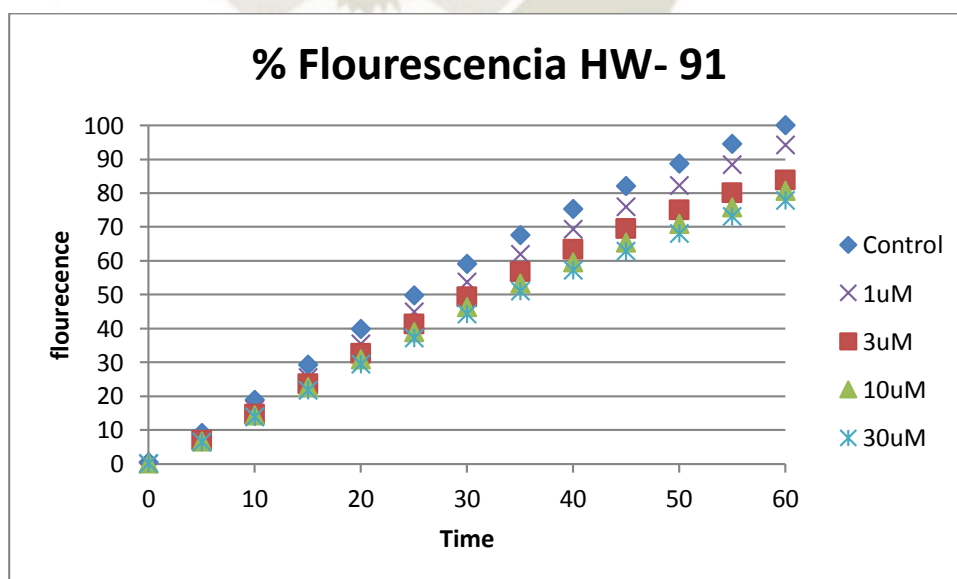


Figura III.24. Porcentaje de fluorescencia versus tiempo por concentraciones de HW-91

Se evaluó el porcentaje de inhibición, con el procedimiento descrito en el protocolo mencionado en el capítulo II, se utilizaron las macamidas HW-79 y la HW-91 respectivamente, a concentraciones de 1 μM , 3 μM , 10 μM y 30 μM , como se observa en las figuras III.24 y III.25, se muestra estadísticamente significativo la inhibición de la FAAH conforme se va aumentando la concentración.

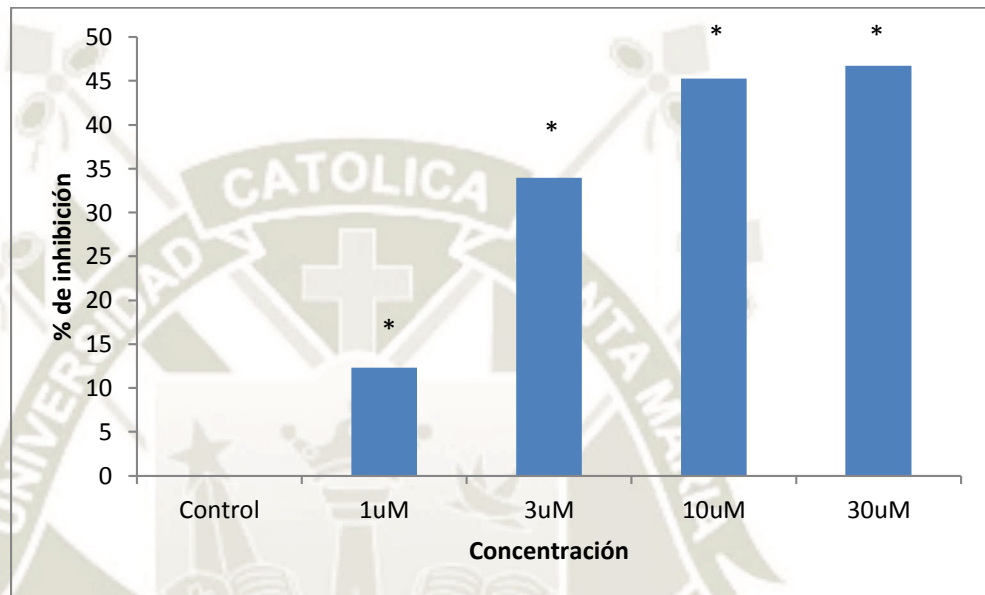


Figura III.25. Porcentaje de Inhibición de FAAH por HW-79

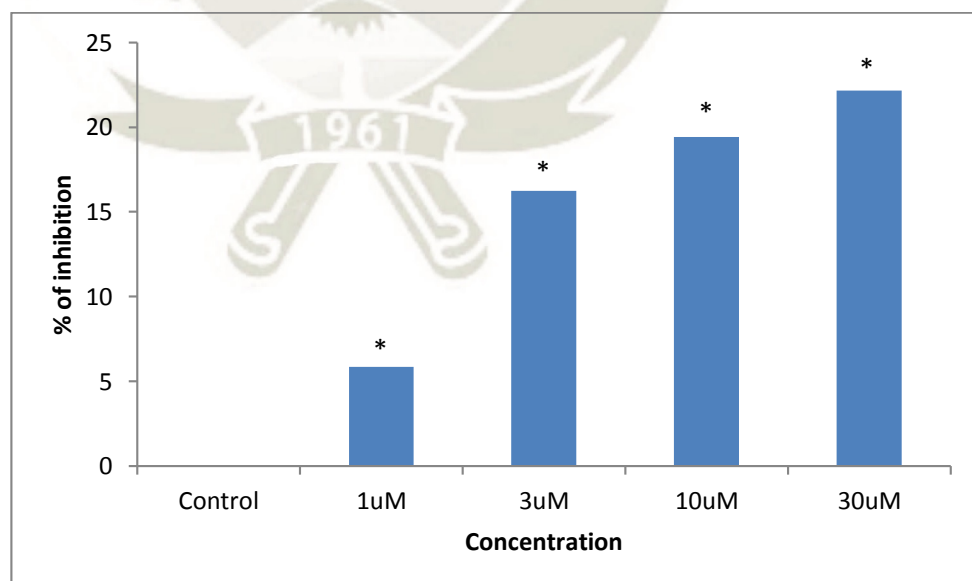


Figura III.26. Porcentaje de Inhibición de FAAH por HW-91

En la figura III 26, vemos como comparadas las macamidas, la *N*-(3-Methoxybenzyl)palmitamide (HW-79) tiene mayor efecto inhibitor que la *N*-(3-Methoxybenzyl)tetradecanamide (HW-91).

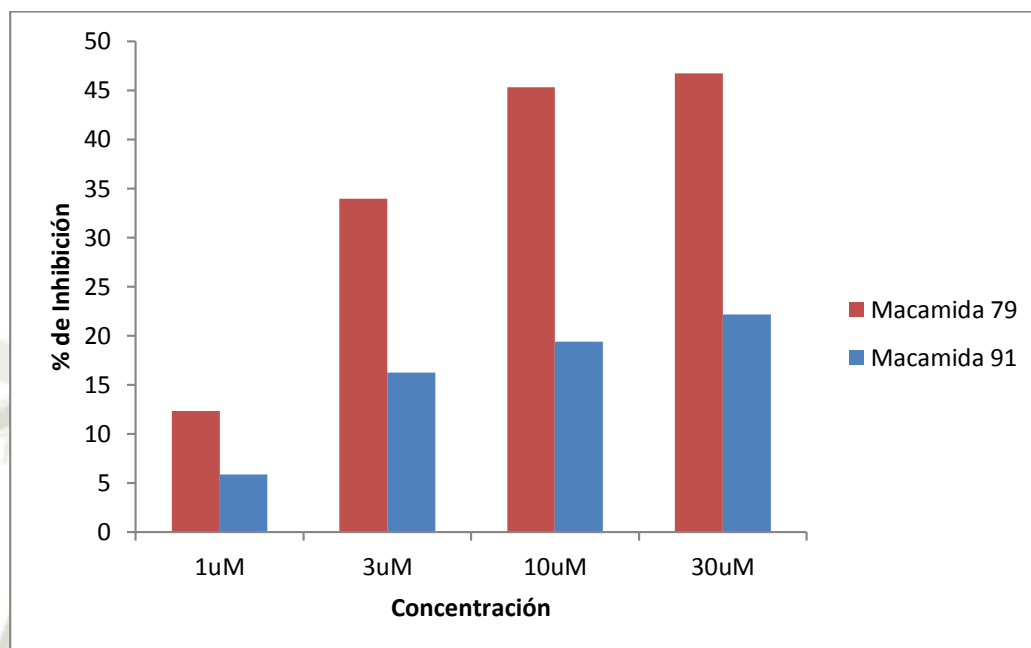


Figura III.27. Porcentaje de Inhibición de FAAH por HW-79 y HW-91

Como hemos podido observar en este trabajo de investigación el uso de macamidas para el tratamiento de cáncer de mama, no fue satisfactorio como lo esperado, es este caso con las macamidas utilizadas no son las ideales para abordarlas como tratamiento, esto no quiere decir que no existan macamidas que puedan tener buenos resultados, tal como le sucedió a Xiao Xia Liang y colaboradores en su trabajo de investigación denominado “Síntesis y evaluación biológica de los derivados de macamidas como potentes inhibidores de la célula de cáncer de mama MCF-7⁷⁰”, los resultados que obtuvieron luego de sintetizar y evaluar una serie de macamidas y análogos sintéticos, mostraron que solo dos macamidas y un análogo sintético presentaban actividades inhibitoras a las demás.

En cuanto al celecoxib, obtuvimos resultados que disminuía la viabilidad celular en función a la concentración utilizada, pensando que en combinación con macamidas se podría obtener mejores resultados, si bien se mostraron algunas concentraciones de sinergismo entre las macamidas y el celecoxib, no fueron del todo satisfactorias ya que en algunos casos incluso fomentaban la proliferación, lo que si se tiene claro es que el celecoxib tal como Chaolin Huang⁷¹, Randall Harris⁷², etc. Concluyen que dicho fármaco se puede utilizar en el tratamiento de cáncer de mama.



CAPITULO IV

CONCLUSIONES

PRIMERA: Se evaluó el efecto de las macamidas *N*-(3-methoxybenzyl)-palmitamida (HW-79) y la *N*-(3-methoxybenzyl)-tetradecanamida (HW-91) sobre la viabilidad celular en células de cáncer de mama MDA-MB-231, concluyendo que si hay diferencia estadística significativa, tanto en las horas de exposición como en las concentraciones. Esto lleva a la conclusión que al exponer las células de cáncer de mama MDA-MB-231 las macamidas causan un efecto de aumento de la viabilidad celular a altas concentraciones.

SEGUNDA: Se evaluó el efecto de las macamidas *N*-(3-methoxybenzyl)-palmitamida (HW-79) y la *N*-(3-methoxybenzyl)-tetradecanamida (HW-91) en combinación con el celecoxib sobre la viabilidad celular en células de cáncer de mama MDA-MB-231, teniendo como resultados que si existe diferencias significativas, ya sea en los tiempos de exposición y concentraciones. Esto lleva a la conclusión que al exponer las células de cáncer de mama MDA-MB-231 al efecto del celecoxib se evidencia una disminución considerable de la viabilidad celular, sin embargo, al combinar el celecoxib con las macamidas causan que el efecto del celecoxib se vea disminuido y no se tenga el mismo efecto sobre la viabilidad celular de las células de cáncer de mama.

TERCERA: Se evaluó el efecto de las macamidas *N*-(3-methoxybenzyl)-palmitamida (HW-79) y la *N*-(3-methoxybenzyl)-tetradecanamida (HW-91) sobre la inhibición de la amida hidrolasa de ácidos grasos FAAH, resultando siendo la *N*-(3-methoxybenzyl)-palmitamida, la que mayor porcentaje de inhibición presentó.

BIBLIOGRAFIA

1. 1. Balick, M.; Lee, R., Maca: from traditional food crop to energy and libido stimulant. *Alternative therapies in health and medicine* **2002**, 8 (2), 96-98.
2. 2. www.cnseed.org.
3. 3. Aliaga, R., Maca. *Lepidium meyenii*). In: *Seminario, J.(ed.) Raíces Andinas- Contribuciones al conocimiento y a la capacitación* **2004**, 361-366.
4. 4. Li, G.; Ammermann, U.; Quirós, C. F., Glucosinolate contents in maca (*Lepidium peruvianum* Chacón) seeds, sprouts, mature plants and several derived commercial products. *Economic Botany* **2001**, 55 (2), 255-262.
5. 5. Dini, A.; Migliuolo, G.; Rastrelli, L.; Saturnino, P.; Schettino, O., Chemical composition of *Lepidium meyenii*. *Food Chemistry* **1994**, 49 (4), 347-349.
6. 6. Pino-Figueroa, A.; Vu, H.; Kelley, C. J.; Maher, T. J., Mechanism of Action of *Lepidium meyenii* (Maca): An Explanation for Its Neuroprotective Activity. *American Journal of Neuroprotection and Neuroregeneration* **2011**, 3 (1), 87-92.
7. 7. Valentová, K.; Ulrichova, J., *Smallanthus sonchifolius* and *Lepidium meyenii* – *Prospective Andean crops for the prevention of chronic diseases*. 2004; Vol. 147, p 119-30.
8. 8. VeČEŘA, R.; Orolin, J. A. N.; ŠKottová, N.; Kazdová, L.; Oliyarnik, O.; Ulrichová, J.; ŠImÁnek, V., The Influence of Maca (*Lepidium meyenii*) on Antioxidant Status, Lipid and Glucose Metabolism in Rat. *Plant Foods for Human Nutrition* **2007**, 62 (2), 59-63.
9. 9. Esparza, E.; Hadzich, A.; Cosio, E., La maca: la química detrás de su secado tradicional. *2015* **2015**, 29 (1), 7.
10. 10. Zheng, B. L.; He, K.; Kim, C. H.; Rogers, L.; Shao, Y.; Huang, Z. Y.; Lu, Y.; Yan, S. J.; Qien, L. C.; Zheng, Q. Y., Effect of a lipidic extract from *Lepidium meyenii* on sexual behavior in mice and rats. *Urology* **2000**, 55 (4), 598-602.
11. 11. Gonzales, G. F.; Cordova, A.; Gonzales, C.; Chung, A.; Vega, K.; Villena, A., *Lepidium meyenii* (Maca) improved semen parameters in adult men. *Asian Journal of Andrology* **2001**, 3 (4), 301-304.
12. 12. Eddouks, M.; Maghrani, M.; Zeggwagh, N. A.; Michel, J. B., Study of the hypoglycaemic activity of *Lepidium sativum* L. aqueous extract in normal and diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* **2005**, 97 (2), 391-395.
13. 13. Rubio, J.; Dang, H.; Gong, M.; Xinmin, L.; Chen, S.-L.; Gonzales, G., *Aqueous and hydroalcoholic extracts of Black Maca (Lepidium meyenii) improve scopolamine-induced memory impairment in mice*. 2007; Vol. 45, p 1882-90.
14. 14. Pino-Figueroa, A.; Nguyen, D.; Maher, T. J., Neuroprotective effects of *Lepidium meyenii* (Maca). *Annals of the New York Academy of Sciences* **2010**, 1199 (1), 77-85.
15. 15. Alquraini, A.; Waggas, D.; Böhlke, M.; Maher, T.; Pino-Figueroa, A., Neuroprotective effects of *Lepidium meyenii* (Maca) and macamides against amyloid-beta (25-35) induced toxicity in B-35 neuroblastoma cells (657.13). *The FASEB Journal* **2014**, 28 (1_supplement), 657.13.
16. 16. Wu, H.; Kelley, C. J.; Pino-Figueroa, A.; Vu, H. D.; Maher, T. J., Macamides and their synthetic analogs: Evaluation of in vitro FAAH inhibition. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2013**, 21 (17), 5188-5197.

17. 17. Gonzales, G. F., Ethnobiology and Ethnopharmacology of *Lepidium meyenii* (Maca), a Plant from the Peruvian Highlands. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2012**, 2012, 10.
18. 18. Marzo, V. D.; Bifulco, M.; Petrocellis, L. D., The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nature Reviews Drug Discovery* **2004**, 3, 771.
19. 19. Pacher, P.; Bátkai, S.; Kunos, G., The Endocannabinoid System as an Emerging Target of Pharmacotherapy. *Pharmacological Reviews* **2006**, 58 (3), 389.
20. 20. Choy, H.; Milas, L., Enhancing Radiotherapy With Cyclooxygenase-2 Enzyme Inhibitors: A Rational Advance? *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **2003**, 95 (19), 1440-1452.
21. 21. Cancer, I. N. d. Anatomía de la mama femenina. <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/mama>.
22. 22. Society, A. C., American Cancer Society: Cancer Facts and Figures 2016. **2016**.
23. 23. Cancer, L. c. e., Estadísticas. **2013**.
24. 24. Altekruse SF, K. C., Krapcho M, SEER Cancer Statistics Review, 1975-2007. **2010**
25. 25. Colditz GA, R. B., Speizer FE, Risk factors for breast cancer according to family history of breast cancer. For the Nurses' Health Study Research Group. *J Natl Cancer Inst* 88 (6): 365-71, 1996. **1996**.
26. 26. Colditz, G. A.; Kaphingst, K. A.; Hankinson, S. E.; Rosner, B., Family history and risk of breast cancer: nurses' health study. *Breast Cancer Research and Treatment* **2012**, 133 (3), 1097-1104.
27. 27. Malone, K. E.; Daling, J. R.; Doody, D. R.; Brien, C.; Resler, A.; Ostrander, E. A.; Porter, P. L., Family History of Breast Cancer in Relation to Tumor Characteristics and Mortality in a Population-Based Study of Young Women with Invasive Breast Cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **2011**, 20 (12), 2560.
28. 28. Cybulski, C.; Wokołorczyk, D.; Jakubowska, A.; Huzarski, T.; Byrski, T.; Gronwald, J.; Masojć, B.; Dębniak, T.; Górski, B.; Blecharz, P.; Narod, S. A.; Lubiński, J., Risk of Breast Cancer in Women With a CHEK2 Mutation With and Without a Family History of Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology* **2011**, 29 (28), 3747-3752.
29. 29. Goodwin, P. J.; Phillips, K.-A.; West, D. W.; Ennis, M.; Hopper, J. L.; John, E. M.; O'Malley, F. P.; Milne, R. L.; Andrulis, I. L.; Friedlander, M. L.; Southey, M. C.; Apicella, C.; Giles, G. G.; Longacre, T. A., Breast Cancer Prognosis in BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers: An International Prospective Breast Cancer Family Registry Population-Based Cohort Study. *Journal of Clinical Oncology* **2012**, 30 (1), 19-26.
30. 30. Futreal PA, L. Q., Shattuck-Eidens D, BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science* 266 (5182): 120-2 **1994**.
31. 31. Mavaddat, N.; Barrowdale, D.; Andrulis, I. L.; Domchek, S. M.; Eccles, D.; Nevanlinna, H.; Ramus, S. J.; Spurdle, A.; Robson, M.; Sherman, M.; Mulligan, A. M.; Couch, F. J.; Engel, C.; McGuffog, L.; Healey, S.; Sinilnikova, O. M.; Southey, M. C.; Terry, M. B.; Goldgar, D.; Malley, F.; John, E. M.; Janavicius, R.; Tihomirova, L.; Hansen, T. V. O.; Nielsen, F. C.; Osorio, A.; Stavropoulou, A.; Benítez, J.; Manoukian, S.; Peissel, B.; Barile, M.; Volorio, S.; Pasini, B.; Dolcetti,

- R.; Putignano, A. L.; Ottini, L.; Radice, P.; Hamann, U.; Rashid, M. U.; Hogervorst, F. B.; Kriege, M.; van der Luijt, R. B.; Peock, S.; Frost, D.; Evans, D. G.; Brewer, C.; Walker, L.; Rogers, M. T.; Side, L. E.; Houghton, C.; Weaver, J.; Godwin, A. K.; Schmutzler, R. K.; Wappenschmidt, B.; Meindl, A.; Kast, K.; Arnold, N.; Niederacher, D.; Sutter, C.; Deissler, H.; Gadzicki, D.; Preisler-Adams, S.; Varon-Mateeva, R.; Schönbuchner, I.; Gevensleben, H.; Stoppa-Lyonnet, D.; Belotti, M.; Barjhoux, L.; Isaacs, C.; Peshkin, B. N.; Caldes, T.; de la Hoya, M.; Cañadas, C.; Heikkinen, T.; Heikkilä, P.; Aittomäki, K.; Blanco, I.; Lazaro, C.; Brunet, J.; Agnarsson, B. A.; Arason, A.; Barkardottir, R. B.; Dumont, M.; Simard, J.; Montagna, M.; Agata, S.; Andrea, E.; Yan, M.; Fox, S.; Rebbeck, T. R.; Rubinstein, W.; Tung, N.; Garber, J. E.; Wang, X.; Fredericksen, Z.; Pankratz, V. S.; Lindor, N. M.; Szabo, C.; Offit, K.; Sakr, R.; Gaudet, M. M.; Singer, C. F.; Tea, M.-K.; Rappaport, C.; Mai, P. L.; Greene, M. H.; Sokolenko, A.; Imyanitov, E.; Toland, A. E.; Senter, L.; Sweet, K.; Thomassen, M.; Gerdes, A.-M.; Kruse, T.; Caligo, M.; Aretini, P.; Rantala, J.; von Wachenfeld, A.; Henriksson, K.; Steele, L.; Neuhausen, S. L.; Nussbaum, R.; Beattie, M.; Odunsi, K.; Sucheston, L.; Gayther, S. A.; Nathanson, K.; Gross, J.; Walsh, C.; Karlan, B.; Chenevix-Trench, G.; Easton, D. F.; Antoniou, A. C., Pathology of Breast and Ovarian Cancers among BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers: Results from the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1 and BRCA2 (CIMBA). *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **2012**, *21* (1), 134.
32. 32. Miki Y, S. J., Shattuck-Eidens D., A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. . *Science* **266** (5182): 66-71 **1994**.
33. 33. Wooster, R.; Neuhausen, S. L.; Mangion, J.; Quirk, Y.; Ford, D.; Collins, N.; Nguyen, K.; Seal, S.; Tran, T.; Averill, D.; et, a., Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science* **1994**, *265* (5181), 2088.
34. 34. Alcohol, tobacco and breast cancer – collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58 515 women with breast cancer and 95 067 women without the disease. *British Journal Of Cancer* **2002**, *87*, 1234.
35. 35. Boyd, N. F.; Martin, L. J.; Rommens, J. M.; Paterson, A. D.; Minkin, S.; Yaffe, M. J.; Stone, J.; Hopper, J. L., Mammographic Density: A Heritable Risk Factor for Breast Cancer. In *Cancer Epidemiology: Modifiable Factors*, Verma, M., Ed. Humana Press: Totowa, NJ, 2009; pp 343-360.
36. 36. McCormack, V. A.; dos Santos Silva, I., Breast Density and Parenchymal Patterns as Markers of Breast Cancer Risk: A Meta-analysis. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **2006**, *15* (6), 1159.
37. 37. Endogenous, H.; Breast Cancer Collaborative, G.; Key, T. J.; Appleby, P. N.; Reeves, G. K.; Roddam, A. W.; Helzlsouer, K. J.; Alberg, A. J.; Rollison, D. E.; Dorgan, J. F.; Brinton, L. A.; Overvad, K.; Kaaks, R.; Trichopoulou, A.; Clavel-Chapelon, F.; Panico, S.; Duell, E. J.; Peeters, P. H. M.; Rinaldi, S.; Fentiman, I. S.; Dowsett, M.; Manjer, J.; Lenner, P.; Hallmans, G.; Baglietto, L.; English, D. R.; Giles, G. G.; Hopper, J. L.; Severi, G.; Morris, H. A.; Hankinson, S. E.; Tworoger, S. S.; Koenig, K.; Zeleniuch-Jacquotte, A.; Arslan, A. A.; Toniolo, P.; Shore, R. E.; Krogh, V.; Micheli, A.; Berrino, F.; Barrett-Connor, E.; Laughlin, G. A.; Kabuto, M.; Akiba, S.; Stevens, R. G.; Neriishi, K.; Land, C. E.; Cauley, J. A.;

- Lui, L. Y.; Cummings, S. R.; Gunter, M. J.; Rohan, T. E.; Strickler, H. D., Circulating sex hormones and breast cancer risk factors in postmenopausal women: reanalysis of 13 studies. *British Journal Of Cancer* **2011**, *105*, 709.
38. 38. Kaaks R, R. S., Key TJ, Postmenopausal serum androgens, oestrogens and breast cancer risk: the European prospective investigation into cancer and nutrition. . *Endocr Relat Cancer* *12 (4): 1071-82* **2005**.
39. 39. Kaaks, R.; Berrino, F.; Key, T.; Rinaldi, S.; Dossus, L.; Biessy, C.; Secretò, G.; Amiano, P.; Bingham, S.; Boeing, H.; de Mesquita, H. B. B.; Chang-Claude, J.; Clavel-Chapelon, F.; Fournier, A.; van Gils, C. H.; Gonzalez, C. A.; Gurree, A. B.; Critselis, E.; Khaw, K. T.; Krogh, V.; Lahmann, P. H.; Nagel, G.; Olsen, A.; Onland-Moret, N. C.; Overvad, K.; Palli, D.; Panico, S.; Peeters, P.; Quirós, J. R.; Roddam, A.; Thiebaut, A.; Tjønneland, A.; Chirlaque, M. D.; Trichopoulou, A.; Trichopoulos, D.; Tumino, R.; Vineis, P.; Norat, T.; Ferrari, P.; Slimani, N.; Riboli, E., Serum Sex Steroids in Premenopausal Women and Breast Cancer Risk Within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **2005**, *97 (10)*, 755-765.
40. 40. The Endogenous, H.; Breast Cancer Collaborative, G., Endogenous Sex Hormones and Breast Cancer in Postmenopausal Women: Reanalysis of Nine Prospective Studies. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **2002**, *94 (8)*, 606-616.
41. 41. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast, C., Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *The Lancet Oncology* **2012**, *13 (11)*, 1141-1151.
42. 42. Ritte, R.; Lukanova, A.; Tjønneland, A.; Olsen, A.; Overvad, K.; Mesrine, S.; Fagherazzi, G.; Dossus, L.; Teucher, B.; Steindorf, K.; Boeing, H.; Aleksandrova, K.; Trichopoulou, A.; Lagiou, P.; Trichopoulos, D.; Palli, D.; Grioni, S.; Mattiello, A.; Tumino, R.; Sacerdote, C.; Quirós, J. R.; Buckland, G.; Molina-Montes, E.; Chirlaque, M.-D.; Ardanaz, E.; Amiano, P.; Bueno-de-Mesquita, B.; van Duijnhoven, F.; van Gils, C. H.; Peeters, P. H. M.; Wareham, N.; Khaw, K.-T.; Key, T. J.; Travis, R. C.; Krum-Hansen, S.; Gram, I. T.; Lund, E.; Sund, M.; Andersson, A.; Romieu, I.; Rinaldi, S.; McCormack, V.; Riboli, E.; Kaaks, R., Height, age at menarche and risk of hormone receptor-positive and -negative breast cancer: A cohort study. *International Journal of Cancer* **2012**, *132 (11)*, 2619-2629.
43. 43. Kampert JB, W. A., Paffenbarger RS Jr, Combined effect of childbearing, menstrual events, and body size on age-specific breast cancer risk. . *Am J Epidemiol* *128 (5): 962-79* **1988**.
44. 44. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52, w. w. b. c. a., 411 women without breast cancer. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. , *Lancet* *350 (9084): 1047-59* **1997**.
45. 45. Writing Group for the Women's Health Initiative, I., Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: Principal results from the women's health initiative randomized controlled trial. *JAMA* **2002**, *288 (3)*, 321-333.

46. Chlebowski, R. T.; Anderson, G. L.; Gass, M.; et al., Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in postmenopausal women. *JAMA* **2010**, *304* (15), 1684-1692.
47. Chlebowski, R. T.; Hendrix, S. L.; Langer, R. D.; et al., Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: The women's health initiative randomized trial. *JAMA* **2003**, *289* (24), 3243-3253.
48. Chlebowski, R. T.; Manson, J. E.; Anderson, G. L.; Cauley, J. A.; Aragaki, A. K.; Stefanick, M. L.; Lane, D. S.; Johnson, K. C.; Wactawski-Wende, J.; Chen, C.; Qi, L.; Yasmeeen, S.; Newcomb, P. A.; Prentice, R. L., Estrogen Plus Progestin and Breast Cancer Incidence and Mortality in the Women's Health Initiative Observational Study. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* **2013**, *105* (8), 526-535.
49. Morimoto LM, W. E., Chen Z, Obesity, body size, and risk of postmenopausal breast cancer: the Women's Health Initiative (United States). *Cancer Causes Control* *13* (8): 741-51 **2002**.
50. Wolin, K. Y.; Carson, K.; Colditz, G. A., Obesity and Cancer. *The Oncologist* **2010**, *15* (6), 556-565.
51. Kotsopoulos J, C. W., Gates MA, Risk factors for ductal and lobular breast cancer: results from the nurses' health study. . *Breast Cancer Res* *12* (6): R106 **2010**.
52. Goldacre MJ, A. J., Yeates DG, Benign breast disease and subsequent breast cancer: English record linkage studies. *J Public Health (Oxf)* *32* (4): 565-71 **2010**.
53. Kabat GC, J. J., Olson N, A multi-center prospective cohort study of benign breast disease and risk of subsequent breast cancer. . *Cancer Causes Control* *21* (6): 821-8 **2010**.
54. Worsham MJ, R. U., Lu M, Risk factors for breast cancer from benign breast disease in a diverse population. . *Breast Cancer Res Treat* *118* (1): 1-7 **2009**.
55. Pearlman MD, G. J., Benign breast disease. . *Obstet Gynecol* *116* (3): 747-58 **2010**.
56. VG, V., Epidemiology, genetics, and risk evaluation of postmenopausal women at risk of breast cancer. . *Menopause* *15* (4 Suppl): 782-9 **2008**.
57. Degnim AC, V. D., Berman HK, Stratification of breast cancer risk in women with atypia: a Mayo cohort study. . *J Clin Oncol* *25* (19): 2671-7 **2007**.
58. Worsham MJ, A. J., Raju U, Breast cancer incidence in a cohort of women with benign breast disease from a multiethnic, primary health care population. *Breast J* *13* (2): 115-21 **2007**.
59. Razzaghi H, T. M., Gierach GL, Mammographic density and breast cancer risk in White and African American Women. . *Breast Cancer Res Treat* *135* (2): 571-80 **2012**.
60. Pfeiffer RM, M. A., Matsuno RK, Racial differences in breast cancer trends in the United States (2000-2004). . *J Natl Cancer Inst* *100* (10): 751-2 **2008**.
61. Cailleau, R., Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J. Natl. Cancer Inst.* *53*: 661-664 **1974**.
62. Martínez-Carpio , P. A., Constitutive and regulated secretion of epidermal growth factor and transforming growth factor-beta1 in MDA-MB-231 breast cancer cell line in 11-day cultures. *Cellular Signalling* *11* (10): 753-757 **1999**.
63. PubChem, Celecoxib. **2018**.

64. 64. Martínez-Carpio, P. A.; Navarro Moreno, M. Á., El cultivo celular en la investigación básica del cáncer de mama. *Revista de Oncología* **2003**, 5 (4), 184-191.
65. 65. Tominaga, H.; Ishiyama, M.; Ohseto, F.; Sasamoto, K.; Hamamoto, T.; Suzuki, K.; Watanabe, M., A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. *Analytical Communications* **1999**, 36 (2), 47-50.
66. 66. Cory AH, O. T., Barltrop JA, Cory JG., Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Department of Biochemistry, East Carolina University School of Medicine, Greenville, NC 27858* **1991**.
67. 67. Soman, G.; Yang, X.; Jiang, H.; Giardina, S.; Vyas, V.; Mitra, G.; Yovandich, J.; Creekmore, S. P.; Waldmann, T. A.; Quiñones, O.; Alvord, W. G., MTS dye based colorimetric CTLL-2 cell proliferation assay for product release and stability monitoring of Interleukin-15: Assay qualification, standardization and statistical analysis. *Journal of Immunological Methods* **2009**, 348 (1), 83-94.
68. 68. Company, C., FAAH Inhibitor Screening Assay Kit. **2014**.
69. 69. J., D., Basic cell culture: A Practical Approach. . *United Kingdom: Oxford University Press* **2002**, 2th ed.
70. 70. Xiao Xia, L.; Cheng, X.; Min, H.; Changliang, H.; Zhongqiong, Y., Synthesis and Biological Evaluation of Macamides Derivatives as Potent Inhibitors of Breast Cancer Cell MCF-7. *Letters in Drug Design & Discovery* **2016**, 13 (6), 489-494.
71. 71. Huang, C.; Chen, Y.; Liu, H.; Yang, J.; Song, X.; Zhao, J.; He, N.; Zhou, C. J.; Wang, Y.; Huang, C.; Dong, Q., Celecoxib targets breast cancer stem cells by inhibiting the synthesis of prostaglandin E(2) and down-regulating the Wnt pathway activity. *Oncotarget* **2017**, 8 (70), 115254-115269.
72. 72. Harris, R. E.; Alshafie, G. A.; Abou-Issa, H.; Seibert, K., Chemoprevention of Breast Cancer in Rats by Celecoxib, a Cyclooxygenase 2 Inhibitor. *Cancer Research* **2000**, 60 (8), 2101.

ANEXOS

Tabla IV.1 Reporte del Análisis de Varianza y Tuckey entre la viabilidad celular y HW-91 – 24 hrs.

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Row 1	3	0	100	0	0
Row 2	3	0	92.401	1.65	0.952
Row 3	3	0	99.019	2.156	1.245
Row 4	3	0	102.647	3.163	1.826
Row 5	3	0	126.303	2.178	1.257

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	4	2023.79	505.948	114.388	<0.001
Residual	10	44.231	4.423		
Total	14	2068.02			

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

Power of performed test with
alpha = 0.050: 1.000

All Pairwise Multiple Comparison
Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	Q	P	P<0.050
Row 1 vs. Row 2	7.599	5	6.258	0.009	Yes
Row 1 vs. Row 3	0.981	5	0.808	0.976	No
Row 1 vs. Row 4	2.647	5	2.18	0.562	No
Row 1 vs. Row 5	26.303	5	21.663	<0.001	Yes

Tabla IV.2 Reporte del Análisis de Varianza y Tuckey entre la viabilidad celular y HW-91 – 48 hrs

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Row 1	3	0	100	0	0
Row 2	3	0	84.086	1.834	1.059
Row 3	3	0	93.324	1.646	0.95
Row 4	3	0	97.911	1.726	0.996
Row 5	3	0	117.963	2.249	1.298

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	4	1847.54	461.884	163.687	<0.001
Residual	10	28.218	2.822		
Total	14	1875.75			

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

Power of performed test with alpha = 0.050: 1.000

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
Row 1 vs. Row 2	15.914	5	16.409	<0.001	Yes
Row 1 vs. Row 3	6.676	5	6.884	0.005	Yes
Row 1 vs. Row 4	2.089	5	2.154	0.572	No
Row 1 vs. Row 5	17.963	5	18.522	<0.001	Yes

Tabla IV.3 Reporte del Análisis de Varianza y Tuckey entre la viabilidad celular y HW-91 – 72 hrs

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Row 1	3	0	100	0	0
Row 2	3	0	82.409	1.802	1.04
Row 3	3	0	87.154	2.5	1.443
Row 4	3	0	92.558	2.275	1.313
Row 5	3	0	102.201	2.163	1.249

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	4	840.306	210.077	54.283	<0.001
Residual	10	38.701	3.87		
Total	14	879.007			

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

Power of performed test with alpha = 0.050: 1.000

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
Row 1 vs. Row 2	17.591	5	15.488	<0.001	Yes
Row 1 vs. Row 3	12.846	5	11.31	<0.001	Yes
Row 1 vs. Row 4	7.442	5	6.552	0.007	Yes
Row 1 vs. Row 5	2.201	5	1.938	0.658	No

Tabla IV.4 Reporte del Análisis de Varianza y Tuckey entre la viabilidad celular y HW-79 – 24 hrs

One Way Analysis of
Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Row 1	3	0	100	0	0
Row 2	3	0	92.272	1.813	1.047
Row 3	3	0	93.377	2.108	1.217
Row 4	3	0	95.827	1.577	0.911
Row 5	3	0	98.414	1.305	0.753

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	4	127.9	31.975	13.412	<0.001
Residual	10	23.84	2.384		
Total	14	151.74			

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

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.998

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
Row 1 vs. Row 2	7.728	5	8.669	<0.001	Yes
Row 1 vs. Row 3	6.623	5	7.43	0.003	Yes
Row 1 vs. Row 4	4.173	5	4.681	0.049	Yes
Row 1 vs. Row 5	1.586	5	1.779	0.721	No

Tabla IV.5 Reporte del Análisis de Varianza y Tuckey entre la viabilidad celular y HW-79 – 48 hrs

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Row 1	3	0	100	0	0
Row 2	3	0	80.682	1.317	0.76
Row 3	3	0	82.654	2.776	1.603
Row 4	3	0	85.604	3.192	1.843
Row 5	3	0	90.133	2.261	1.305

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	4	708.767	177.192	35.808	<0.001
Residual	10	49.483	4.948		
Total	14	758.25			

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

Power of performed test with alpha = 0.050:
1.000

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
Row 1 vs. Row 2	19.318	5	15.042	<0.001	Yes
Row 1 vs. Row 3	17.346	5	13.506	<0.001	Yes
Row 1 vs. Row 4	14.396	5	11.209	<0.001	Yes
Row 1 vs. Row 5	9.867	5	7.683	0.002	Yes

Tabla IV.6 Reporte del Análisis de Varianza y Tuckey entre la viabilidad celular y HW-79 – 72 hrs

One Way Analysis of
Variance

Data source: Data 1 in
Notebook1

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Row 1	3	0	100	0	0
Row 2	3	0	69.887	1.813	1.046
Row 3	3	0	73.078	2.477	1.43
Row 4	3	0	78.297	2	1.155
Row 5	3	0	81.999	1.352	0.78

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	4	1664.868	416.217	136.492	<0.001
Residual	10	30.494	3.049		
Total	14	1695.362			

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

Power of performed test with alpha =
0.050: 1.000

All Pairwise Multiple Comparison Procedures
(Tukey Test):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
Row 1 vs. Row 2	30.113	5	29.868	<0.001	Yes
Row 1 vs. Row 3	26.922	5	26.703	<0.001	Yes
Row 1 vs. Row 4	21.703	5	21.527	<0.001	Yes
Row 1 vs. Row 5	18.001	5	17.854	<0.001	Yes

Tabla IV.7 Reporte del Análisis de Varianza y Tuckey entre la viabilidad celular y Celecoxib – 24 hrs.

One Way Analysis of
Variance

Data source: Data 1 in
Notebook1

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Row 1	3	0	100	0	0
Row 2	3	0	92.272	1.813	1.047
Row 3	3	0	93.377	2.108	1.217
Row 4	3	0	95.827	1.577	0.911
Row 5	3	0	98.414	1.305	0.753

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	4	127.9	31.975	13.412	<0.001
Residual	10	23.84	2.384		
Total	14	151.74			

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

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.998

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
Row 1 vs. Row 2	7.728		5	8.669 <0.001	Yes
Row 1 vs. Row 3	6.623		5	7.43 0.003	Yes
Row 1 vs. Row 4	4.173		5	4.681 0.049	Yes
Row 1 vs. Row 5	1.586		5	1.779 0.721	Yes

Tabla IV.8 Reporte del Análisis de Varianza y Tuckey entre la viabilidad celular y Celecoxib – 48 hrs

One Way Analysis of
Variance

Data source: Data 1 in
Notebook1

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Row 1	3	0	100	0	0
Row 2	3	0	80.682	1.317	0.76
Row 3	3	0	82.654	2.776	1.603
Row 4	3	0	85.604	3.192	1.843
Row 5	3	0	90.133	2.261	1.305

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	4	708.767	177.192	35.808	<0.001
Residual	10	49.483	4.948		
Total	14	758.25			

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

Power of performed test with alpha = 0.050:
1.000

All Pairwise Multiple Comparison Procedures
(Tukey Test):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
Row 1 vs. Row 2	19.318	5	15.042	<0.001	Yes
Row 1 vs. Row 3	17.346	5	13.506	<0.001	Yes
Row 1 vs. Row 4	14.396	5	11.209	<0.001	Yes
Row 1 vs. Row 5	9.867	5	7.683	0.002	Yes

Tabla IV.9 Reporte del Análisis de Varianza y Tuckey entre la viabilidad celular y Celecoxib – 72 hrs

One Way Analysis
of Variance

Data source: Data 1
in Notebook1

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Row 1	3	0	100	0	0
Row 2	3	0	69.887	1.813	1.046
Row 3	3	0	73.078	2.477	1.43
Row 4	3	0	78.297	2	1.155
Row 5	3	0	81.999	1.352	0.78

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	4	1664.868	416.217	136.492	<0.001
Residual	10	30.494	3.049		
Total	14	1695.362			

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

Power of performed test with alpha = 0.050: 1.000

All Pairwise Multiple Comparison
Procedures (Tukey Test):

Comparisons for
factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
Row 1 vs. Row 2	30.113	5	29.868	<0.001	Yes
Row 1 vs. Row 3	26.922	5	26.703	<0.001	Yes
Row 1 vs. Row 4	21.703	5	21.527	<0.001	Yes
Row 1 vs. Row 5	18.001	5	17.854	<0.001	Yes

Tabla IV.10 Reporte del Análisis de Varianza y Tuckey entre la viabilidad celular HW-91 y Celecoxib – 24 hrs

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Row 1	3	0	100	0	0
Row 2	3	0	93.896	1.434	0.828
Row 3	3	0	89.42	1.062	0.613
Row 4	3	0	86.241	0.989	0.571
Row 5	3	0	79.444	1.04	0.601

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	4	722.633	180.658	172.221	<0.001
Residual	10	10.49	1.049		
Total	14	733.123			

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

Power of performed test with alpha = 0.050:
1.000

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
Row 1 vs. Row 5	20.556	5	34.763	<0.001	Yes
Row 1 vs. Row 4	13.759	5	23.267	<0.001	Yes
Row 1 vs. Row 3	10.58	5	17.893	<0.001	Yes
Row 1 vs. Row 2	6.104	5	10.322	<0.001	Yes

Tabla IV.11 Reporte del Análisis de Varianza y Tuckey entre la viabilidad celular HW-91 y Celecoxib – 48 hrs

One Way Analysis of
Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Row 1	3	0	100	0	0
Row 2	3	0	91.661	1.64	0.947
Row 3	3	0	89.672	1.401	0.809
Row 4	3	0	84.816	2.347	1.355
Row 5	3	0	84.636	0.722	0.417

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	4	475.192	118.798	55.592	<0.001
Residual	10	21.37	2.137		
Total	14	496.562			

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

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

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050	
Row 1 vs. Row 5	15.364		5	18.204	<0.001	Yes
Row 1 vs. Row 4	15.184		5	17.991	<0.001	Yes
Row 1 vs. Row 3	10.328		5	12.237	<0.001	Yes
Row 1 vs. Row 2	8.339		5	9.88	<0.001	Yes

Tabla IV.12 Reporte del Análisis de Varianza y Tuckey entre la viabilidad celular HW-91 y Celecoxib – 72 hrs

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Row 1	3	0	100	0	0
Row 2	3	0	90.864	1.374	0.794
Row 3	3	0	87.785	2.263	1.306
Row 4	3	0	80.765	1.357	0.783
Row 5	3	0	82.084	2.019	1.166

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	4	717.409	179.352	69.372	<0.001
Residual	10	25.854	2.585		
Total	14	743.263			

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

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

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
Row 1 vs. Row 4	19.235	5	20.72	<0.001	Yes
Row 1 vs. Row 5	17.916	5	19.299	<0.001	Yes
Row 1 vs. Row 3	12.215	5	13.158	<0.001	Yes
Row 1 vs. Row 2	9.136	5	9.841	<0.001	Yes

Tabla IV.13 Reporte del Análisis de Varianza y Tuckey entre la viabilidad celular HW-79 y Celecoxib – 24 hrs

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Row 1	3	0	100	0	0
Row 2	3	0	93.214	1.927	1.112
Row 3	3	0	91.738	0.995	0.574
Row 4	3	0	85.778	2.438	1.408
Row 5	3	0	81.594	1.797	1.038

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	4	602.279	150.57	54.259	<0.001
Residual	10	27.75	2.775		
Total	14	630.029			

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

Power of performed test with alpha = 0.050: 1.000

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
Row 1 vs. Row 5	18.406	5	19.138	<0.001	Yes
Row 1 vs. Row 4	14.222	5	14.788	<0.001	Yes
Row 1 vs. Row 3	8.262	5	8.59	0.001	Yes
Row 1 vs. Row 2	6.786	5	7.056	0.004	Yes

Tabla IV.14 Reporte del Análisis de Varianza y Tuckey entre la viabilidad celular HW-79 y Celecoxib – 48 hrs

One Way Analysis of
Variance

Data source: Data 1 in
Notebook1

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Row 1	3	0	100	0	0
Row 2	3	0	90.197	2.553	1.474
Row 3	3	0	81.896	2.488	1.437
Row 4	3	0	73.715	1.708	0.986
Row 5	3	0	82.196	2.123	1.226

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	4	1185.135	296.284	73.57	<0.001
Residual	10	40.272	4.027		
Total	14	1225.408			

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

Power of performed test with alpha =
0.050: 1.000

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey
Test):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050	
Row 1 vs. Row 4	26.285		5	22.686	<0.001	Yes
Row 1 vs. Row 3	18.104		5	15.625	<0.001	Yes
Row 1 vs. Row 5	17.804		5	15.366	<0.001	Yes
Row 1 vs. Row 2	9.803		5	8.461	0.001	Yes

Tabla IV.15 Reporte del Análisis de Varianza y Tuckey entre la viabilidad celular HW-79 y Celecoxib – 72 hrs

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Row 1	3	0	100	0	0
Row 2	3	0	76.801	2.463	1.422
Row 3	3	0	72.28	1.16	0.67
Row 4	3	0	62.918	1.48	0.855
Row 5	3	0	64.017	1.826	1.054

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	4	2706.128	676.532	261.462	<0.001
Residual	10	25.875	2.587		
Total	14	2732.003			

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

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

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
Row 1 vs. Row 4	37.082	5	39.928	<0.001	Yes
Row 1 vs. Row 5	35.983	5	38.746	<0.001	Yes
Row 1 vs. Row 3	27.72	5	29.848	<0.001	Yes
Row 1 vs. Row 2	23.199	5	24.98	<0.001	Yes

Tabla IV.16 Reporte del Análisis de Varianza y Tuckey entre la comparación de viabilidad celular de celecoxib, HW-91 + celecoxib y HW-79 + celecoxib – 72 hrs

Celecoxib	HW-91 + celecoxib	HW-79 + celecoxib
41.60	93.26	66.53
41.77	73.25	56.12
43.48	80.23	64.79
36.15	77.56	69.48
43.66	80.85	65.20
46.75	82.40	67.46

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	4609.0107	2	2304.5054	87.88	5.2117E-09	3.68
Dentro de los grupos	393.3434	15	26.2229			
Total	5002.3541	17				

Multiple Range Tests

Method: 95.0 percent Tukey HSD

	Count	Mean	Homogeneous Groups
Celex	6	42.235	X
Celex+91	6	81.2583	X
Celex+79	6	64.93	X

Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
Celex - Celex+91	*	-39.0233	7.71225
Celex - Celex+79	*	-22.695	7.71225
Celex+79 - Celex+91	*	-16.3283	7.71225

* denotes a statistically significant difference.