

# Universidad Católica de Santa María

## Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

### Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica



**“EFECTO IN VITRO N-(PIRIDIN-3-ILMETIL) OLEAMIDA, N-(6-CLOROPIRIDIN-3-ILMETIL) OLEAMIDA Y (9Z, 12Z)-N-(PIRIDIN-3-ILMETIL) OCTADEC-9,12-DIENAMIDA SOBRE EL FAAH Y VIABILIDAD CELULAR EN COMBINACIÓN CON EL CELECOXIB EN LA LÍNEA CELULAR MDA-MB-231 DE CÁNCER DE MAMA, BOSTON – 2014”**

Tesis presentada por la Bachiller:  
**Taco Carpio, Alejandra Ysabo**  
para optar el Título Profesional de:  
Química Farmacéutica

Asesor:  
PhD Villanueva Salas, José Antonio

**AREQUIPA – PERÚ**

**2018**

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA  
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas  
y Biotecnológicas  
Programa Profesional de Farmacia y Bioquímica

Expediente N°. 14044627  
N° Trámite en Fac. 1610-2014  
Fecha 29-10-2014

FORMATO DE TITULACION PROFESIONAL

DE: TACO CARPIO, Alejandra Ysabo

TITULO DEL PROYECTO DE TESIS:

"EFECTO IN VITRO N-(Piridin -3-ilmetil) oleamida, N-(6-cloropiridin-3-ilmetil) oleamida Y (9Z, 12Z)-N-(Piridin -3-ilmetil) octadeca-9,12-dienamida EN EL FAAH Y LA LINEA CELULAR MDA-MB-231 DE CANCER DE MAMA EN COMBINACION CON EL CELECOXIB"

DICTAMINADORES: 1) Mgter. Angélica Corzo Salas 2) Dra. Gaby Velasco Lozano

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, como Dictaminadores del Plan de Tesis presentado por la recurrente, se ha procedido a la revisión del trabajo de investigación y hechas las observaciones y sugerencias correspondientes, consideramos que se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad  
Atentamente

Firmas :   (Devolver antes de 8 días hábiles) Fecha 19-05-2015

ASESOR: Mgter. José Villanueva Salas




DICTAMEN DE ASESOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas: habiéndose concluido el trabajo de investigación intitulado "EFECTO IN VITRO DE LA N-(PIRIDIN-3-ILMETIL)OLEAMIDA Y (9Z,12Z)-N-(PIRIDIN-3-ILMETIL)OCTADECA-9,12-DIENAMIDA SOBRE EL FAAH Y VIABILIDAD CELULAR EN COMBINACION CON EL CELECOXIB EN LA LINEA CELULAR MDA-MB-231 DE CANCER DE MAMA, BOSTON-2014", verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes, considero se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad.

Firma  Fecha 23/11/17

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) Dr. Alberto Briceño Ortega
- 2) Dra. Gaby Velasco Lozano
- 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 la recurrente, debiendo cambiar el título a "EFECTO IN VITRO N-(PIRIDIN-3-ILMETIL) OLEAMIDA, N-(6-CLOROPIRIDIN-3-ILMETIL) OLEAMIDA Y (9Z,12Z)-N-(PIRIDIN-3-ILMETIL) OCTADECA-9, 12-DIENAMIDA SOBRE EL FAAH Y VIABILIDAD CELULAR EN COMBINACION CON EL CELECOXIB EN LA LINEA CELULAR MDA-MB-231 DE CANCER DE MAMA, BOSTON-2014", y habiéndose cumplido con las correcciones respectivas, consideramos que el presente trabajo de investigación se encuentra APTO para continuar con el trámite, en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Firmas    (Devolver antes de 15 días hábiles) Fecha 16/4/2018

JURADOS: Presidente DR. ALBERTO BRICEÑO ORTEGA  
Vocal Dra. Gaby Velasco Lozano  
Secretario Mgter. Angélica Corzo Salas.

SUSTENTACIÓN DE TRABAJO:

Fecha: 07/05/18 Hora: 18.00 Local: C- 402 (SUM)

  
DECANO  
23/04/18

### **Dedicatoria**

Dedico esta tesis a todos aquellos que creyeron en mí.

A Dios por permitirme estar aquí.

A mi padre Raúl (†), por su constancia, por inculcarme fortaleza en la lucha por la vida, enseñándome siempre los valores que hacen fuerte a las personas, porque aunque ya no esté a mi lado sigue siendo mi guía.

A mi madre Maura, por su perseverancia, sus consejos y apoyo incondicional, y sobretodo su gran amor.

A mis hermanas; Tracy porque desde niña me brindaste protección y Ariana, porque aunque te toco perder al soporte de tu vida es admirable tu fortaleza y porque sé que lograras tus sueños.

A mi tía Julia (†), la mujer que me dedico su tiempo, que formó parte de mi hogar y cuyas enseñanzas y la formación que me inculco marcaron mi personalidad, porque ante la adversidad no se derrumbó y hasta el final fue digna de admiración.

## Agradecimientos

Gracias a la Universidad Católica Santa María por acogerme en su seno todos estos años, gracias al equipo de docentes que impartieron los conocimientos en las diversas materias de mi carrera profesional.

Gracias al MCPHS-UNIVERSITY por darme la oportunidad de este proyecto de tesis en la persona del Dr. Alejandro Pino Figueroa quien, me apoyo en todo brindándome su disponibilidad y paciencia.

Infinito agradecimiento al PhD. José Villanueva Salas, por aceptar ser mi guía en la realización de esta tesis, por su colaboración y orientación en el desarrollo de esta investigación sino también por apoyarme en la formación como profesional.

A mis jurados, por su dedicación haciendo espacio en sus labores colaborando en la revisión de mi trabajo de investigación y la orientación necesaria para lograr mi meta propuesta.

“Tu conocimiento no depende de lo que ganes en la lucha,  
sino de la fuerza interior que desarrollas para triunfar”

**Annie Besant**



## ÍNDICE

RESUMEN .....	VIII
ABSTRACT .....	X
INTRODUCCIÓN .....	XIII
HIPÓTESIS .....	XIV
OBJETIVOS .....	XV

## CAPÍTULO I

### MARCO TEÓRICO

1. Cáncer de mama.....	1
1.1. Características Anatómicas.....	
1.2. Epidemiología.....	2
1.3. Etiología y Patogénesis.....	3
1.4. Factores de Riesgo.....	6
1.5. Síntomas y signos .....	7
1.6. Diagnostico.....	8
1.7. Estadificación del cáncer .....	10
1.8. Tratamiento.....	13
2. Sistema endocanabinoide .....	17
3. Ácido graso de amida hidrolasa (FAAH) .....	20
4. Celecoxib .....	21
4.1. Celecoxib como inhibidor de la COX-2 .....	
4.2. Celecoxib y el cáncer de mama .....	22
4.3. Efectos secundarios del celecoxib .....	
5. Macamidas .....	24
5.1. Descripción botánica .....	
5.2. Origen, Distribución y cultivación .....	26
5.3. Fitoquímica .....	
5.4. Actividad Farmacológica .....	
6. Cultivo celular.....	28
6.1. Cultivo celular primario .....	29
6.2. Línea Celular .....	
6.3. Pasaje Celular .....	
6.4. Células MDA-MB-231 .....	
6.5. Ensayo de viabilidad celular (MTS).....	30
6.6. Ensayo FAAH .....	31

## CAPÍTULO II

### MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales, reactivos y equipos .....	32
1.1. Material Biológico y otros	
1.2. Reactivos	
1.3. Equipos	
2. Métodos.....	33
2.1. Cultivo celular	
2.2. Soluciones a distintas concentraciones de las macamidas .....	37
2.3. Método del FAAH.....	38
2.4. Efecto de las Macamidas 71 en combinación del Celecoxib sobre la viabilidad Celular .....	40
2.5. Viabilidad celular frente al tratamiento.....	42
2.6. Métodos estadísticos.....	43

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Obtención del cultivo celular .....	44
1.1. Células MDA-MB-231	
2. Exclusión de viabilidad celular .....	45
2.1. Conteo de células viables en la suspensión celular	
3. Ensayo del FAAH .....	47
4. Efecto de la Macamida 71 y el Celecoxib sobre la viabilidad celular .....	57
4.1. Efecto de las Macamidas sobre la viabilidad celular	
4.2. Efecto del Celecoxib sobre la viabilidad celular .....	62
4.3. Efecto de la combinación de la Macamida 71 y el Celecoxib sobre la viabilidad de células MDA-MB-231.....	68
CONCLUSIONES .....	74
SUGERENCIAS .....	75
BIBLIOGRAFÍA .....	76
ANEXOS .....	82

## RESUMEN

El cáncer de mama es la neoplasia maligna más común en las mujeres de los Estados Unidos, con más de 40 000 muertes cada año. Estos tumores de mama están compuestos por poblaciones fenotípicamente de diversas células de cáncer de mama. Los estudios han demostrado que la planta peruana *Lepidium meyenii* (Maca) posee una propiedad citoprotectora *in vitro* e *in vivo*. La implicación del sistema endocannabinoide ha indicado ser un posible mecanismo de acción; ya que, algunas Macamidas demostraron tener una relación dosis-dependiente de la actividad inhibidora de la FAAH. Algunos de los constituyentes lipofílicos de la Maca, tales como las Macamidas, han sido reportados por poseer propiedades farmacológicas significativas como se muestra en el cultivo celular. Sin embargo, su amida hidrolasa de ácido graso (FAAH) no determinó la actividad inhibitoria.

Esta tesis tiene como objetivo explorar el efecto inhibitorio de las Macamidas sobre la enzima FAAH y la relación entre las diferentes concentraciones de la Macamida 71 sobre las células MDA- MB-231 del cáncer de mama.

Se tuvo como alternativa tres tipos de Macamidas como tratamiento para el cáncer de mama, las cuales fueron sometidas a un ensayo para determinar la capacidad inhibitoria sobre la enzima FAAH y de esta manera lograr obtener la Macamida con mayor efectividad. La actividad inhibitoria de la enzima FAAH es apoyada por la estadística de significancia, el cual indicó una diferencia significativa en la viabilidad entre el control y los grupos de tratamiento ( $p < 0.05$ ).

Este estudio se centró en la comprensión de la viabilidad de las células MDA-MB-231 en 24, 48 y 72 tras ser expuestas a la Macamida con mayor actividad inhibitoria (Macamida 71) de la enzima FAAH en las siguientes concentraciones: 1, 3, 10 y 30  $\mu\text{M}$ . Para determinar los efectos sobre la viabilidad celular, se realizó un ensayo de proliferación celular de MTS.

Para establecer un perfil adecuado del tratamiento, se usó diferentes

concentraciones del Celecoxib ante la viabilidad de las células MDA-MB-231 en 24, 48 y 72 horas, se realizó un ensayo de proliferación celular MTS. Los inhibidores de la COX-2, como el Celecoxib están siendo utilizados en terapias del cáncer afectando el crecimiento tumoral.

Además, del efecto producido por la Macamida (con mayor actividad inhibitoria sobre la enzima FAAH) y el Celecoxib en la viabilidad de las células MDA-MB-231 individualmente, se optó en combinar ambos tratamientos para potenciar el efecto antineoplásico con concentraciones de 3, 10, 30 y 90  $\mu\text{M}$  de la Macamida con mayor efectividad sobre la enzima FAAH con 10  $\mu\text{M}$  del Celecoxib para de esta manera comprobar la existencia de algún tipo de sinergismo.

El presente estudio concluye que la Macamida 71 tiene el mayor efecto inhibitorio sobre la enzima FAAH, y al evaluar su actividad en la línea celular MDA- MB-231 produce una disminución significativa de la viabilidad celular al igual que el Celecoxib, sin embargo la combinación de ambos tratamientos no tiene sinergismo.

Palabras Clave: Viabilidad celular, Macamida, Celecoxib.

## ABSTRACT

Breast cancer is the most common malignancy in women in the United States, with more than 40,000 deaths each year. These breast tumors are composed of phenotypically populations of various breast cancer cells. Studies have shown that the peruvian plant *Lepidium meyenii* (Maca) possesses a cytoprotective property *in vitro* and *in vivo*. The involvement of the endocannabinoid system has indicated to be a possible mechanism of action, as some macamides demonstrated a dose-dependent relationship of FAAH inhibitory activity. Some of the lipophilic constituents of Maca, such as macamides have been reported to possess significant pharmacological properties as shown in cell culture. However, its fatty acid amide hydrolase (FAAH) did not determine inhibitory activity.

This thesis aims to explore the inhibitory effect of Macamides on the FAAH enzyme and the relationship between the different concentrations of macamide 71 on breast cancer MDA-MB-231 cells.

Three types of macamides as a treatment for breast cancer were used as alternatives, which were tested to determine the inhibitory capacity on the enzyme FAAH and in this way to obtain macamide with more effectiveness. The inhibitory activity of the enzyme FAAH is supported by the statistic of significance, which indicated a significant difference in viability between control and treatment groups ( $p < 0.05$ ).

This study focused on understanding the viability of MDA-MB-231 cells at 24, 48 and 72 after being exposed to the macamide with the highest inhibitory activity (Macamide 71) of the enzyme FAAH in the following concentrations: 1, 3, 10 and 30  $\mu\text{M}$ . To determine the effects on cell viability, an MTS cell proliferation assay was performed.

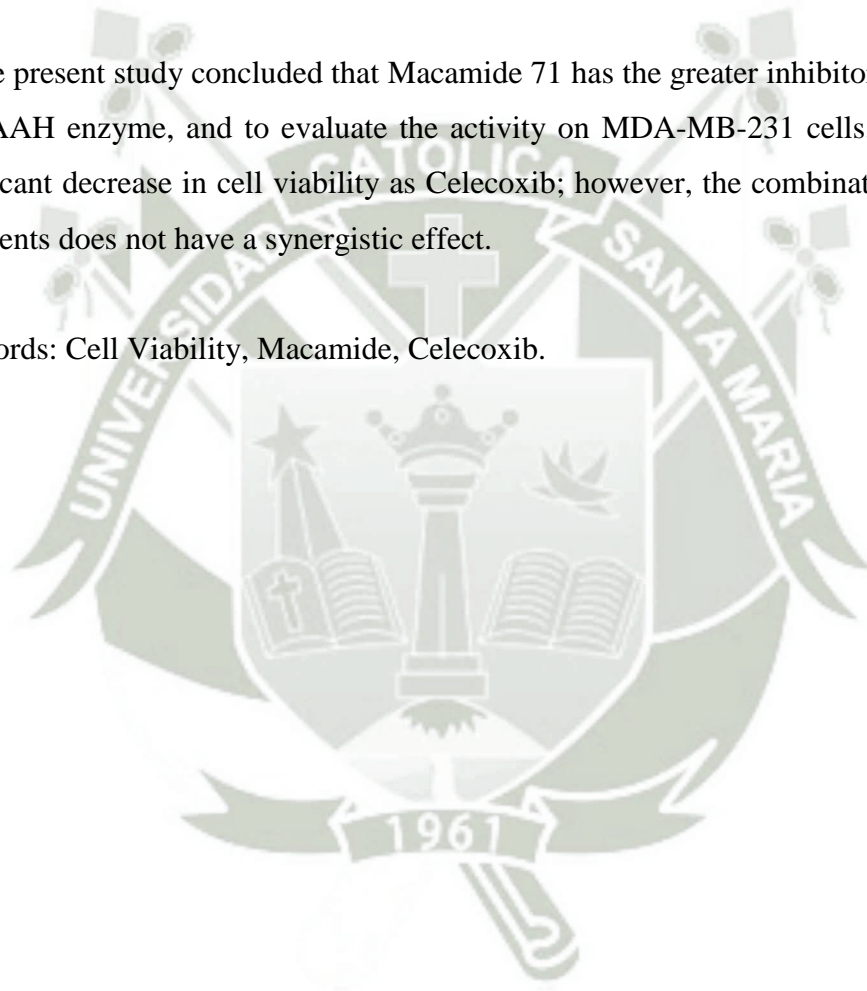
In order to establish an adequate treatment profile, different concentrations of Celecoxib were used for the viability of MDA-MB-231 cells at 24, 48 and 72 hours; an MTS cell proliferation assay was performed. COX-2 inhibitors, such as Celecoxib,

are being used in cancer therapies that affect tumor growth.

In addition, the effect of macamide (with greater inhibitory activity on the FAAH enzyme) and Celecoxib on the viability of MDA-MB-231 cells individually, it was decided to combine both treatments to enhance the antineoplastic effect with concentrations of 3, 10, 30 and 90  $\mu\text{M}$  of the Macamide with greater effectiveness on the enzyme FAAH with 10  $\mu\text{M}$  of Celecoxib in order to verify the existence of some kind of synergism.

The present study concluded that Macamide 71 has the greater inhibitory effect on the FAAH enzyme, and to evaluate the activity on MDA-MB-231 cells, produce a significant decrease in cell viability as Celecoxib; however, the combination of both treatments does not have a synergistic effect.

Keywords: Cell Viability, Macamide, Celecoxib.



## INTRODUCCIÓN

En el continente americano, el cáncer es la segunda causa de muerte. Se estima que 2,8 millones de personas son diagnosticadas cada año y 1,3 millones de personas fallecen por ello.<sup>1</sup> Asimismo, según la OMS, el cáncer de mama es la neoplasia maligna más común en las mujeres de los Estados Unidos, con más de 40 000 muertes cada año. En el Perú se presentan cerca de 4 000 nuevos casos cáncer de mama cada año y fallecen alrededor de 4 mujeres diariamente.<sup>2,3</sup>

Los pacientes con cáncer de mama en la misma etapa de la enfermedad pueden tener respuestas diferentes al tratamiento. Los predictores más fuertes para las metástasis (por ejemplo, el estado de los ganglios linfáticos y el grado histológico) no se clasifican con precisión debido al comportamiento clínico de los tumores de mama. La quimioterapia o terapia hormonal reduce el riesgo de metástasis a distancia en aproximadamente un tercio. Ninguna de las firmas de la expresión génica del cáncer de mama reportadas hasta la fecha permite estrategias de terapia adaptadas al paciente.<sup>3</sup>

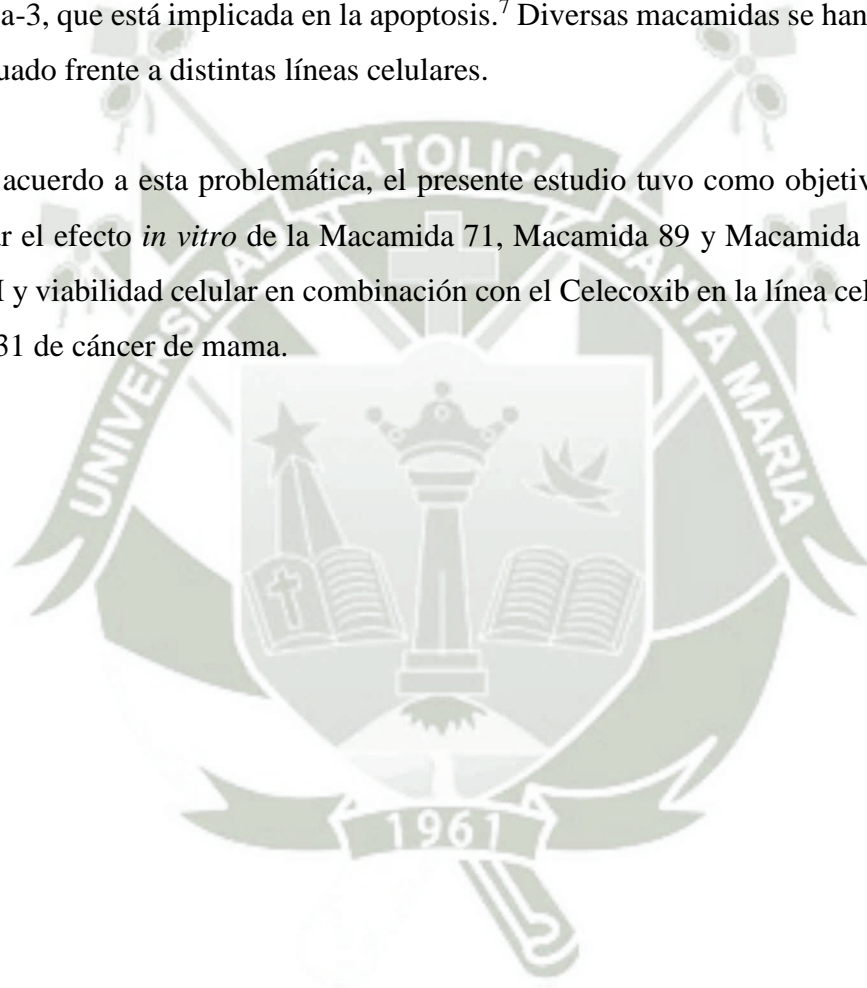
Sin embargo, se ha observado que los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) reducen el riesgo relativo de cáncer de mama. Esto motivó hacer uso de un quimiopreventivo como lo es el Celecoxib, un bloqueador específico de la ciclooxigenasa 2 (COX-2), contra la carcinogénesis mamaria.<sup>4</sup>

Los inhibidores de la COX-2, como lo es el Celecoxib, están siendo investigados ampliamente como agentes contra el cáncer. En el presente estudio se evaluó los mecanismos por los cuales un inhibidor altamente selectivo de la COX-2, el Celecoxib, afecta el crecimiento tumoral de dos líneas de células de cáncer de mama humano invasivas diferencialmente.<sup>5</sup> Asimismo, el estudio del sistema endocannabinoide reveló que los cannabinoides son capaces de inducir un aumento dependiente de la concentración de actividad FAAH en células cancerosas.<sup>6</sup>

Los tratamientos convencionales para el cáncer de mama son costosos y tienen efectos secundarios graves. Tratamientos naturales no convencionales han ganado

amplia aceptación debido a su promesa de una cura con efectos secundarios mínimos o no, pero presentan poca evidencia científica. Uno de estos remedios comunes es la semilla de la planta *Lepidium sativum*, la cual puede actuar contra el cáncer de mama, donde se encontró que la fragmentación del ADN resultó para ambas células (MCF-7 y HFS), de una manera dependiente del tiempo y de la dosis. Ambas células, en todas las concentraciones de extracto, no mostraron diferencias significativas en el número de células vivas, muertas, apoptóticas y necróticas. Finalmente, los resultados pueden indicar que los cambios apoptóticos en MCF-7 pueden ser independientes de la caspasa-3, que está implicada en la apoptosis.<sup>7</sup> Diversas macamidas se han sintetizado y evaluado frente a distintas líneas celulares.

De acuerdo a esta problemática, el presente estudio tuvo como objetivo principal evaluar el efecto *in vitro* de la Macamida 71, Macamida 89 y Macamida 94 sobre el FAAH y viabilidad celular en combinación con el Celecoxib en la línea celular MDA-MB-231 de cáncer de mama.



## HIPÓTESIS

Dado que existen antecedentes investigativos que indican la actividad inhibitoria de las macamidas sobre líneas celulares de cáncer de mama, y que el Celecoxib ha sido usado en el tratamiento de este cáncer; es probable que la combinación de las macamidas y el Celecoxib modifique su actividad inhibitoria sobre las células cancerosas de mama MDA-MB-231.



## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL:

- Evaluar el efecto in vitro N-(Piridin-3-ilmetil) oleamida, N-(6-Cloropiridin-3-ilmetil) oleamida y (9Z, 12Z)-N-(Piridin-3-ilmetil) octadeca-9,12-dienamida sobre el FAAH y viabilidad celular en combinación con el Celecoxib en la línea celular MDA-MB-231 de cáncer de mama.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Evaluar el efecto de las tres Macamidas sintéticas sobre la actividad inhibitoria de la enzima amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH).
- Analizar el efecto de las Macamidas y el Celecoxib individualmente en la viabilidad celular de las MDA-MB-231.
- Evaluar la actividad de las Macamidas en combinación con el Celecoxib provocando la sensibilización de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231.

## CAPÍTULO I

### MARCO TEÓRICO

#### 1. Cáncer de mama

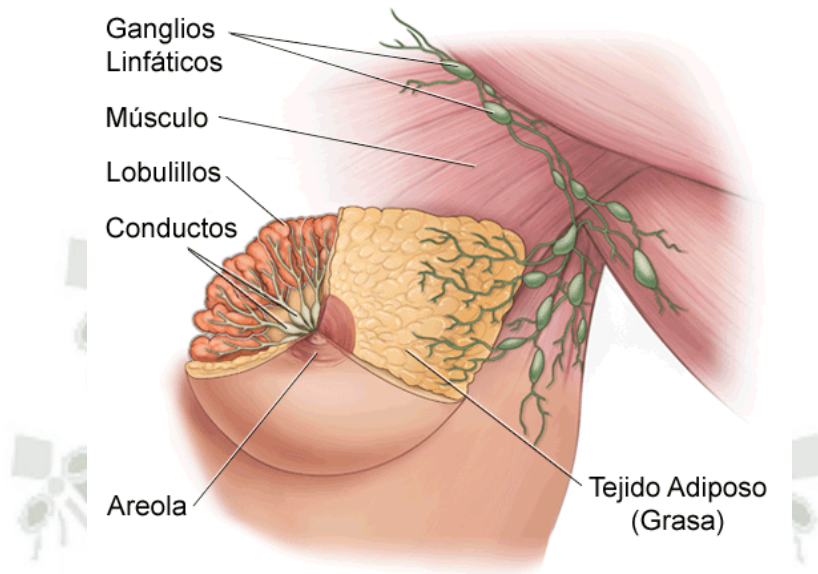
El cáncer de mama o de seno es uno de los cánceres más comunes que afectan a las mujeres más que en hombres.<sup>8</sup> Inicia cuando las células en el pecho comienzan a crecer fuera de control y de manera acelerada. Por lo general, estos tumores tienden a malignizarse invadiendo tejidos circundantes o incluso extenderse a otras áreas distantes del cuerpo, llegando así a un proceso de metástasis. Como otros tumores malignos, el cáncer de mama es consecuencia de alteraciones en la estructura y función de los genes. Los carcinomas de mama suponen más de 90% de los tumores malignos.<sup>9</sup>

##### 1.1. Características Anatómicas

La mama es una glándula situada en la cara anterior del tórax, su porción externa comprende el pezón, en el cual drenan los conductos de la leche y la areola (círculos oscuros que rodean el pezón). El interior de la mama está compuesto por tejido de fibra adiposo, múltiples lóbulos y lobulillos unidos por ductos o conductos galactóforos que llevan la leche hacia pezón. Esta glándula está rodeada de tejido graso que le da su consistencia y volumen. La mama a su vez, está irrigada por dos arterias (axilar y la mamaria interna) y una red de venas que drenan a las venas axilar y la de la mamaria interna. También, está constituida por vasos linfáticos que recogen la linfa. Los vasos linfáticos confluyen en los ganglios linfáticos que se sitúan en la axila, en ambos lados del esternón y en la clavícula.<sup>10,11</sup> En la **Fig. 1** se muestra la ilustración de la anatomía del seno y su constitución.

El proceso canceroso inicia a partir de diferentes partes de la mama. En la mayoría de los cánceres de mama el desarrollo del proceso cancerígeno inicia en los conductos que llevan la leche al pezón y toman el nombre de cánceres ductales. Otros comienzan en las glándulas que sintetizan la leche materna y es llamado cáncer lobular. Un pequeño número de cánceres comienza en otros tejidos de la mama tales

como sarcomas y linfomas. Cabe destacar, que la mayoría de los bultos en los senos no son cáncer, ya que en ocasiones suelen ser benignos, sin embargo pueden aumentar el riesgo de contraer cáncer de mama.<sup>12</sup>



**Fig. 1** Vista Frontal del seno.<sup>13</sup>

## 1.2. Epidemiología

Gran parte del mundo presenta una creciente incidencia de cáncer de mama, pero con recursos limitados en su tratamiento. La mayoría de los nuevos casos y de las muertes por cáncer de mama se producen con más frecuencia en las regiones menos desarrolladas del mundo.<sup>14</sup> En el Perú en los años 1990-1999, en mujeres, el cáncer de mama ocupó el primer lugar con una tasa de incidencia de 24,28 por 100 000 habitantes, seguido del cáncer de cérvix tomando como referencia a Lima Metropolitana. Esta preocupante tendencia se mantuvo creciendo y tomando un rostro femenino, pues cada día afecta más a mujeres, sea cual fuese su condición social o económica.<sup>14,15</sup>

El cáncer de mama representa el 10% de todos los cánceres diagnosticados anualmente a nivel mundial. En el año 2000 constituyeron el 22% de todos los nuevos tipos de cáncer en mujeres, lo que lo convierte en el más común. Se observaron

aumentos claros en la incidencia y la mortalidad por cáncer de mama hasta principios de los años ochenta tanto en los países desarrollados y subdesarrollados. Las tasas de mortalidad por cáncer de mama en Europa occidental y América del Norte son del orden de 15-25 por 100 000 mujeres, siendo un poco más de un tercio de las tasas de incidencia, que es de aproximadamente 50-60 por 100 000 casos.<sup>16,17</sup>

La incidencia del cáncer de mama en los Estados Unidos ha ido aumentando gradualmente durante las últimas tres décadas, se estima que el cáncer de mama cobró la vida de más de 39 000 hombres y mujeres en 2012, con más de 229 000 nuevos diagnósticos en el mismo año.<sup>17</sup>

En todo el mundo, se estima que 1,4 millones de mujeres al año reciben un diagnóstico de cáncer de mama, mientras que 458 000 mueren de la enfermedad. En promedio, 1 de cada 8 mujeres será diagnosticado con cáncer de mama en su vida. Las proyecciones hacia el año 2 020 ascienden a una tasa equivalente de 33,12 x 100 mil habitantes a nivel del mundo.<sup>18</sup>

### **1.3. Etiología y Patogénesis**

Se ha relacionado el desarrollo de cualquier tipo de cáncer por alteraciones genéticas en el ADN y ello puede aumentar significativamente el riesgo de cáncer de mama. Las hormonas desempeñan un rol importante en los diversos tipos de cáncer, aunque no se conoce totalmente cómo ocurre esto en el cáncer de mama.<sup>19</sup>

#### **1.3.1. Mutaciones en el ADN**

Las células de los senos normales se convierten en cancerosas debido a cambios (mutaciones) a nivel del ADN. Los genes tienen las instrucciones sobre cómo funcionan nuestras células.<sup>12</sup> Algunas mutaciones en el ADN son hereditarias, es decir se adquieren de los padres. Esto significa que las mutaciones están en cada célula del cuerpo. Un ADN mutado puede dar lugar a genes mutados.

Los genes controlan: cuándo crecen nuestras células, cuándo se dividen para formar nuevas células y cuándo mueren. Los cambios o las alteraciones en estos genes están vinculados al cáncer.<sup>19,20</sup>

Son mutaciones habituales en los genes BRCA1 y BRCA2. Las mutaciones en el gen BRCA1 predisponen predominantemente al cáncer de mama y cáncer de ovario, mientras que las mutaciones en el gen BRCA2 predisponen al cáncer de mama, tanto en mujeres como en varones. Aproximadamente del 5 al 10% de todas las mujeres con cáncer de mama pueden tener mutaciones de las células de la línea germinal en los genes BRCA1 y BRCA2.<sup>21</sup> Estos genes funcionan como genes supresores de tumores, es decir actúan dependiente del ciclo celular y se especula que los dos participan, tanto en la activación de la transcripción de diversos genes, así como en la reparación del DNA. El manejo de pacientes con mutaciones en estos genes debe efectuarse por un equipo multidisciplinario. No obstante, la asignación de riesgo, al asesoramiento genético debe ser realizado de manera cuidadosa.<sup>19,21</sup>

### **1.3.2. Oncogenes**

Los protooncogenes son genes que influyen en el crecimiento celular. Cuando un protooncogén padece de una alteración genómica, la célula crece fuera de control y de manera acelerada, lo que conlleva al desarrollo de un oncogén, principal causante del cáncer. Estas alteraciones son usualmente eventos somáticos, aunque las mutaciones en la línea germinal pueden predisponer a una persona a heredar un tipo de cáncer. Un solo cambio genético rara vez es suficiente para el desarrollo de un tumor maligno. La mayoría de las pruebas apuntan a un proceso de múltiples etapas de alteraciones secuenciales.<sup>22,23</sup>

### **1.3.3. Genes supresores**

Los genes supresores de tumores son genes normales que desaceleran la división celular, reparan los errores en el ADN, o indican a las células cancerosas cuándo deben morir.<sup>12</sup>

#### 1.3.4. Cambios genéticos hereditarios

En la actualidad existen pruebas genéticas que pueden identificar a algunas mujeres que han heredado las mutaciones en genes supresores de tumores como el BRCA1 o el gen BRCA2 (con menor frecuencia en genes PTEN o TP53). Dado el caso, se puede tomar medidas preventivas para disminuir el riesgo de desarrollar el cáncer de seno, o identificar cambios en sus senos a fin de ayudar a descubrir el cáncer en una etapa más temprana para que esta pueda ser tratable.<sup>24</sup>

El BRCA1 se localizó en cromosoma 17q por enlace genético en 1990 y posteriormente se clonó en 1994. Estudios realizados hasta la fecha sugieren que el gen BRCA1 es el causante de la mayoría de las familias que contienen múltiples casos de cáncer de mama y de ovario.<sup>25</sup>

El BRCA2 se localizó en el cromosoma 13q en 1994 y fue clonado en 1995. Hay particularmente evidencia clara de que los genes BRCA1 y BRCA2 probablemente se involucran en la mayoría de los cánceres de mama y ovario. Las mutaciones en el gen BRCA2 contienen casos masculinos. Con más frecuencia, las mutaciones de baja penetrancia o variaciones genéticas son un factor en el desarrollo de cáncer. Puede que cada una de estas tenga un pequeño efecto en el desarrollo del cáncer en cualquier persona, aunque el efecto general en la población puede ser considerable ya que las mutaciones son comunes, y las personas a menudo tienen más de una al mismo tiempo. Los genes involucrados pueden afectar los niveles hormonales, el metabolismo u otras cosas que impactan los factores de riesgo para el cáncer de seno. Estos genes pueden causar la mayor parte del riesgo de cáncer de seno que abunda en familias.<sup>8,19,24,25</sup>

Por otro lado, los cambios genéticos adquiridos surgen en las células del seno a lo largo de la vida de una mujer y no suelen ser heredados. Estas mutaciones puede ser el resultado de diversos factores, como radiaciones o sustancias químicas que contribuyen al desarrollo del cáncer.<sup>12</sup>

## **1.4. Factores de Riesgo**

Toda mujer tiene algún grado de riesgo de desarrollar cáncer del seno durante su vida y ese riesgo aumenta a medida que la mujer tiene más años. Sin embargo, el riesgo no es el mismo para todas las mujeres, ya que existen diversos factores a saber que aumentan las probabilidades de desarrollar esta enfermedad y que a continuación se señalan.<sup>26</sup>

### **1.4.1. Historia Familiar**

Las mujeres con antecedentes hereditarios de cáncer de mama tienen mayor riesgo de padecer la enfermedad. Otras familias tienen un patrón de herencia autosómico dominante y son frecuentes las mutaciones en los genes BCRA1 y BRCA2.<sup>18,19</sup>

### **1.4.2. Género**

Las mujeres tienen mayor riesgo de desarrollar el cáncer de mama, por poseer un tejido mamario más amplio que de los hombres y por la hormona femenina que es el estrógeno que promueve el desarrollo de ello.<sup>26</sup>

### **1.4.3. Alteraciones Genéticas**

Las alteraciones específicas en ciertos genes hacen a la mujer más susceptible de desarrollar cáncer del seno.<sup>27</sup>

### **1.4.4. Biopsias Anormales**

Las mujeres con ciertas condiciones anormales en el seno, como hiperplasia tienen un riesgo mayor. Esto sólo se puede determinar mediante un estudio anatómico-patológico de una biopsia de mama. Las mujeres de 45 años de edad o

mayores cuya mamografía muestra una densidad mayor del tejido del seno tienen un riesgo elevado.<sup>20</sup>

#### 1.4.5. Estilo de vida

El consumo del alcohol, el sobrepeso después de la menopausia y fumar incrementan el riesgo de desarrollar un cáncer de mama.<sup>20,27</sup>

#### 1.4.6. Historia Reproductiva

Las mujeres que alcanzan la menarquia a una temprana edad y las mujeres que llegan a la menopausia a una edad avanzada tienen más posibilidades de desarrollar el cáncer de mama.<sup>28</sup>

El cáncer de mama también se ha asociado con el riesgo de leucemia mielógena aguda, y es parte de un síndrome de cáncer familiar que incluye sarcomas de tejidos blandos. En adición, las mujeres que han tenido un carcinoma en las glándulas salivales tienen un riesgo de desarrollar cáncer 4 veces más que el de la población general. Hasta la actualidad no se conoce la causa específica del cáncer de mama, no obstante se vincula a varios factores relacionados directa o indirectamente con las hormonas reproductivas como lo son los estrógenos y la progesterona.<sup>28</sup>

### 1.5. Síntomas y signos

Con los avances en detección y tratamiento, el número de mujeres que sobreviven al cáncer de mama se ha incrementado significativamente en los últimos años. El cáncer de mama puede darse en una etapa precoz y con una sintomatología poco específica o no podría presentarla, lo cual podría dificultar su diagnóstico en una fase inicial. El 80% de los cánceres de mama se diagnostican por los síntomas en este caso un bulto indoloro. El 10% manifiesta tener dolor sin bulto perceptible, hipersensibilidad, calor, secreción del pezón o retracción de la piel.<sup>28</sup> En la **Tabla N° 1** se señalan estos síntomas y signos.

**Tabla N° 1** Síntomas y signos del cáncer de mama

<b>Estadio temprano</b>	<b>Avanzado</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Masa del seno.</li> <li>• Secreción del pezón.</li> <li>• Crusting, descamación, descamación del pezón.</li> <li>• Dolor de seno (raro).</li> <li>• Inversión del pezón.</li> <li>• Soltura o retracción de la piel.</li> <li>• Mamografías anormales, micro calcificaciones sospechosas, masas, densidades asimétricas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cambios en el tamaño o contorno de la mama.</li> <li>• Eritema de la mama.</li> <li>• Lupus axilar o supraclavicular</li> </ul>

Fuente: Ponirovskaya (2000)

## 1.6. Diagnóstico

### 1.6.1. Mamografía

Muchos estudios clínicos han demostrado que el pronóstico del cáncer de mama se relaciona con el estadio del diagnóstico y tratamiento. La mamografía es un método de detección de cáncer de mama en una etapa temprana, incluso en una etapa in situ, y por lo tanto tiende a ser la principal evaluación radiológica en la evaluación de pacientes con anomalías de la mama. Otras modalidades de imagen se han desarrollado para paliar sus deficiencias en la diferenciación entre quistes y tumores sólidos, siendo el método más empleado el ultrasonido.<sup>29</sup>

La mamografía (también llamada mastografía) es una imagen plana de la glándula mamaria obtenida con rayos X.<sup>30</sup> La imagen se forma cuando los rayos X atraviesan la mama. La imagen bidimensional de radiación atenuada por la mama incide sobre el receptor de imagen y allí se forma una imagen latente que es hecha visible por un proceso químico o electrónico. Un estudio mastográfico de escrutinio consiste de 2 pares de imágenes: una proyección cráneo-caudal y una medio-lateral-oblicua, para cada mama.<sup>29,30</sup>

La mamografía es un método de imagen por rayos X que se utiliza para examinar los senos para la detección temprana de cáncer y otras enfermedades del seno. Se usa como herramienta tanto de diagnóstico como de cribado.<sup>31</sup> En un mamograma, se coloca el seno del paciente sobre una placa de soporte plana y se comprime con otra placa paralela, una máquina de rayos X produce una pequeña dosis de rayos X que atraviesan el seno hacia un detector ubicado en el lado opuesto. Estas imágenes tienen el nombre de mamograma de película. Las áreas de baja densidad, como el tejido adiposo, aparecen translúcidas, mientras que las áreas de tejido denso, como el tejido conectivo y glandular o los tumores, aparecen más blancas en un fondo negro. De esta manera se identifica las posibles anomalías que podrían llevar a un cáncer de mama.<sup>32</sup>

### **1.6.2. Ecografía**

La ecografía envía ondas sonoras de alta frecuencia a través de la mama y las convierte en imágenes en una pantalla de visualización. El uso de la ecografía mamaria no sólo se limita a la diferenciación entre lesiones sólidas versus quísticas, sino que, ofrece detalles morfológicos adicionales y mediante Doppler de color evalúa la vascularización de los nódulos sólidos, permitiendo una mejor distinción entre lesiones benignas y malignas.<sup>32</sup>

### **1.6.3. Resonancia Magnética Nuclear**

La resonancia magnética nuclear de la mama, es considerada una técnica de diagnóstico por imágenes que complementa a la mamografía desde hace más de una década. No obstante, suele ser una evaluación poco accesible por el costo elevado y su disponibilidad.<sup>32</sup>

La resonancia magnética de mama es técnicamente exigente y se beneficia de estrategias de imagen avanzadas (imagen en paralelo), gradientes potentes ( $> 20$  mT/m) y alto campo ( $> 1$ T). Deben emplearse bobinas de superficie receptoras específicas para el estudio de las mamas. Las bobinas multielementos ofrecen mayor relación señal-ruido y la posibilidad de imagen en paralelo.<sup>33</sup>

#### 1.6.4. Biopsia

La mayoría de los resultados de biopsia no indican que se trata de cáncer, pero esta evaluación es la única manera de saber con certeza si hay o no cáncer. Durante una biopsia, se obtiene células del área que causa sospecha para que se puedan examinar en un laboratorio, y así saber si existen células cancerosas. Diversas técnicas indican la aspiración con aguja fina, la biopsia nuclear y la excisional o incisional.<sup>33</sup> La citología en la biopsia con aspiración con aguja fina es rápida y ayuda a confirmar la presencia de un carcinoma. En la actualidad esta técnica es la más favorable para detectar o diferenciar tumores benignos y malignos.<sup>12,34</sup>

#### 1.7. Estadificación del cáncer

Se han tomado como referencia los estadios establecidos por el Comité Conjunto Americano del Cáncer basados en la clasificación TNM edición del 2010.

##### 1.7.1. Tumor (T)

**Tabla N° 2** Descripción de un tumor

<b>Tumor</b>	<b>Descripción</b>
TX	No se puede evaluar el tumor primario.
TO	No hay evidencia de cáncer en la mama.
Tis	Se refiere al carcinoma in situ. El cáncer se limita a los conductos o los lobulillos del tejido mamario y no se ha diseminado al tejido circundante de la mama.
T1	La parte invasiva del tumor en la mama mide 20 milímetros (mm) o menos en su área más ancha.
T2	La parte invasiva del tumor mide más de 20 mm pero menos de 50 mm.
T3	La parte invasiva del tumor mide más de 50 mm.
T4	El tumor se extiende fuera del seno, hacia las arterias o venas principales que se encuentran cerca de él. El tumor T4 no se puede extirpar por completo con una cirugía.

Fuente: La Rosa (1991)

Mediante el sistema TNM, se utiliza la “T” más una letra o número de 0 a 4 para describir el tamaño y la ubicación del tumor.<sup>34</sup>

### 1.7.2. Ganglio (N)

La “N” en el sistema TNM corresponde a la abreviación para ganglio linfático, que forma parte del sistema inmunitario del cuerpo ya que tiene por función combatir las infecciones y las enfermedades.<sup>34</sup>

**Tabla N° 3** Descripción de un ganglio linfático

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

Fuente: La Rosa (1991)

### 1.7.3. Metástasis (M)

La “M” del sistema TNM indica si el cáncer se ha diseminado a otras partes del cuerpo, lo que se conoce como metástasis a distancia.<sup>12</sup>

**Tabla N° 4** Descripción de un cáncer diseminado

<b>Ganglio</b>	<b>Descripción</b>
MX	No se puede evaluar la metástasis distante.
M0	El cáncer no se ha diseminado a otro lado del cuerpo.
M1	El cáncer se ha diseminado a otras partes del cuerpo, incluidos los ganglios linfáticos distantes..

Fuente: American Cancer Society (2017)

#### 1.7.4. Agrupación de los estadios del cáncer

Los médicos dan el estadio del cáncer mediante la clasificación T, N y M.<sup>35</sup>

**Tabla N° 5** Clasificación de los estadios del cáncer

Estadio	Descripción
Estadio 0	Se refiere al cáncer in situ, se limita a los conductos y lobulillos del tejido mamario y que no se ha diseminado al tejido circundante de la mama. También se denomina cáncer no invasivo (Tis, N0, M0).
Estadio IA	El tumor es pequeño, invasivo y no se ha diseminado a los ganglios linfáticos (T1, N0, M0).
Estadio IB	El cáncer se ha diseminado solo a los ganglios linfáticos y mide más de 0.2 mm, pero menos de 2 mm. (T0 o T1, N1mic, M0).
Estadio IIA	<ul style="list-style-type: none"> <li>No hay evidencia de un tumor en la mama, pero el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos axilares (T0, N1, M0).</li> <li>El tumor mide 20 mm o menos y se ha diseminado a los ganglios linfáticos axilares (T1, N1, M0).</li> <li>El tumor mide más de 20 mm pero menos de 50 mm y no se ha diseminado a los ganglios linfáticos axilares (T2, N0, M0).</li> </ul>
Estadio IIB	<ul style="list-style-type: none"> <li>El tumor mide más de 20 mm. pero menos de 50 mm y se ha diseminado a un número de uno a tres ganglios linfáticos axilares (T2, N1, M0).</li> <li>El tumor mide más de 50 mm pero no se ha diseminado a los ganglios linfáticos axilares (T3, N0, M0).</li> </ul>
Estadio III	El tumor se ha diseminado a las arterias, venas y/o ganglios linfáticos cercanos, pero no a otras partes del cuerpo (T4, N1, M0).
Estadio IV	El tumor puede tener cualquier tamaño y se ha diseminado a otros órganos, como huesos, pulmones, cerebro, hígado, ganglios linfáticos distantes o pared torácica (cualquier T, cualquier N, M1).

Fuente: Junta Editorial del Cáncer (2017)

## 1.8. Tratamiento

### 1.8.1. Tratamientos Locales

#### 1.8.1.1. Cirugía

El manejo quirúrgico ha experimentado una transformación vertiginosa en el tratamiento del cáncer de mama. La cirugía es un tratamiento común para este cáncer, y su propósito primordial es eliminar tanto del cáncer como sea posible. Hay diferentes tipos de cirugías, pero todas tienen el mismo fin, como el de eliminar completamente el cáncer, evaluar para saber si existe la propagación a ganglios linfáticos debajo del brazo y aliviar los síntomas. Asimismo, en la mastectomía la extirpación incluye totalmente el seno, el tejido mamario y en ocasiones otros tejidos cercanos. Hay varios tipos distintos de mastectomías.<sup>12</sup>

#### 1.8.1.2. Radioterapia

La radioterapia es el uso de rayos X u otras partículas con alta potencia para matar las células cancerosas. El tipo más frecuente de tratamiento con radiación se denomina radioterapia con un haz externo, que es radiación administrada desde una máquina externa al cuerpo. Los Estados Unidos en 2002, aproximadamente el 42% de las mujeres con cáncer de mama recibieron radioterapia adyuvante después de la cirugía.<sup>36,37</sup>

La radiación adyuvante después de la cirugía conservadora de mama disminuye el riesgo de recidiva local en dos tercios y da como resultado una supervivencia equivalente a la alcanzada por los pacientes tratados con mastectomía.<sup>38</sup> La radiación también se recomienda a pacientes sometidos a una mastectomía para reducir el riesgo de recurrencia y posiblemente mejorar la supervivencia.<sup>39</sup>

Los pacientes con cáncer de mama izquierdo que son tratados con radiación tienen un mayor riesgo de exposición de radiación cardíaca y mayores

tasas de mortalidad cardiovascular que los pacientes con cáncer de mama derecho.<sup>40</sup> La dosis diferencial de radiación cardíaca recibida por pacientes con cáncer de mama izquierdo y derecho, permite a los investigadores utilizar datos observacionales para estimar el riesgo de mortalidad cardíaca por radiación. No existen sesgos de selección conocidos para diferenciar de otro modo a los pacientes por lateralidad tumoral, y se espera una distribución igual de riesgos entre pacientes con tumores de lado izquierdo y derecho.<sup>39,41</sup>

## 1.8.2. Tratamientos Sistémicos

### 1.8.2.1. Quimioterapia

La quimioterapia es un tratamiento con medicamentos contra el cáncer que se pueden administrar por vía intravenosa (inyectados en la vena) o por vía oral. Los medicamentos pasan a través del torrente sanguíneo para llegar a las células cancerosas en la mayoría de las partes del cuerpo.<sup>41</sup>

Después de la cirugía, la quimioterapia adyuvante se utiliza después de la cirugía para tratar de eliminar las células cancerosas que puedan haber quedado o que se hayan propagado, pero que no pueden verse, ni siquiera en estudios por imágenes. Si a estas células se les permitiera crecer, podrían establecer nuevos tumores en otras partes del cuerpo. La quimioterapia adyuvante puede reducir el riesgo de que el cáncer de seno regrese.<sup>42</sup>

Antes de la cirugía (quimioterapia neoadyuvante). Esta terapia es para reducir el tamaño del tumor para posteriormente extirparlo mediante una cirugía menos extensa.<sup>42-44</sup>

Los fármacos más utilizados para la quimioterapia adyuvante y neoadyuvante en el cáncer de mama son: antraciclínicas, como la doxorubicina (Adriamycin) y la epirubicina (Ellence); taxanos, como el paclitaxel (Taxol) y el docetaxel (Taxotere); 5-fluorouracilo (5-FU); Ciclofosfamida (Cytosan); y Carboplatino (Paraplatin).<sup>42</sup>

Algunos medicamentos de quimioterapia útiles en el tratamiento de mujeres con cáncer de seno que se ha propagado son: mitoxantrona (Novantrone); Ixabepilona (Ixempra); paclitaxel ligado a albúmina (nab-paclitaxel o Abraxane); y eribulina (Halaven).<sup>42-44</sup>

Algunos de los posibles efectos secundarios más comunes incluyen: caída de pelo, cambios en las uñas, úlceras en la boca, pérdida o aumento de apetito, náuseas y vómitos.<sup>42-44</sup>

La quimioterapia puede afectar las células productoras de sangre de la médula ósea, lo que causa: aumento de la probabilidad de infecciones, tendencia a presentar moretones o sangrados fácilmente, cansancio y diarrea.<sup>42-44</sup>

### **1.8.3. Terapia hormonal**

Es recomendable posterior a la cirugía para ayudar a reducir el riesgo de que el cáncer regrese. Generalmente se administra por un lapso de 5 años.<sup>45</sup> Los cánceres de mama con receptores de hormonas positivas. Las células cancerosas de mama tienen receptores que se unen a las hormonas estrógeno (cánceres ER-positivo) o progesterona (cánceres PR-positivo). Altos niveles de estrógeno promueven a las células cancerosas a crecer y a propagarse.<sup>46</sup> Existen diferentes tipos de terapia hormonal que utilizan distintas formas para evitar que el estrógeno ayude a que el cáncer se prolifere.<sup>46</sup>

#### **1.8.3.1. Tamoxifeno**

El tamoxifeno bloquea los receptores de estrógeno en las células cancerosas del seno. Evita que el estrógeno se adhiera a las células cancerosas y les indique que crezcan y se dividan. Los efectos secundarios más comunes del tamoxifeno son: cansancio, acaloramientos, secreción o resequeidad vaginal y cambios de humor.<sup>47</sup>

### **1.8.3.2. Fulvestrant (Faslodex)**

El fulvestrant bloquea los receptores de estrógeno, y los elimina temporalmente. El fulvestrant se usa para tratar el cáncer de mama en un estadio metastásico, con más frecuencia después que otros medicamentos hormonales han dejado de surtir efecto. Los efectos secundarios comunes a corto plazo pueden incluir: acaloramientos, sudores nocturnos, náuseas leves y cansancio.<sup>48</sup>

### **1.8.3.3. Inhibidores de la aromatasas**

Los inhibidores de la aromatasas son medicamentos que detienen la producción de estrógeno. Hay tres inhibidores de la aromatasas que parecen todos funcionar casi igual de bien en el tratamiento del cáncer de seno: letrozol (Femara), anastrozol (Arimidex) y exemestano (Aromasin).<sup>49</sup>

### **1.8.3.4. Ablación de los ovarios**

En las mujeres premenopáusicas, la extirpación o suspensión de la función de los ovarios (ablación ovárica), que son la fuente principal de estrógeno, les convierte en posmenopáusicas. Puede que esto permita que algunas terapias hormonales, como los inhibidores de la aromatasas, sean más eficaces.<sup>49</sup>

## **1.8.4. Terapia dirigida**

Las células cancerosas tienen demasiada cantidad de una proteína que promueve el crecimiento, conocida como HER2/neu (o simplemente HER2), en sus superficies. Estos tipos de cáncer, conocidos como cánceres de seno HER2-positivos, tienden a crecer y a propagarse de manera más agresiva. No obstante, se han desarrollado varios medicamentos que atacan a esta proteína: trastuzumab (Herceptin), este medicamento es un anticuerpo monoclonal, una versión artificial de una proteína muy específica del sistema inmunitario.<sup>50</sup> Pertuzumab (Perjeta), este anticuerpo monoclonal se puede administrar con trastuzumab y

quimioterapia. Los efectos secundarios de la terapia dirigida para el cáncer de seno HER2 positivo son: daño cardíaco, cansancio, diarrea e hinchazón de las piernas.<sup>51</sup>

Por otro lado, los inhibidores de CDK4/6, tales como: el palbociclib (Ibrance) y el ribociclib (Kisqali), son medicamentos que bloquean las proteínas en la célula llamadas quinasas dependientes de ciclinas (CDK), particularmente CDK4 y CDK6. El bloqueo de estas proteínas en las células del cáncer de seno con receptores hormonales positivos ayuda a detener la división de las células. Los efectos secundarios de estos medicamentos suelen ser leves y pueden incluir bajos recuentos sanguíneos, cansancio, náuseas, vómitos, úlceras bucales, pérdida de cabello, diarrea y dolores de cabeza. Un recuento muy bajo en el nivel de glóbulos blancos puede aumentar su riesgo de infecciones graves.<sup>52</sup>

## 2. Sistema endocannabinoide

En Europa, se utilizaron a finales del siglo XIX para tratar el dolor, espasmos, asma, trastornos del sueño, depresión y pérdida del apetito. En la primera mitad del siglo XX los cannabinoides redujeron su uso, en parte porque los científicos no pudieron establecer la estructura química de los ingredientes de la planta del cannabis. Sólo en 1964 se definió estereoquímicamente el (-)-trans-delta-9-tetrahidrocannabinol (THC, dronabinol), principal ingrediente activo del cannabis. Esto, seguido por el descubrimiento del propio sistema cannabinoide del cuerpo con receptores específicos y ligandos endógenos, marcó el comienzo de una investigación intensiva sobre el Sistema endocannabinoide y la relevancia clínica de Medicamentos a base de cannabis.<sup>53</sup>

Hasta la fecha, dos receptores cannabinoides endógenos han sido identificados. La ubicación predominantemente céntrica del receptor CB1 se clonó en 1990 y el receptor CB2 periférico, expresado principalmente por células del sistema inmunológico, 3 años después. Mientras tanto, los receptores CB1 también se han demostrado no sólo en el SNC, sino también en muchos órganos y tejidos periféricos. Por ejemplo, en las células inmunes, bazo, glándulas suprarrenales, simpático, ganglios, páncreas, piel,

corazón, vasos sanguíneos, pulmón, partes del tracto urogenital y tracto gastrointestinal.<sup>53</sup>

Sólo la activación del receptor CB1 mas no del receptor CB2 conduce a los bien conocidos efectos psicotrópicos. En 1992 se demostraron agonistas endógenos de los receptores cannabinoides. Los dos endocannabinoides más importantes son anandamida (araquidonoil etanolamida) y 2-araquidonoil-glicerol. Desde el descubrimiento de este complejo receptor cannabinoide endógeno ha sido evidente que los cannabinoides tengan acciones fisiológicas. Hay una gran variedad de interacciones entre los CB1 y muchos neurotransmisores diferentes, así como neuromoduladores en el centro periférico nervioso. Por ejemplo, la activación de Receptores CB1 conduce a la inhibición retrógrada, liberación neuronal de acetilcolina, dopamina, GABA, histamina, serotonina, glutamato, colecistoquinina, D-Aspartato, glicina y noradrenalina. El receptor CB1 es el receptor de la proteína G más ampliamente distribuido en el SNC. Estas interacciones complejas no solo explican el gran número de acciones fisiológicas de Cannabinoides, sino también los efectos farmacológicos de preparaciones de cannabis.<sup>54</sup>

La posible relación entre endocannabinoides y la inmunidad sigue siendo claramente determinada, a pesar del gran interés por los receptores endocannabinoides y los cannabinoides dentro del sistema inmune.<sup>55</sup>

Una serie de líneas de células tumorales además de gliomas demostraron poseer uno o más componentes del endocannabinoide, tales como la capacidad de sintetizar uno o más endocannabinoides, receptores o transportadores de membrana AEA y/o FAAH, que cooperan en la inactivación de endocannabinoides. Sin embargo, ahora parece claro que el efecto de los endocannabinoides sobre las poblaciones de células en proliferación es específico de tipo celular y difiere del efecto de los productos naturales o sintéticos.<sup>55</sup>

Las investigaciones llevadas a cabo durante los últimos años han demostrado que la administración de cannabinoides ejerce una acción inhibitoria del crecimiento en

diversos tipos de células cancerosas. Sin embargo, a pesar de los progresos considerables que se han hecho hacia la comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen a las acciones antitumorales de los cannabinoides, en la actualidad no existe un mecanismo universal por el cual los cannabinoides pueden afectar la viabilidad y la proliferación celular, además no se han establecido relaciones claras entre estructura-actividad.<sup>55</sup>

En algunos casos, los cannabinoides (endo) actúan a través de receptores cannabinoides (CBR) y / o receptores vanilloides (potencial transitorio del receptor vanilloide tipo 1, TRPV1), mientras que en otros estudios se ha informado que inhiben el crecimiento de células tumorales por mecanismos no relacionados con el receptor estímulo. Se ha informado de que en las células tumorales los cannabinoides actúan preferentemente a través de la vía de la ceramida y la muerte apoptótica, pero se han documentado otros mecanismos como la detención del ciclo celular, el daño por estrés oxidativo y el aumento de la concentración de calcio.<sup>54</sup>

Los cannabinoides también pueden actuar dirigiéndose a la angiogénesis y la migración celular, así como interferir con la acción de algunos factores de crecimiento, bloqueando de esta forma los cánceres mitogénicos dependientes del factor. Además, intrigantes investigaciones proponen que los fármacos que modulan el sistema cannabinoide endógeno (ECS) pueden ser utilizados en la terapia del cáncer, proporcionando protección contra el crecimiento y la propagación del cáncer. El sistema endocannabinoide incluye amidas y ésteres de ácidos grasos poliinsaturados, como la N-araquidonoiletanolamina (anandamida, AEA), las enzimas que sintetizan (N-acil-fosfatidiletanolaminas-hidrolizando fosfolipasa D, NAPE-PLD) o degradan AEA (amida hidrolasa de ácidos grasos, FAAH) y los receptores CBR y TRPV1 de unión a la AEA. Además, el ECS incluye congéneres AEA como 2-araquidonoilglicerol, para los cuales se han descubierto recientemente enzimas biosintéticas específicas e hidrolíticas. Sin embargo, el 2-araquidonoilglicerol no parece jugar un papel importante en el control de la elección celular entre la supervivencia y la muerte.<sup>55</sup>

Se han recogido pruebas sustanciales que apoyan un papel fundamental para el metabolismo del ácido araquidónico (AA) catalizado por lipoxigenasa (LOX) y ciclooxigenasa (COX) en el desarrollo del cáncer. En particular, 5-LOX y COX-2 son las isoenzimas más implicadas en el control del crecimiento celular y la muerte dentro del SNC.<sup>6</sup>

### 3. Ácido graso de amida hidrolasa (FAAH)

Es un miembro de la familia de enzimas serina hidrolasa. Se demostró primero que podía romper la anandamida en 1993. En los seres humanos, está codificada por el gen FAAH. El FAAH es una membrana hidrolasa integral con un único dominio de transmembrana, N-terminal. El FAAH tiene actividad de esterasa y amidasa *in vitro*. *In vivo*, el FAAH es la principal enzima catabólica para una clase de lípidos bioactivos llamados las amidas de ácidos grasos (FAAs). Los miembros de las FAA incluyen: anandamida (N-araquidonoiletanolamina), un endocannabinoide; la oleamida lipídica inductora del sueño; las N-aciltaurinas, que son agonistas de la familia de potencial transitorio del receptor (TRP) de los canales de calcio; y otras tales como las N-aciletanolaminas, N-oleoiletanolamina y N-palmitoiletanolamina.<sup>54</sup>

FAAH en ratones muestran niveles muy elevados de N-aciletanolaminas y N-aciltaurinas en diversos tejidos (> 15 veces). Debido a sus niveles significativamente elevados de anandamida, los FAAH tienen un fenotipo analgésico, mostrando una sensación de dolor reducida en la prueba de placa caliente, la prueba de formalina y la prueba de flick de la cola. Por último, debido a su capacidad disminuida para degradar la anandamida, FAAH también muestran supersensibilidad a la anandamida exógena, un agonista de los receptores cannabinoides.<sup>54</sup>

Una mutación en FAAH inicialmente estaba vinculada provisionalmente a la drogadicción y la dependencia, pero esto no se confirmó en los estudios posteriores. Estudios en células y animales incluso en células humanas han demostrado que la inhibición de FAAH puede ser una estrategia útil para tratar los trastornos de ansiedad. Cabe destacar un agonista de vital importancia como la palmitoiletanolamida. Se ha demostrado que la palmitoiletanolamida (PEA) actúa en sinergia con la anandamida

(araquidonoleotanolamida, AEA), un agonista endógeno del receptor cannabinoide tipo 1 (CB1). Este efecto sinérgico se redujo por el antagonista del receptor cannabinoide CB2 SR144528, aunque la PEA no activa ni los receptores CB1 ni los receptores CB2. Aquí se demuestra que la PEA potencia potentemente los efectos antiproliferativos de AEA en las células humanas de cáncer de mama (HBCC), en parte por la inhibición de la expresión de ácido graso amida hidrolasa (FAAH), la principal enzima que cataliza la degradación de AEA. El PEA ( $1 \cdot 10^{-10}$  M) potenció de manera relacionada con la dosis el efecto inhibitorio de AEA tanto en la proliferación de HBCC basal como en el factor de crecimiento nervioso (NGF), sin inducir ningún efecto citostático por sí mismo. El efecto de la PEA se debió en parte a la inhibición de la degradación de AEA, ya que el tratamiento le provocó una regulación negativa de aproximadamente 30-40% de la expresión y actividad de FAAH. Sin embargo, la PEA también aumentó el efecto citostático del agonista de receptores cannabinoides HU-210, aunque de manera menos potente que con AEA.<sup>54</sup>

#### 4. Celecoxib

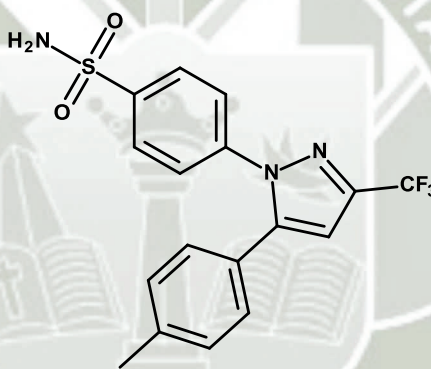
El celecoxib tiene como nombre IUPAC 4-[5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)pirazol-1-il]benzeno sulfonamida (**Fig. 2**) y es un inhibidor de la ciclooxigenasa tipo 2 (COX2) que pertenece a los medicamentos antiinflamatorio no esteroideo (AINE). Este fármaco tiene diferentes propiedades farmacológicas efectos tales como analgésicos, antipiréticos y antiinflamatorios.<sup>48</sup> Además, el celecoxib fue uno de los primeros inhibidores selectivos de COX-2 aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) y por la European Medicines Agency (EMA), para el tratamiento de artritis reumatoide, osteoartritis y para el alivio del dolor agudo asociado a la cirugía dental y la dismenorrea primaria.<sup>6</sup>

##### 4.1. Celecoxib como inhibidor de la COX-2

La ciclooxigenasa es una enzima que produce prostaglandinas a partir del ácido araquidónico (AA) y se dan las 3 isoformas conocidas como COX-1, COX-2 y COX-3. El ácido araquidónico permite la síntesis de prostaglandinas. Inicialmente la formación del ácido araquidónico se da mediante los fosfolípidos que están en la

membrana mediado por la fosfolipasa A2, luego la COX-2 convierte el ácido araquidónico en prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos.<sup>56</sup>

La COX-1 se encuentra en muchas células normales y en la mayoría de los tejidos, de la misma manera es partícipe de algunos procesos como la regulación homeostática celular y la regulación del tono vascular. La COX-2 se expresa mediante la liberación de citocinas inflamatorias. La COX-3 posee una alta sensibilidad al acetaminofén y se reportó que hay una mayor expresión en el cerebro y el corazón. El Celecoxib ó 4-[5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)pirazol-1-il] benzenosulfonamida], contiene un grupo sulfonamida en sustitución del grupo carboxilo de ácidos antiinflamatorios no esteroideos, presentes en los AINE no selectivos. Los anillos fenilo del celecoxib tiene una propiedad catalítica potente sobre la COX-2, lo cual lo hace selectivo.<sup>56</sup>



**Fig. 2** Estructura del Celecoxib.<sup>57</sup>

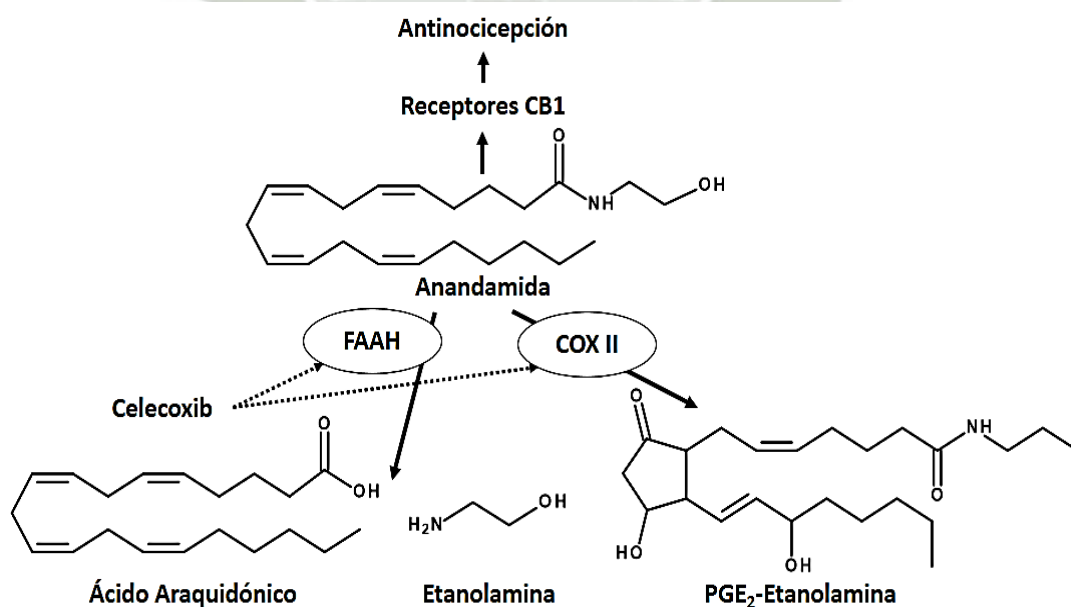
#### 4.2. Celecoxib y el cáncer de mama

Estudios moleculares recientes de tumores de mama indican que la COX-2 es indebidamente inducida y que tanto la COX-2 como la COX-1 están reguladas en las células malignas.<sup>56</sup>

Además, la prostaglandina principal, PGE<sub>2</sub>, induce específicamente la región promotora del gen II de la aromatasa del citocromo P-450 (CYP-19). Este efecto paracrino de PGE<sub>2</sub> potencia, por tanto, la biosíntesis local de estrógeno y proporciona un vínculo crítico entre la cascada de prostaglandina y desregulación de la biosíntesis

de estrógenos en la carcinogénesis mamaria. Los efectos antiinflamatorios de los AINE provienen del bloqueo de la cascada de prostaglandinas mediante la inhibición de su enzima limitante de velocidad, COX.<sup>57</sup> El celecoxib tiene propiedades antiinflamatorias y analgésicas significativas, así como menor toxicidad que otros AINE como la aspirina y el ibuprofeno que también inhiben tanto la COX-1 como la COX-2 pero no con la eficacia del celecoxib sobre la COX-2.<sup>56,57</sup>

La sobreexpresión de COX-2 se ha asociado con el comportamiento tumoral y con pronóstico en varios cánceres. La inhibición selectiva de la actividad COX-2 en varios modelos animales se ha asociado con una disminución de la producción de nuevos vasos sanguíneos en tumores, en la formación de nuevos vasos, y el aumento de la apoptosis de células cancerosas como la del pulmón y de mama. Asimismo, La sobreexpresión de COX-2 se asocia con la carcinogénesis, invasividad y con la metástasis de tumores malignos. El papel del celecoxib en la prevención y el tratamiento de los tumores han estado atrayendo en los últimos años debido a su carácter selectivo y específico.<sup>58</sup> Se revela que los endocannabinoides se metabolizan por COX-2 y amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH). Así, probablemente la inhibición de COX-2 y FAAH por celecoxib podría conducir a niveles de cannabinoides endógenos elevados (**Fig. 3**).<sup>59</sup>



**Fig. 3** Celecoxib sobre COX-2 y FAAH.<sup>60</sup>

#### 4.3. Efectos secundarios del celecoxib

Suelen ser poco frecuentes y la mayoría se dan en 1 de cada 100 pacientes. Entre ellos tenemos: dolor de estómago, diarrea, digestión pesada, gases, mareo, insomnio, congestión nasal, sinusitis, faringitis, retención de líquidos, erupción de la piel e hinchazón de las piernas y tobillos.<sup>56</sup>

#### 5. Macamidas

Conocido en el sur de América como “Maca” (*Lepidium meyenii*), es una cosecha andina que se encuentra sólo en una zona muy restringida del centro del Perú en el departamento de Junín y Pasco, en el sector agroecológico superior a 4000 m donde la temperatura es baja y los vientos limitan otros cultivos, pero puede cultivarse fuera de su actual hábitat "natural". La Maca es una planta herbácea bienal, cuya parte subterránea es el hipocótilo lo cual es comestible y altamente valorado por su nutrición (especialmente proteínas y minerales).<sup>61</sup>

El hipocótilo también se ha utilizado para tratar a las mujeres con menopausia cuyos síntomas que incluyen sofocos, pechos sensibles, sequedad vaginal, osteoporosis, etc. Los alcaloides de la maca como los esteroides, glucosinolatos, sotiocianatos y macamidas son probablemente responsables de su efecto afrodisíaco, hormonal, adaptogénico, anabólico e inmunoestimulante.<sup>62</sup> Varios estudios han sido realizados con la maca, la mayoría de ellos examinando sus efectos sobre la sexualidad, así como sus funciones reproductivas en roedores y humanos. Otros estudios surgieron en los trastornos de la menopausia, la fertilidad femenina, los efectos "anti-estrés" y acciones sobre el sistema nervioso central lo cual afectan la memoria y neuronas por lo cual hay necesidad de estudios farmacológicos adicionales para caracterizar propiedades de esta planta.<sup>61</sup>

#### 5.1. Descripción botánica

La maca se caracteriza por una parte de ella en la superficie y una parte subterránea. La parte de la superficie es pequeña y plana en apariencia. Esto es debido a un resultado de un proceso de adaptación para evitar impactos de fuertes vientos.

La parte principal y la parte comestible de la planta es un tubérculo tipo rábano que constituye el hipocótilo y la raíz de la planta. Este eje hipocótilo-raíz es de 10-14 cm de largo y 3-5 cm de ancho, constituye un órgano de almacenamiento un alto contenido de agua. Después del secado, los hipocótilo son drásticamente reducido en tamaño a aproximadamente 2-8 cm de diámetro. El peso medio de los hipocótilos secos puede variar considerablemente que van desde 7,64 g en hipocótilos de maca negra en Yanacancha, Chupaca, a 23,88 g en maca negra de Carhuamayo, Junín (ambos en los Andes centrales peruanos). Hay muchos tipos de maca que se pueden caracterizar por el color de sus hipocótilos. En Carhuamayo, Junín, en el Altiplano peruano, 13 colores de maca han sido descritos, que van desde el blanco al negro. Recientemente, se ha demostrado que diferentes tipos de maca (según su color) tienen diferentes propiedades biológicas.<sup>63</sup>

Para que la maca crezca necesita de un suelo rico en materia orgánica y ácido. De hecho, nuestros estudios revelaron que los extractos acuosos de maca son ácidos. En 1982, el Consejo Internacional para la Protección de los recursos declararon que la maca está en peligro de extinción como la planta.<sup>64</sup> En los últimos 10 años, debido al interés de los mercados europeos, norteamericanos y japoneses, la producción de maca ha aumentado notablemente. El género incluye aproximadamente 175 especies, lo que lo convierte en uno de los géneros más grandes de la familia *Brassicaceae*. Las hojas son verdes, fragantes, y se encuentran en la superficie del suelo en una roseta que se renueva continuamente desde el centro hacia las hojas cuando mueren. El principal tallo es corto y está conectado a un órgano de almacenamiento subterráneo. Las flores son blanquecinas, autofértiles y se llevan sobre un racimo central; ellos son seguidos por frutos siliculosos de 4-5 mm, cada uno conteniendo dos pequeñas (2-2,5 mm) semillas ovoides rojizo-grises. Las semillas son el único método de reproducción; puesto a que germinan dentro de los cinco días de madurez bajo condiciones adecuadas. Los hipocótilos pueden variar mucho en tamaño y forma, pueden ser cónicos, ovoides, esférica o cilíndrica. Los hipocótilos de la maca pueden ser oro crema, rojo, púrpura, negro o verde. Cada una se considera una variedad genéticamente única, como las semillas de las plantas madres que crecen para tener raíces del mismo color.<sup>61</sup>

## 5.2. Origen, Distribución y cultivación

El género probablemente se originó en la cuenca mediterránea, donde la mayor parte de las especies diploides se encuentran. Poco se sabe sobre el tiempo de origen y los mecanismos responsables de su actual distribución mundial. Las especies de *Lepidium* andino pertenecen principalmente a las secciones *Dileptium* y *Monoploca*, que son interesantes porque crecen a grandes altitudes.<sup>65</sup>

La Taxonomía de las especies cultivadas ha sido cuestionada en base a observaciones morfológicas. Un cambio en el nombre de *Lepidium peruvianum* Chacón ha sido propuesto; por lo tanto, ambos nombres se usan como sinónimos para todos los ecotipos de Maca. Ninguna de las especies salvajes de *Lepidium* son idénticas a la Maca cultivada, ya que debido a las duras condiciones climáticas en las que crece contribuyen a sus propiedades farmacológicas. El Perú es el único productor de Maca, y la única región geográfica con condiciones óptimas para su producción y se encuentra en el departamento de Junín, 230 km de Lima a una altitud de 4300 m. En el momento de Cosecha, las plantas se arrancan y los hipocótilos se separan de las partes aéreas. Después de la limpieza, los hipocótilos se separan para el secado con el sol, que toma varias semanas a 3 meses. Los hipocótilos secos se pueden almacenar con seguridad durante años, es más hasta que se consuman.<sup>66</sup>

El 5% de la cosecha anual se utiliza separadamente para la producción de semillas, estas plantas son trasplantadas a otros campos para crecer hasta que las semillas maduren en 6 a 7 meses, momento en el cual las plantas son cosechadas y secadas en su forma entera. Las semillas se separan agitando las plantas. Para iniciar un nuevo cultivo se necesitan 3,5 kg de semillas por hectárea.<sup>65</sup>

## 5.3. Fitoquímica

Los hipocótilos de maca representan los órganos de almacenamiento de las plantas y con alta proporción de carbohidratos. Los sacáridos hidrolizables constituyen 50-60% de los hipocótilos de maca seca. Otros constituyentes primarios son las proteínas (10-12%), lípidos (2-3%), fibra (8-9%) y cenizas (4-5%). El

contenido de agua de los hipocótilos frescos puede ser tan alto como 80% y en el contenido de agua residual es 10-12%. La composición de aminoácidos muestra un excelente perfil, ya que cuenta con un alto contenido de aminoácidos esenciales tales como treonina (33,1), tirosina (30,6), fenilalanina (55,3), valina (79,3), metionina (28,0), Isoleucina (47,4), leucina (91), lisina (54,5) y triptófano (10,0) expresado como mg de aminoácidos por g de proteína. Por otro lado, la maca tiene concentraciones del ácido linoleico (32,6%), ácido palmítico (23,8%) y ácido oleico (11,1%). La fracción esteroide consiste principalmente en brassicasterol (9,1%), Ergosterol (13,6%), campesterol (27,3%), ergostadienol (4,15%) y Sitosterol (45,5%).<sup>63</sup>

Las alquilamidas son derivados lipídicos presentes en los hipocótilos de maca, que se consideran constituyentes interesantes debido a su similitud estructural a los compuestos endógenos encontrados en los vertebrados que forman el Sistema Endocannabinoide. Las alquilamidas benciladas (macamidas) han sido aislados de los extractos de hexano de maca; N-bencil-5-oxo-6E, 8 y N-bencilhexadecanamida fueron las dos primeras macamidas, junto con el ácido ceto acíclico 5-oxo-6E y el ácido 8-Eoctadecadienoico. Los ácidos grasos que forman parte de las macamidas tienen características químicas únicas, y en la forma libre se designan macaenos.<sup>67</sup>

Estudios adicionales han llevado al aislamiento y caracterización de cinco Alquilamidas nuevas: N-bencil-9-oxo-12Z-octadecenamida, N-bencil-9-oxo-12Z, 15Z-octadecadienamida, N-bencil-13-oxo-9E, 11E-octadecadienamida, N-bencil-15Z-tetracosenamida y N-(m-metoxibencil)hexadecanamida. Otras investigaciones han conducido a la identificación de N-benciloctadecanamida, N-bencilpentadecanamida, N-bencil-heptadecanamida, N-bencil-9Z-octadecenamida, N-bencil-9Z, 12Z-octadecadienamida, y N-bencil-9Z, 12Z, 15Z-octadecatrienamida, así como las formas metoxiladas de los compuestos insaturados.<sup>67</sup>

Las alquilamidas tienen una distribución restringida en el reino vegetal, se encuentran principalmente en cuatro familias de plantas: *Piperaceae*, *Aristolochiaceae*, *Rutaceae* y *Asteraceae*. Las alquilamidas aisladas de la maca (*Brassicaceae*) son una excepción a esta distribución sistemática, y estos compuestos

no han sido reportados en otras especies de *Lepidium*. Por lo tanto, estos compuestos podrían usarse como marcadores para la normalización y su selección farmacológica es un paso importante al establecer la importancia de *Lepidium meyenii*.<sup>68</sup>

#### 5.4. Actividad Farmacológica

Esta planta es usada para mejorar la fertilidad y el comportamiento sexual tanto en hombres como en mujeres. Además, se utiliza para prevenir enfermedades crónicas y retardar los efectos perjudiciales del envejecimiento.<sup>61</sup>

Los extractos acuosos de maca se han evaluado con varios métodos para la actividad antioxidante *in vitro*. Las células mamarias cancerosas también fueron expuestas a extractos de maca en una gama de concentraciones para evaluar su actividad proliferativa como indicador de estrogenicidad. Sin embargo, la relación entre la ingesta de maca y sus efectos en el sistema reproductivo masculino aún no se ha determinado. Los estudios en animales no indicaron efectos de la maca en los niveles de estradiol, progesterona, testosterona y otras hormonas. La maca también es útil para el tratamiento de la osteoporosis posmenopáusica. Derivados, que a su vez podría neutralizar carcinógenos por un antioxidante o mediante la activación de las enzimas hepáticas para proteger contra carcinógenos. Estudios demostraron que la Maca redujo significativamente los síntomas asociados con la menopausia, incluyendo efectos significativos como ansiedad y depresión. Otros estudios clínicos recientes también han demostrado los efectos beneficiosos de los hipocótilos de Maca sobre el inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina (ISRS) inducida por la disfunción sexual.<sup>69</sup>

#### 6. Cultivo celular

Son los procedimientos que permiten la conservación de células *in vitro*, preservando al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Se consiguen mantener clones de un solo tipo de células de origen animal y/o vegetal bajo condiciones específicas de cada línea celular bien definidos a partir de cada cultivo

celular. Si se logra mantenerlas como se describe, se puede alcanzar una mayor viabilidad en las células lo que, hace que los cultivos celulares sean óptimos para trabajos de investigación básica.<sup>70</sup>

### **6.1. Cultivo celular primario**

Los cultivos primarios se derivan directamente de tejido animal normal extirpado y cultivos ya sea como cultivo explante o después de la disociación en una única suspensión celular por digestión enzimática. La preparación de cultivos primarios es intensiva y puede mantenerse *in vitro* sólo por un período limitado de tiempo. Durante su vida útil relativamente limitada, las células primarias suelen conservar muchas de las características diferenciadas de la célula *in vivo*.<sup>70</sup>

### **6.2. Línea Celular**

Células de un tipo único (humano, animal o vegetal) que se han adaptado para crecer continuamente en el laboratorio y que se usan en investigación.<sup>70</sup>

### **6.3. Pasaje Celular**

La transferencia de células, con o sin dilución, de un recipiente de cultivo a otro.<sup>70</sup>

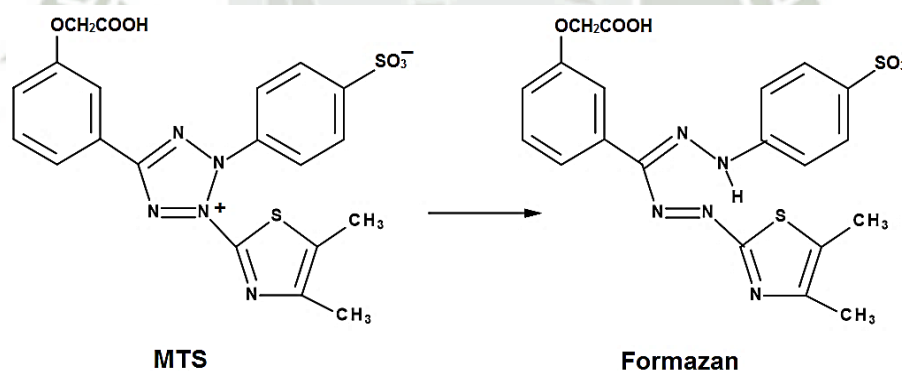
### **6.4. Células MDA-MB-231**

La línea celular MDA-MB-231 es una de las más utilizadas para el estudio experimental *in vitro* del cáncer de mama hormona-independiente. Se ha comprobado que estas células presentan un crecimiento rápido en medios pocos enriquecidos. Poseen abundantes receptores de membrana para el factor de crecimiento epidérmico (EGF), pero paradójicamente no se sobreestimulan con dicho factor. 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. Esta línea celular se estableció a partir de una sola muestra de efusión pleural obtenida el 17 de octubre de 1973, de una mujer blanca de 51 años de edad, que había tenido una mastectomía radical derecha en enero de 1969 por un tumor tumor mal diferenciado. Este paciente también tenía un carcinoma intraductal. Un derrame pericárdico y un derrame pleural izquierdo aparecieron en junio y julio de 1973, respectivamente. Ambos contenían células malignas compatibles con un tumor primario de la mama.<sup>71</sup>

### 6.5. Ensayo de viabilidad celular (MTS)

El ensayo MTS es un ensayo colorimétrico para la evaluación de la viabilidad celular en ensayos de citotoxicidad o proliferación. El Reactivo de Solución CellTiter 96® AQueous One contiene una nueva sal interna de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio] o MTS y un reactivo de acoplamiento de electrones (etosulfato de fenazina, PES). PES ha mejorado la estabilidad química, lo que permite combinarla con MTS para formar una solución estable.<sup>72</sup>



**Fig. 4** Reacción del MTS Assay.<sup>72</sup>

La enzima oxidorreductasa celular NAD(P)H, refleja el número de células viables presentes. Estas enzimas son capaces de reducir el colorante de tetrazolio MTS que es de color amarillo a formazán que es de color púrpura en las células vivas. El producto formazán tiene un máximo de absorbancia a 490-500nm en solución salina tamponada con fosfato. El ensayo de MTS se describe a menudo como un ensayo de MTT de un solo paso, que ofrece la oportunidad de añadir el reactivo

directamente al cultivo celular sin los pasos intermitentes requeridas en el ensayo de MTT. Los ensayos con MTS se realizan generalmente en la oscuridad ya que el reactivo MTS es sensible a la luz. La cantidad de producto de formazán medida por absorbancia a 490 nm es directamente proporcional al número de células vivas en cultivo.<sup>72</sup>

Debido a que el producto formazán de MTS es soluble en medio de cultivo de tejidos, el Ensayo de Solución CellTiter 96® AQueous One requiere menos etapas de procedimientos que utilizan compuestos de tetrazolio tales como MTT o INT.<sup>73</sup>

### **6.6. Ensayo FAAH**

Los endocannabinoides primarios, araquidonoiletanolamida (AEA) y 2-araquidonoil glicerol (2-AG), se liberan a petición de los precursores de lípidos y se unen a los receptores cannabinoides (CB1) en el cerebro o receptores CB2 en los tejidos periféricos. La amida hidrolasa de ácido graso (FAAH) es una serina hidrolasa citosólica responsable de la degradación de amidas de ácidos grasos, incluyendo AEA. Encontrar inhibidores de FAAH podría ofrecer un enfoque beneficioso para el tratamiento del dolor, la obesidad y diversas enfermedades neurológicas, donde una mayor actividad endocannabinoide sería beneficioso. El kit Cayman's FAAH Inhibitor Screening Assay proporciona un método conveniente basado en la fluorescencia para el cribado de inhibidores de FAAH. FAAH hidroliza AMC-araquidonoil amida dando como resultado la liberación del producto fluorescente, 7-amino-4-metilcumarina (AMC). El fluoróforo se puede analizar fácilmente usando una longitud de onda de excitación de 340-360 nm y una longitud de onda de emisión de 450-465 nm.<sup>74</sup>

## CAPÍTULO II

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1. Materiales, reactivos y equipos

##### 1.1. Material Biológico y otros

- Cámaras de conteo desechables de la casa Nexcelom
- Línea celular cancerosa mamaria MDA-MB-231 de la casa ATCC
- Placas de 96 pocillos estériles de la casa Thermo Scientific
- Placas de 96 pocillos estériles de color negro de la casa Thermo Scientific
- Micropipetas de un solo canal de la casa VWR®
- Alcohol al 70%

##### 1.2. Reactivos

- Medio Eagle Modificado de Dulbecco, DMEM, (con 4.5 g/L de glucosa, L-glutamina y piruvato de sodio), de la casa Cellgro®
- Suero bovino fetal (10%), de la casa Global Cell Solutions
- Solución de penicilina-estreptomina (10,000 unidades/mL de Penicilina y 10,000 µg/mL de estreptomina) de la casa HyClone®
- Solución de tripsina-EDTA (0.25%) de la casa ATCC®
- Solución CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay de la casa Promega.
- Dimetil sulfóxido (DMSO)
- Fosfato Buffer Salino (PBS)
- Inhibidores Cayman's FAAH Inhibitor Screening Assay

##### 1.3. Equipos

- Centrifugador de la casa Dynac III
- Microscopio invertido CKX31 de la casa OLYMPUS®

- Tanque criogénico de nitrógeno líquido en fase de vapor, de la casa Bio-Cane™
- Incubadora de CO<sub>2</sub> con chaqueta de agua VWR® Symphony 3078.
- Vortex Genie 2 de Fisher Brand®
- Cellometer® Auto T4 (contador automático de células), de la casa Nexcelom
- Equipo Synergy HT (Lector multimodal de microplacas) de Bio-Tek®.
- Cabina de bioseguridad clase II tipo A2 de la casa ESCO®
- Comparador manual de masas CCE106 de la casa Sartorius®
- Equipo de Baño María Fisher Lab Armor Bead Baths
- Equipo de Ultrasonido de la casa VWR® Symphony™
- Refrigeradora de - 80°C de la casa REVCO
- Refrigeradora de -20°C de la casa Thermo Scientific

## 2. Métodos

### 2.1. Cultivo celular

#### 2.1.1. Preparación del medio



**Fig. 5** Medio blanco y medio enriquecido DMEM.

Fuente: Elaboración propia

Se preparó dos medios utilizando dos frascos de medio Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) de 500 mL.

El primero fue el medio blanco, al cual se le agregó 5 mL de una solución de penicilina - estreptomina, para mantener la asepsia y esterilidad del medio.

El segundo fue el medio enriquecido con suero bovino fetal (SBF), el cual fue preparado por medio del retiró de 50 mL del medio DMEM; luego se añadió 50 mL de SBF en sustitución de los 50 mL del medio extraído, llegando a una concentración final del SBF de 10%; finalmente se añadió 5 mL de una solución de penicilina estreptomina. Finalmente se rotuló como se muestra en la **Fig. 5**.

### 2.1.2. Acondicionamiento celular



**Fig. 6** Tanque de nitrógeno líquido – Fase vapor.  
Fuente: Elaboración propia

Las células MDA-MB-231 fueron crio-preservadas en viales dentro de un tanque de nitrógeno líquido como se muestra en la **Fig. 6** a una temperatura aproximada de  $-190^{\circ}\text{C}$ .



**Fig. 7** Viales de células humanas criogenizados  
Fuente: Elaboración propia

Seguidamente, se sacó el vial que contiene la suspensión primaria de las células MDA-MB-231 del tanque criogénico de nitrógeno líquido como se ilustra en la **Fig. 7** y se llevó a baño maría a 25 °C, por un lapso de 2 horas. Posterior a ello, se llevó a la cabina de bioseguridad y se colocó 1 mL de ésta suspensión en un frasco estéril. Se añadió el medio enriquecido hasta completar un volumen de 14mL. Finalmente se llevó el frasco a la incubadora con una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>, 95% aire a 37 °C por 3 días.

### 2.1.3. Obtención de la suspensión celular



**Fig. 8** Cabina de Bioseguridad  
Fuente: Elaboración propia

Pasado los 3 días de incubación, se llevó el frasco a la cabina de bioseguridad (**Fig. 8**), allí se descartó el medio en un recipiente que contenía lejía que evita la contaminación, quedando un pellet de células. Luego se enjuagó con 1 mL de tripsina para eliminar los restos de SBF. Posteriormente, se le añadió nuevamente 3 mL de tripsina para lograr desmembrar la capa de células adheridas a la superficie del frasco. Dado el proceso de disociación, se procedió a incubar el frasco por un lapso de 15 minutos, agitando suavemente cada 5 minutos; seguidamente, se inactivó a la tripsina con 6 mL del medio blanco. Rápidamente tras los 15 minutos se transfirió todo el contenido a un tubo de centrifuga de 50 mL, se centrifugó por 5 minutos a 1000 rpm, se descartó el líquido sobrenadante y se resuspendió las células con 5 mL de nuevo medio enriquecido con SBF. Suspensión celular que se utiliza para realizar un nuevo pasaje y ensayos experimentales.

#### 2.1.4. Obtención del nuevo pasaje celular



**Fig. 9** Incubación con una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>, 95% aire a 37 °C.  
Fuente: Elaboración propia

De la suspensión anteriormente obtenida, se transfirió 2 mL, en un nuevo frasco de la misma capacidad, adicionando aproximadamente 5 mL del medio enriquecido con SBF hasta completar el volumen y se llevó el frasco a la incubadora con una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>, 95% aire a 37 °C por un lapso de 5 días como se muestra en la **Fig. 9**.

#### 2.1.5. Determinación del número de células viables en la suspensión celular.

En un tubo eppendorf se puso 20 µL de azul de tripán y 20 µL de la suspensión celular previamente preparada, se mezcló cuidadosamente evitando la aparición de burbujas los cuales su formación interfieren en el conteo celular, seguidamente se tomó 20 µL de esta mezcla y se colocó en la cámara de recuento celular desechable (CRCD), la cual debió estar totalmente cubierta por la mezcla, posterior a ello se colocó la CRCD en el Cellometer Auto T4.

En el software del equipo se colocó los parámetros correspondientes indicando el tipo de células a contar, ya sea el caso de las células MDA-MB-231.

Finalmente se eligió la opción contar y el equipo mostró el número de células viables/mL de suspensión celular, así como el porcentaje de viabilidad. El porcentaje de viabilidad debió ser mayor al 90% para continuar con los siguientes ensayos.

## 2.2. Soluciones a distintas concentraciones de las macamidas

Se usaron tres principios activos aislados de la maca (*Lepidium meyenii*), los cuales fueron N-(Piridin-3ilmetil)oleamida, (9Z,12Z)-N-(Piridin-3-ilmetil)octadeca-9,12-dienamida y N-(6-Cloropiridin-3-ilmetil)oleamida, nombrados y adquiridos como Macamida 71, Macamida 89 y Macamida 94 respectivamente.

El primer paso consistió en disolver los 3 tipos de macamidas; 23,70 mg de la Macamida 71 en 7,32 mL de la solución DMSO, 5,10 mg de la Macamida 89 en 1,377 mL DMSO y 8.35 mg de la Macamida 94 en 2,05 mL DMSO obteniendo una solución stock de 10 mM de cada una.

A partir de ellas se prepararon 2 mL de cada dilución a distintas concentraciones en un rango entre 1  $\mu\text{M}$  - 3  $\mu\text{M}$  - 10  $\mu\text{M}$  - 30  $\mu\text{M}$  con cada uno de los tipos de las Macamidas con 10% DMSO , luego se adicionó 1 800  $\mu\text{L}$  del vehículo que está constituida de 75% de PBS (solución isotónica de pH 7.4 y baja toxicidad) y 25% de PEG.

**Tabla N° 6** Concentraciones de las Macamidas

<b>Diluciones a partir del Stock (<math>\mu\text{M}</math>) de cada tipo de las Macamidas</b>	<b>Concentraciones en el pocillo de 200<math>\mu\text{L}</math> (<math>\mu\text{M}</math>) de cada tipo de las Macamidas</b>
1	10
3	30
10	100
30	300

Fuente: Elaboración propia

Se utilizó un volumen de 20  $\mu\text{L}$  de cada una de las diluciones preparadas a partir del Stock. Las concentraciones de las diluciones vertidas en cada uno de los pocillos de 200  $\mu\text{L}$ , fueron diluidas nuevamente obteniendo las concentraciones en el pocillo que se muestra en la **Tabla N° 6**.

$$C1 * V1 = C2 * V2$$

$$X \mu M * 20 \mu L = 1 \mu M * 200 \mu L$$

$$C = 10 \mu M$$

**Tabla N°7** Preparación de dilución de 1  $\mu M$

<b>1 <math>\mu M</math> (10% DMSO)</b>	
<b>Volumen del Stock Original</b>	2 $\mu L$
<b>Volumen de DMSO</b>	198 $\mu L$
<b>Nuevo Volumen de PEG</b>	450 $\mu L$
<b>Nuevo Volumen de PBS</b>	1350 $\mu L$

Fuente: Elaboración propia

Para la elaboración de cada dilución establecida en la **Tabla N° 7**, se preparó 2 mL de cada una de las diluciones con 10% de DMSO. Posterior a ello, se determinó el volumen de DMSO, PBS y PEG que deberían contener cada una de las concentraciones para obtener un volumen final de 2000  $\mu L$ .

$$C1 * V1 = C2 * V2$$

$$10\ 000 \mu M * V = 10 \mu M * 2000 \mu L$$

$$V = 2 \mu L$$

### 2.3. Método del FAAH

**Tabla N° 8** Preparación de las concentraciones de Macamidas

<b>Macamida 71</b>	<b>Macamida 89</b>	<b>Macamida 94</b>	<b>Volumen de 20 <math>\mu L</math>/pocillo</b>	<b>DMSO</b>
3 $\mu M$	3 $\mu M$	3 $\mu M$	6 $\mu L$	1994 $\mu L$
10 $\mu M$	10 $\mu M$	10 $\mu M$	20 $\mu L$	1980 $\mu L$
30 $\mu M$	30 $\mu M$	30 $\mu M$	60 $\mu L$	1940 $\mu L$

Fuente: Elaboración propia

Se prepararon los stocks de 10 mM de las Macamidas de 71, 89 y 94, luego se preparación 2 mL o 2000 uL de las siguientes diluciones mostradas en la **Tabla N° 8** de cada Macamida y se determinó cuál de ellas tiene un mejor efecto en la inhibición del FAAH.

### 2.3.1. Preparación del FAAH inhibitor Screening Assay Kit

Primero se preparó 2 mL del buffer FAAH assay con 18 mL de agua ultrapura. Seguidamente; la enzima FAAH fue añadida a cada vial (120 µL), luego esta fue diluida con 480 uL del buffer en el mismo vial (350 µL, 200 µL, 650 uL 3900µL de Buffer).

Finalmente; se colocó 1,5 mL de 400 µM de la amida araquidonil (sustrato FAAH) en cada vial.

### 2.3.2. Preparación del Ensayo FAAH

**Tabla N° 9** Esquema de las diluciones del FAAH

Grupos Experimentales		Buffer	DMSO	Enzima	Sustrato
Blanco		120 µL	20 µL	-----	60 µL
Control		90 µL	20 µL	60 µL	30 µL
Macamida 71	3 µM	90 µL	20 µL	60 µL	30 µL
	10 µM	90 µL	20 µL	60 µL	30 µL
	30 µM	90 µL	20 µL	60 µL	30 µL
Macamida 89	3 µM	90 µL	20 µL	60 µL	30 µL
	10 µM	90 µL	20 µL	60 µL	30 µL
	30 µM	90 µL	20 µL	60 µL	30 µL
Macamida 94	3 µM	90 µL	20 µL	60 µL	30 µL
	10 µM	90 µL	20 µL	60 µL	30 µL
	30 µM	90 µL	20 µL	60 µL	30 µL

Fuente: Elaboración propia

Una vez que se prepararon las concentraciones de las Macamidas para cada pocillo, se trabajó con un grupo blanco, un grupo control y con las Macamidas 71, 89 y 94 en las concentraciones de 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  y 30  $\mu\text{M}$  cada una. Luego, se ubicaron en la placa de 96 pocillos con las cantidades respectivas y en el orden mostrado en la **Tabla N° 9**. Luego, fueron cubiertas para evitar la contaminación.

Todo este procedimiento se realizó por triplicado dentro de la CB. Finalmente, se llevó las placas a la incubadora por 24 horas con una atmósfera de 5%  $\text{CO}_2$ , 95% aire a 37°C. Luego, se adicionó el sustrato 30 minutos antes de cumplir las 24 horas de incubación, para posteriormente realizar las lecturas en el Equipo Synergy HT (Lector multimodal de microplacas).

Cabe mencionar que en el presente estudio se leyó por fluorescencia a una longitud de onda de 340 nm-360 nm o emisión de 450-465 nm. Este análisis permite evidenciar la Macamida que posee mayor efecto de inhibición de la enzima FAAH, para posteriormente realizar ensayos de viabilidad celular frente a la Macamida con mayor efecto inhibitorio.

#### **2.4. Efecto de las Macamidas 71 en combinación del Celecoxib sobre la viabilidad Celular**

Posterior al conteo celular, se tomó la cantidad necesaria de la suspensión celular para obtener un total de 10 000 células por cada pocillo, seguidamente se completó con el medio enriquecido hasta 180  $\mu\text{L}$  y finalmente se completó a 200  $\mu\text{L}$  (que es la capacidad del pocillo) con 20  $\mu\text{L}$  de la correspondiente concentración de la Macamida 71.

Los grupos control se exceptúan de este paso, ya que son células sin daño alguno, por tanto se procedió en ellos adicionar solo la cantidad de 10 000 células por pocillo como el anterior caso y se completó a 200  $\mu\text{L}$  con el medio enriquecido. Se dejó incubar por 24 horas a 37°C con una atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ .

**Tabla N° 10** Concentraciones de la Macamida y diluciones por cada pocillo

<b>Macamida</b>	<b>Volumen Final de la Combinación</b>	<b>SBF + 10 000 Células</b>	<b>Volumen Total</b>
<b>1 <math>\mu</math>M</b>	20 $\mu$ L	180 $\mu$ L	200 $\mu$ L
<b>3 <math>\mu</math>M</b>	20 $\mu$ L	180 $\mu$ L	200 $\mu$ L
<b>10 <math>\mu</math>M</b>	20 $\mu$ L	180 $\mu$ L	200 $\mu$ L
<b>30 <math>\mu</math>M</b>	20 $\mu$ L	180 $\mu$ L	200 $\mu$ L

Fuente: Elaboración propia

Una vez que se obtuvo la concentración de células vivas en la suspensión celular, se calculó el volumen de ésta suspensión para transferir 10 000 células en cada pocillo. Se trabajaron con tres grupos de estudio. El primer grupo de estudio consistieron concentraciones de 1, 3, 10 y 30  $\mu$ M de la Macamida con mayor efectividad (**Tabla N° 10**).

**Tabla N° 11** Concentraciones del Celecoxib con las diluciones por cada pocillo

<b>Celecoxib</b>	<b>Volumen Final de la Combinación</b>	<b>SBF + 10 000 Células</b>	<b>Volumen Total</b>
<b>3 <math>\mu</math>M</b>	20 $\mu$ L	180 $\mu$ L	200 $\mu$ L
<b>10 <math>\mu</math>M</b>	20 $\mu$ L	180 $\mu$ L	200 $\mu$ L
<b>30 <math>\mu</math>M</b>	20 $\mu$ L	180 $\mu$ L	200 $\mu$ L
<b>100 <math>\mu</math>M</b>	20 $\mu$ L	180 $\mu$ L	200 $\mu$ L

Fuente: Elaboración propia

El segundo grupo de estudio consistió en trabajar con concentraciones de 3, 10, 30 y 100  $\mu$ M del Celecoxib (**Tabla N° 11**), que por bibliografía se sabe que este fármaco logra tener un gran efecto en líneas celulares cancerígenas.

Para el segundo grupo de estudio, se trabajaron con cuatro concentraciones del Celecoxib, de la misma manera, se trabajó a partir de la suspensión celular, es decir con 10 000 células, seguidamente se completó a 180  $\mu$ L con medio enriquecido y

finalmente se adicionó 20  $\mu\text{L}$  de 10  $\mu\text{M}$  del Celecoxib exceptuando al grupo control. Se dejó incubar por 24 horas a 37°C con una atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ .

**Tabla N° 12** Concentración de la combinación de la Macamida con el Celecoxib

Macamida	Celecoxib	Volumen Final de la Combinación	SBF + 10 000 Células	Volumen Total
3 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	20 $\mu\text{L}$	180 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	20 $\mu\text{L}$	180 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$
30 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	20 $\mu\text{L}$	180 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$
90 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	20 $\mu\text{L}$	180 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$

Fuente: Elaboración propia

Para el grupo final de estudio, se determinaron cuatro concentraciones de la Macamida 71 (3, 10, 30 y 90  $\mu\text{M}$ ) con 10  $\mu\text{M}$  del Celecoxib (**Tabla N° 12**), buscando analizar el efecto antineoplásico, si produce algún efecto sinérgico o antagónico. También se trabajó con un grupo control descrito en los grupos de estudios anteriores para evitar un resultado erróneo. Para lo cual se usó 10 000 células a partir de la suspensión celular y se completó a 180  $\mu\text{L}$  con medio enriquecido. Se adicionó 10  $\mu\text{L}$  de la Macamida correspondiente con los 10  $\mu\text{L}$  del Celecoxib exceptuando de ello al grupo Control. Finalmente, se dejó incubar por 24 horas a 37°C con una atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  por 24 horas.

## 2.5. Viabilidad celular frente al tratamiento

Luego de la incubación de las placas, se agregó 10  $\mu\text{L}$  del reactivo CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay a cada pocillo. Este reactivo tiene un compuesto de tetrazolio [3-(4,5-dimetil-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS) y se incubó por 3 horas, el MTS fue reducido por las células vivas formando el producto formazán obteniéndose una coloración azulada en el medio. Después de la incubación se llevó la placa al equipo Synergy HT (Lector multimodal de microplacas), donde se midió la absorbancia de cada pocillo a 490

nm, ésta absorbancia es directamente proporcional al número de células vivas en el cultivo.

## 2.6. Métodos estadísticos

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



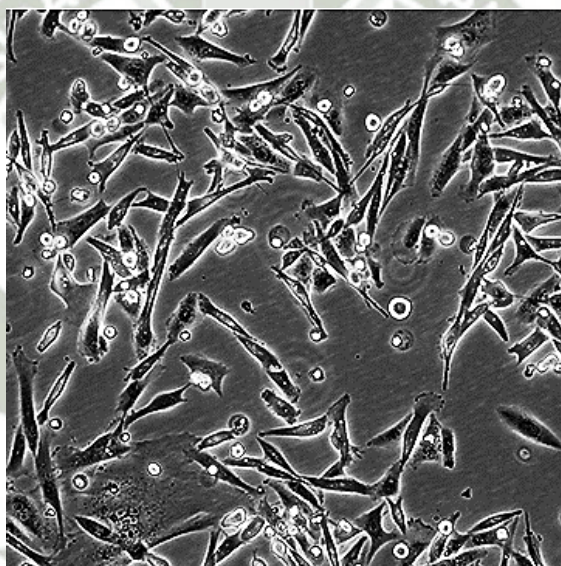
## CAPÍTULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 1. Obtención del cultivo celular

##### 1.1. Células MDA-MB-231

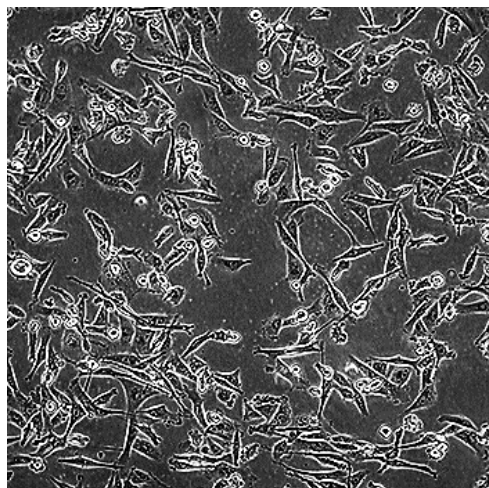
El desarrollo y comportamiento de la línea celular MDA-MB-231 fue óptimo, se obtuvo la confluencia deseada mayor al 80% y la viabilidad celular esperada mayor a 90%, debido a que se le brindó las condiciones adecuadas. Su crecimiento fue favorecido por el medio selectivo DMED.



**Fig. 10** Desarrollo de células MDA-MB-231 tras 12 horas de incubación.

Fuente: Elaboración propia

Las imágenes realizadas por el microscopio óptico invertido con un objetivo de 4X de la **Fig. 10** muestran el crecimiento del primer pasaje tras 12 horas de incubación en las condiciones requeridas para la proliferación celular, donde su desarrollo es dado por los factores de crecimiento que son contribuidos por el medio enriquecido.



**Fig. 11** Células MDA-MB-231 tras 48 horas de incubación a 4X.  
Fuente: Elaboración propia

En la **Fig. 11** tras 48 horas de incubación se aprecian cambios morfológicos definidos, incremento de confluencia celular y el crecimiento celular deseado. Una vez alcanzada la confluencia adecuada se da la realización de nuevos pasajes (nueva generación de células) y los ensayos deseados.

La proliferación y diferenciación son características muy importantes para llevar a cabo las siguientes pruebas; por lo cual, el desarrollo celular es cuidadosamente observado en diferentes días; evidenciándose un cambio morfológico y aumento del número de células con el paso del tiempo. El crecimiento exponencial celular se logró satisfactoriamente debido a los factores de crecimiento aportados por el medio selectivo para esta línea celular.

## **2. Exclusión de viabilidad celular**

### **2.1. Conteo de células viables en la suspensión celular**

Para el conteo de células viables en la suspensión celular descrito en la metodología, se utilizó el colorante azul de tripán, el cual permite diferenciar las células vivas de las muertas como lo refieren muchos investigadores.<sup>75</sup> La diferenciación se da debido a que las células vivas presentan una membrana celular

intacta que impide su coloración, mientras que las otras no responden de forma similar.

El conteo celular se realizó mediante el uso del cellometer® Auto T4, el cual brindó el número de células vivas y muertas, así como la concentración de células vivas en la suspensión. Las células MDA-MB-231 se desarrollaron al cabo de 48 horas y se puede observar una confluencia mayor al 80%, la cual es óptima para realizar la suspensión celular y determinar la cantidad de células vivas de las muertas como muchas investigaciones lo refieren y lo recalcan como parámetro en todas las determinaciones con células.<sup>76</sup>

**Tabla N° 13** Conteo celular y porcentaje de viabilidad de las células MDA-MB-231

<b>Línea Celular MDA-MB-231</b>			
<b>Células/mL</b>	<b>% Células viables</b>	<b>Volumen de suspensión que contiene 10 000 células (µL)</b>	<b>Uso en efecto de:</b>
2,28 x 10 <sup>5</sup>	97%	44,0 µL	Macamida 71, Celecoxib*
3,72 x 10 <sup>5</sup>	97%	27,0 µL	Macamida 71, Celecoxib*
3,10 x 10 <sup>5</sup>	95%	32,3 µL	Macamida 71, Celecoxib*
2,23 x 10 <sup>5</sup>	94%	44,8 µL	Macamida 71+ Celecoxib**
4,54 x 10 <sup>5</sup>	97%	22,0 µL	Macamida 71 + Celecoxib**
3,59 x 10 <sup>5</sup>	95%	27,9 µL	Macamida 71 + Celecoxib**
<b>Promedio</b>	95%	-	

\*Suspensión empleado para el efecto individual de la Macamida 71 y el Celecoxib

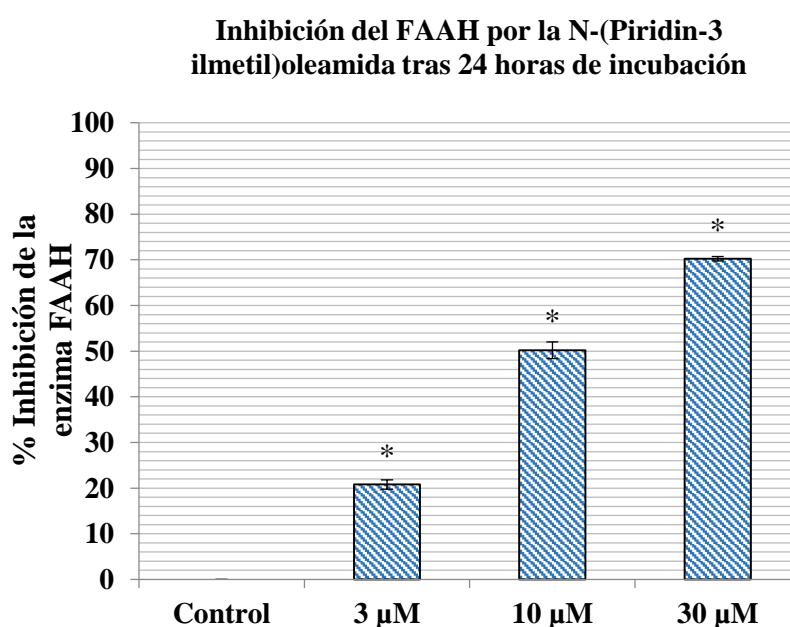
\*\* Suspensión empleado para el efecto de la Macamida 71 en combinación del Celecoxib.

Fuente: Elaboración propia

Se observa de la misma manera en la **Tabla N° 13** la concentración de células en las suspensiones estuvieron en un rango de 2.28 x 10<sup>5</sup> – 5.26 x 10<sup>5</sup> células/mL para las células MDA-MB-231, estas concentraciones fueron empleadas para determinar el volumen necesario de la suspensión celular con el objetivo de transferir 10 000 células a cada pocillo de la placa de ensayo como lo declaran algunos antecedentes.<sup>77</sup>

### 3. Ensayo del FAAH

Se evaluó el porcentaje de inhibición tras la exposición de la enzima FAAH (KIT Cayman's FAAH Inhibitor Screening Assay), a diferentes concentraciones de las Macamidas 71, 89 y 94 (3  $\mu\text{M}$  – 30  $\mu\text{M}$ ), durante 24 horas. Además, el análisis estadístico muestra que el porcentaje de inhibición de los tipos de Macamidas empleadas tras la exposición de la enzima FAAH es estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) a concentraciones iguales o mayores a 3  $\mu\text{M}$ .



**Fig. 12** La Macamida 71 inhibe la enzima FAAH en concentraciones de 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  y 30  $\mu\text{M}$ . Los valores representan el promedio  $\pm$  S.E.M.\* ( $p < 0.05$ ). ANOVA con *post-hoc* test de Tukey.

Fuente: Elaboración propia

La **Fig. 12** muestra el efecto inhibitorio concentración-dependiente (3  $\mu\text{M}$  - 30  $\mu\text{M}$ ) luego de 24 horas de exposición a la Macamida 71.

Los datos experimentales del efecto inhibitorio de la Macamida 71 sobre la enzima amida hidrolasa de Ácidos Grasos (FAAH) fueron analizados mediante una prueba de ANOVA (análisis de varianza) con *post-hoc* Test de Tukey, utilizando el software Statgraphics Centurion.

**Tabla N° 14** Resumen Estadístico de la Macamida 71 a distintas concentraciones

Grupos Experimentales	Cantidad	Promedio	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Control	4	0,00	0,00	0,00	0,00
3uM	4	20,79	2,00	18,18	22,78
10uM	4	50,22	3,67	47,13	55,53
30uM	4	70,25	1,01	69,25	71,63
Total	16	35,31	27,88	0,00	71,63

Fuente: Elaboración propia

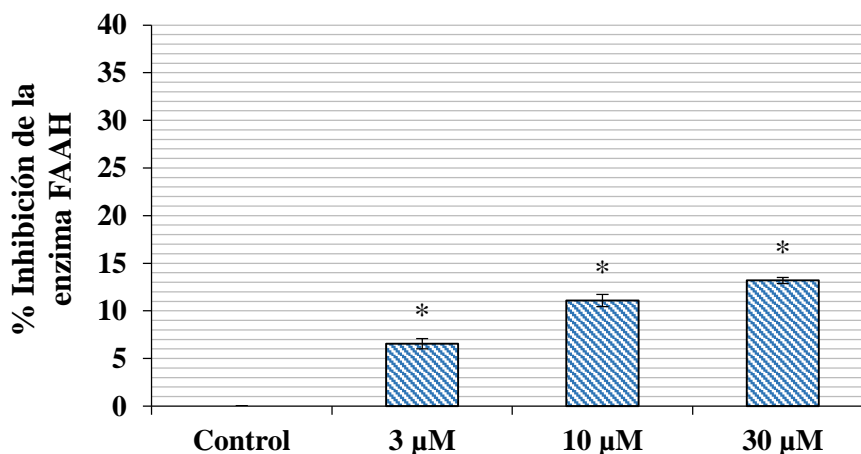
**Tabla N° 15** ANOVA de los grupos experimentales de la Macamida 71

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Cuadrado medio	F-Ratio	Valor-p
Entre grupos	11601,70	3	3867,22	838,65	0,0001
Dentro de Grupos	55,33	12	4.61		
Total (Corr.)	11657,00	15			

Fuente: Elaboración propia

Los datos experimentales de la **Tabla N° 14** fueron analizados mediante una prueba de ANOVA (análisis de varianza) de la **Tabla N° 15**.

**Inhibición del FAAH por la (9Z,12Z)-N-(Piridin-3-ilmetil)octadeca-9,12-dienamida tras 24 horas de Incubación**



**Fig. 13** La Macamida 89 inhibe la enzima FAAH en concentraciones de 3  $\mu$ M a 30  $\mu$ M. Los valores representan el promedio  $\pm$  S.E.M.\* ( $p < 0.05$ ). ANOVA con *post-hoc* test de Tukey.

Fuente: Elaboración propia

La **Fig. 13** muestra el efecto inhibitorio de la enzima FAAH concentración-dependiente (0.3  $\mu$ M - 30  $\mu$ M) luego de 24 horas de exposición a la Macamida 89.

**Tabla N° 16** Resumen Estadístico de la Macamida 89 a distintas concentraciones

Grupos Experimentales	Cantidad	Promedio	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Control	4	0,00	0,00	0,00	0,00
3uM	4	6,56	1,10	5,35	7,88
10uM	4	11,09	1,28	10,13	12,86
30uM	4	13,19	0,64	12,63	13,93
Total	16	7,71	5,28	0,00	13,93

Fuente: Elaboración propia

**Tabla N° 17** ANOVA de los grupos experimentales de la Macamida 89

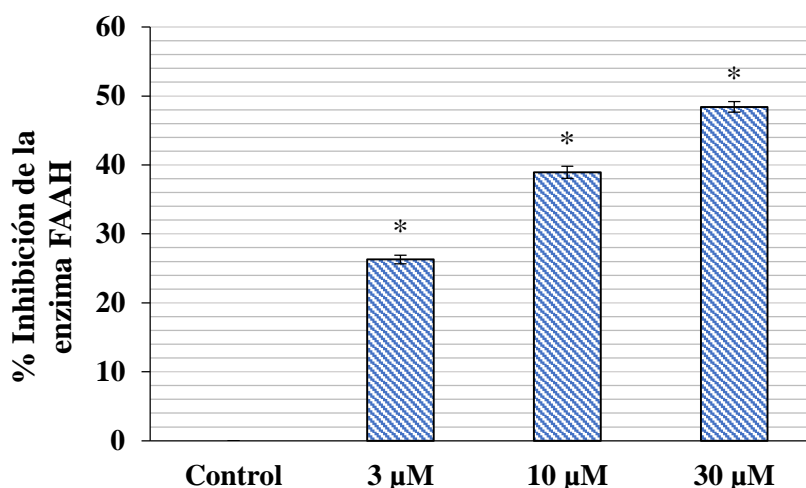
Fuente	Suma de cuadrados	Df	Cuadrado medio	F-Ratio	Valor-p
Entre grupos	408.93	3	136.31	167.98	0.0001
Dentro de Grupos	9.74	12	0.81		
Total (Corr.)	418.67	15			

Fuente: Elaboración propia

Los datos experimentales de la **Tabla N° 16** fueron analizados mediante una prueba de ANOVA (análisis de varianza) de la **Tabla N° 17** con post-hoc Test de Tukey (ANEXO), utilizando el software Statgraphics Centurion;

Con el que se evidenció que a partir de la concentración de 3  $\mu\text{M}$  de la Macamida 89 existe una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) comparada con el control (ausencia de la Macamida 89). Es decir, la Macamida 89 inhibe la enzima FAAH a concentraciones de 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  y 30  $\mu\text{M}$  tras 24 horas de incubación.

**Inhibición del FAAH por la N-(6-Cloropiridin-3-ilmetil)oleamida tras 24 horas de incubación**



**Fig. 14** La Macamida 94 inhibe la enzima FAAH en concentraciones de 3 μM a 30 μM. Los valores representan el promedio ± S.E.M.\* ( $p < 0.05$ ). ANOVA con *post-hoc* test de Tukey.

Fuente: Elaboración propia

La **Fig. 14** muestra el porcentaje de inhibición de la enzima FAAH concentración-dependiente (3 μM - 30 μM) después de 24 horas de exposición frente a la Macamida 94.

**Tabla N° 18** Resumen Estadístico de la Macamida 94 a distintas concentraciones

Grupos Experimentales	Cantidad	Promedio	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Control	4	0,00	0,00	0,00	0,00
3 μM	4	26,29	1,28	24,93	27,96
10 μM	4	38,92	1,77	37,18	41,36
30 μM	4	48,40	1,53	46,82	50,17
Total	16	28.40	18.81	0,00	50,17

Fuente: Elaboración propia

Los datos experimentales de la **Tabla N° 18** fueron analizados mediante una prueba de ANOVA (análisis de varianza) de la **Tabla N° 19** con *post-hoc* test de Tukey.

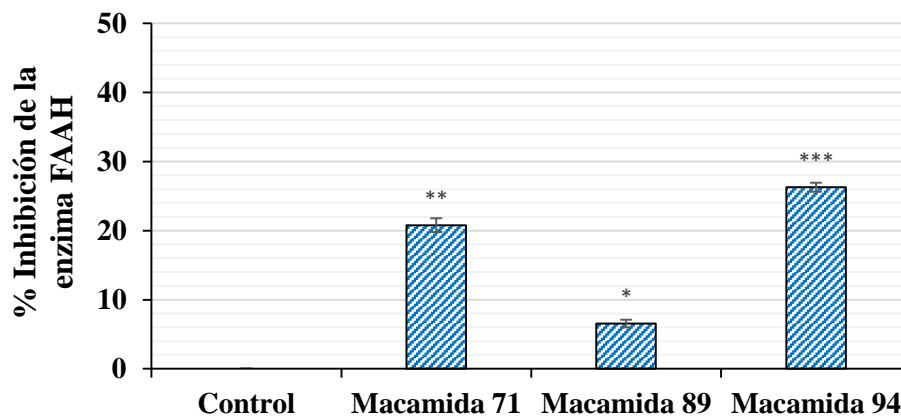
**Tabla N° 19** ANOVA de los grupos experimentales de la Macamida 94

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Cuadrado medio	F-Ratio	Valor-p
Entre grupos	5287,13	3	1762,38	993,34	0,0001
Dentro de Grupos	21,29	12	1,77		
Total (Corr.)	5308,42	15			

Fuente: Elaboración propia

La **Tabla N° 19** utilizando el software Statgraphics Centurion; se evidenció que a partir de la concentración de 3  $\mu\text{M}$  de la Macamida 94 existe una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) comparada con el control (ausencia de la Macamida 94).

**Inhibición de la enzima FAAH por las tres Macamidas 71, 89 y 94 a una concentración de 3  $\mu\text{M}$  tras 24 horas de incubación**



**Fig. 15** Las Macamidas 71, 89 y 94 inhiben la enzima FAAH en concentraciones de 3  $\mu\text{M}$ . Los valores representan el promedio  $\pm$  S.E.M. ( $p < 0.05$ ). ANOVA con *post-hoc* Test de Tukey.

Fuente: Elaboración propia

La **Fig. 15** muestra el efecto inhibitorio de la enzima FAAH concentración-dependiente 3  $\mu\text{M}$  de las Macamidas 71, 89 y 94 tras 24 horas de incubación.

Tras la evaluación del efecto inhibitorio de la enzima FAAH frente a las distintas concentraciones de las Macamidas 71, 89 y 94, también se determinó la Macamida con mayor efecto inhibitorio sobre la enzima FAAH para lo cual se optó realizar el análisis

estadístico correspondiente por cada concentración empleada de las diferentes Macamidas en 24 horas de incubación.

**Tabla N° 20** Resumen Estadístico de las Macamidas 71, 89 y 94 a 3  $\mu$ M.

Grupos Experimentales	Cantidad	Promedio	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Control	4	0,00	0,00	0,00	0,00
Macamida 71	4	20,79	1,99	18,18	22,78
Macamida 89	4	6,55	1,09	5,35	7,88
Macamida 94	4	26,29	1,28	24,93	27,96
Total	16	13,41	10,98	0,00	27,96

Fuente: Elaboración propia

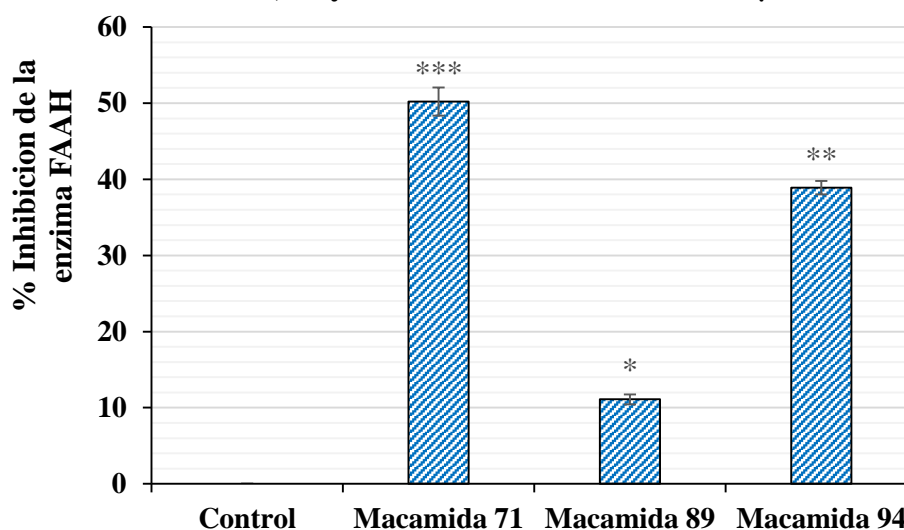
**Tabla N° 21** ANOVA de los grupos experimentales de las Macamidas 71, 89 y 94

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Cuadrado medio	F-Ratio	Valor-p
Entre grupos	1788,71	3	596,23	348,64	0.0001
Dentro de Grupos	20,52	12	1,71		
Total (Corr.)	1809,23	15			

Fuente: Elaboración propia

Los datos experimentales de la **Tabla N° 20** fueron analizados mediante una prueba de ANOVA (análisis de varianza) de la **Tabla N° 21** con *post-hoc* Test de Tukey, utilizando el software Statgraphics Centurion; con el que se evidenció que a partir de la concentración de 3  $\mu$ M de las tres Macamidas existe una diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) comparada con el control. Así mismo el test de Tukey evidencia que la Macamida 89 tiene un efecto significativo a las Macamidas 71 y 94, es decir la Macamida 89 a una concentración de 3  $\mu$ M tiene un mejor efecto inhibitorio sobre la enzima FAAH.

**Inhibición de la enzima FAAH por las tres Macamidas 71, 89 y 94 a una concentración de 10  $\mu$ M**



**Fig. 16** Las Macamidas 71, 89 y 94 inhiben la enzima FAAH en concentraciones de 10  $\mu$ M. Los valores representan el promedio  $\pm$  S.E.M.\* ( $p < 0,05$ ). ANOVA con post-hoc test de Tukey.

Fuente: Elaboración propia

La **Fig. 16** muestra el porcentaje de inhibición de la enzima FAAH concentración-dependiente de 10  $\mu$ M de las Macamidas 71, 89 y 94 después 24 horas de exposición.

**Tabla N° 22** Resumen Estadístico de las Macamidas 71, 89 y 94 a 10  $\mu$ M

Grupos Experimentales	Cantidad	Promedio	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Control	4	0,00	0,00	0,00	0,00
Macamida 71	4	50,21	3,66	47,13	55,53
Macamida 89	4	11,09	1,28	10,13	12,86
Macamida 94	4	38,92	1,77	37,18	41,36
Total	16	25,06	21,05	0,00	55,53

Fuente: Elaboración propia

Los datos experimentales de la **Tabla N° 22** fueron analizados mediante una prueba de ANOVA (análisis de varianza) de la **Tabla N° 23** con *post-hoc* test de Tukey.

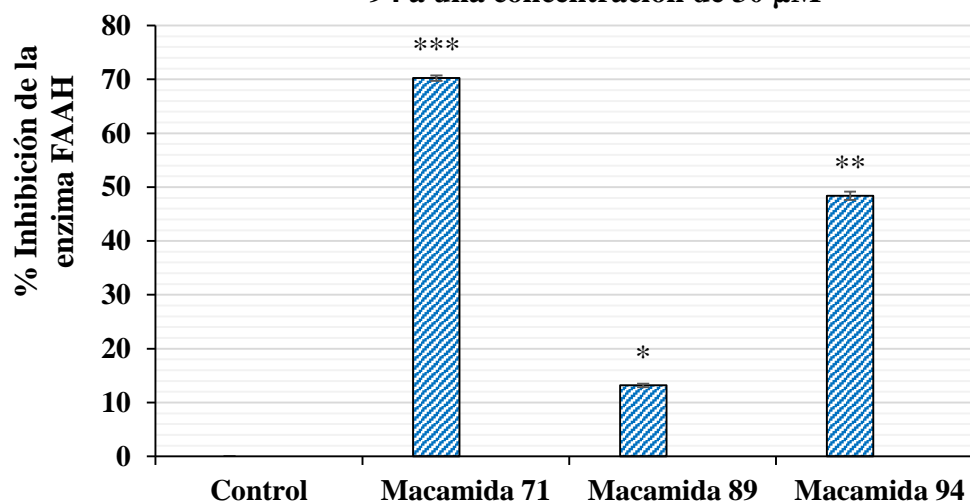
**Tabla N° 23** ANOVA de los grupos experimentales de las Macamidas 71, 89 y 94

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Cuadrado medio	F-Ratio	Valor-p
Entre grupos	6592,15	3	2197,38	483,19	0,0001
Dentro de Grupos	54,57	12	4,55		
Total (Corr.)	6646,72	15			

Fuente: Elaboración propia

La **Tabla N° 23**, utilizando el software Statgraphics Centurion; se evidenció que a las concentraciones de 10  $\mu\text{M}$  de las tres Macamidas existe una diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) comparada con el control. Así mismo el Test de Tukey evidencia que la Macamida 71 tiene un efecto inhibitorio significativo a las Macamidas 89 y 94, es decir la Macamida 71 a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  tiene un mejor efecto inhibitorio sobre la enzima FAAH.

**Inhibición de la enzima FAAH por las tres Macamidas 71, 89 y 94 a una concentración de 30  $\mu\text{M}$**



**Fig. 17** Las Macamidas 71, 89 y 94 inhiben la enzima FAAH en concentraciones de 30  $\mu\text{M}$ . Los valores representan el promedio  $\pm$  S.E.M.\* ( $p < 0.05$ ). ANOVA con post-hoc Test de Tukey.

Fuente: Elaboración propia

La **Fig. 17** muestra el efecto inhibitorio de la enzima FAAH concentración-dependiente 30  $\mu\text{M}$  de las Macamidas 71, 89 y 94 tras 24 horas de exposición.

**Tabla N° 24** Resumen Estadístico de las Macamidas 71, 89 y 94 a 30  $\mu$ M

<b>Grupos Experimentales</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
Control	4	0,00	0,00	0,00	0,00
Macamida 71	4	70,25	1,01	69,25	71,63
Macamida 89	4	13,19	0,64	12,63	13,93
Macamida 94	4	48,40	1,53	46,82	50,17
Total	16	32,96	28,79	0,00	71,63

Fuente: Elaboración propia

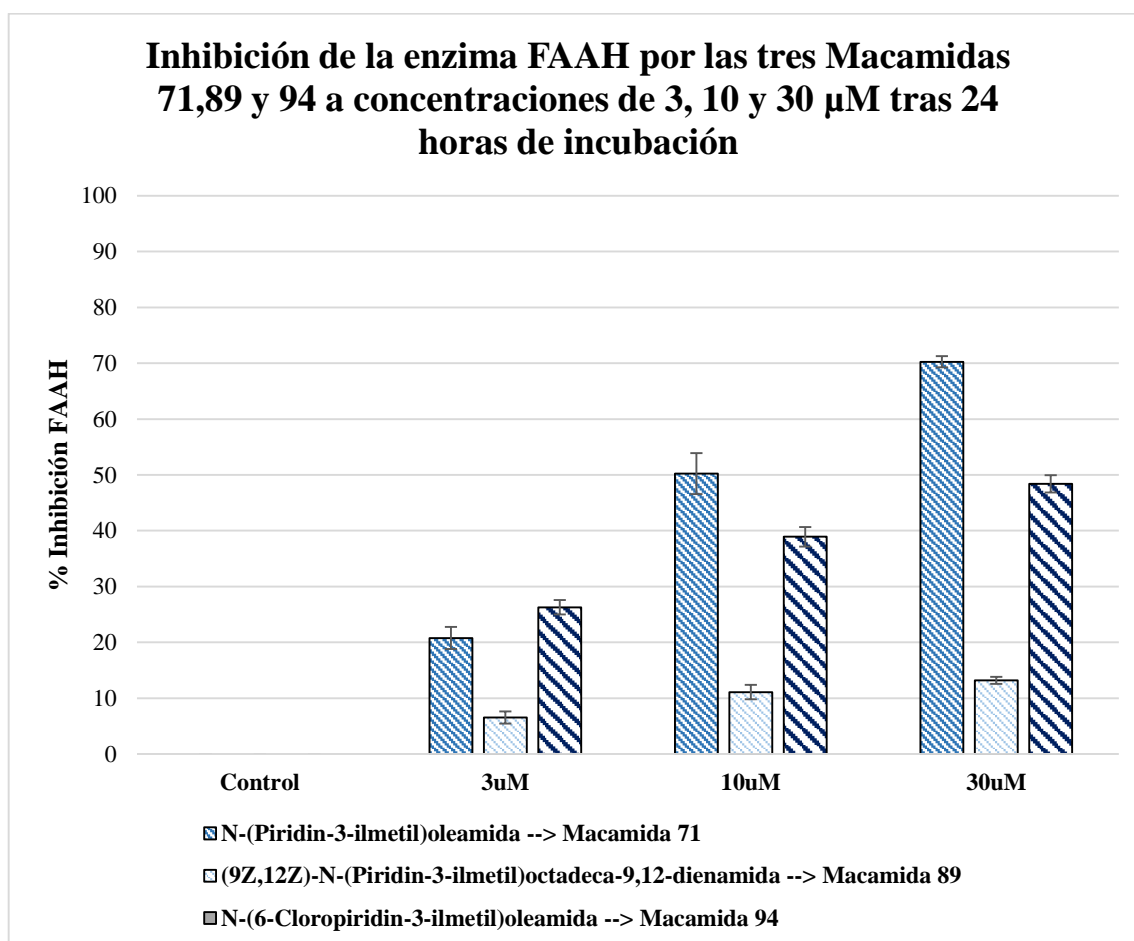
**Tabla N° 25** ANOVA de los grupos experimentales de las Macamidas 71, 89 y 94

<b>Fuente</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Df</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>F-Ratio</b>	<b>Valor-p</b>
Entre grupos	12424.2	3	4141.39	4410.29	0.0001
Dentro de Grupos	11.26	12	0.94		
Total (Corr.)	12435.4	15			

Fuente: Elaboración propia

Los datos experimentales fueron analizados mediante una prueba de ANOVA (análisis de varianza) de la **Tabla N° 24** con post-hoc Test de Tukey, utilizando el software Statgraphics Centurion como se evidencia en la **Tabla N° 25**; con el que se evidenció que a la concentración de 30  $\mu$ M de las tres Macamidas existe una diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) comparada con el control. Así mismo el Test de Tukey evidencia que la Macamida 71 tiene un efecto significativo a las Macamidas 89 y 94, es decir la Macamida 71 a una concentración de 30  $\mu$ M tiene un mejor efecto inhibitorio sobre la enzima FAAH.

Las Macamidas 71, 89 y 94 inhiben la enzima FAAH significativamente, a su vez la Macamida 94 a una concentración de 3  $\mu$ M obtuvo mejores resultados tras 24 horas; sin embargo, la Macamida 71 mostró tener mejor efecto en las concentraciones de 10  $\mu$ M y 30  $\mu$ M tras 24 horas de exposición permitiéndonos mediante el Test de Tukey optar como la mejor opción para el tratamiento de las células MD-MB-231.



**Fig. 18** Las Macamidas 71, 89 y 94 inhiben la enzima FAAH en concentraciones de 3, 10 y 30  $\mu$ M.

Fuente: Elaboración propia

La **Fig. 18** evidencia el efecto inhibitorio de las Macamidas 71, 89 y 94 sobre la enzima FAAH tras 24 horas de exposición, donde se determinó que los tres tipos de Macamidas tienen un efecto significativo a las concentraciones realizadas a comparación del grupo control.

En trabajos de investigación realizados con anterioridad por Almukadi y colaboradores, en el 2013, descubrieron que uno de los análogos a las Macamidas utilizadas en este estudio, tiene un efecto inhibitorio en la enzima FAAH, que es una enzima importante involucrada en la degradación de los endocannabinoides.<sup>78</sup> Además, los Inhibidores de FAAH podrían ser neuroprotectores prometedores debido a la fuerte participación en los endocannabinoides.<sup>79</sup>

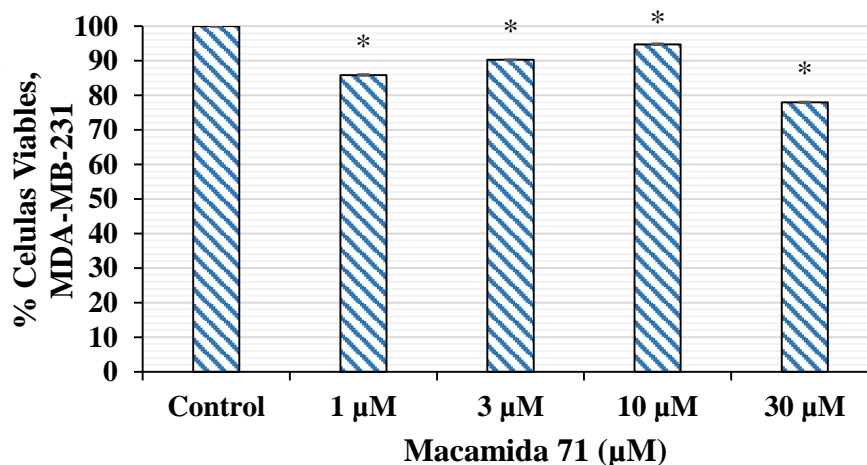
Las Macamidas descritas en este trabajo de investigación, logran un efecto inhibitorio destacando como la mejor opción la Macamida 71, considerando que su función inhibitoria sobre la enzima FAAH es dada efectivamente tras 24 horas en comparación de los otros tipos de Macamidas (Macamida 89 y Macamida 94).

#### 4. Efecto de la Macamida 71 y el Celecoxib sobre la viabilidad celular

##### 4.1. Efecto de las Macamidas sobre la viabilidad celular

La viabilidad celular en el cáncer de mama se mide y se compara en la ausencia y la presencia del efecto de las diferentes concentraciones de la Macamida 71 en relación con el control (DMSO 1% y PBS) en las células MDA-MB-231. Las concentraciones de la Macamida 71 fueron tomadas de antecedentes investigativos donde se trabajaron con esta misma planta.<sup>80,81</sup>

El efecto que produce la Macamida 71 sobre las células MDA-MB-231 se evaluó determinando la viabilidad celular por el método de MTS.



**Fig. 19** Inhibición de la viabilidad celular, luego de la exposición de las células MDA-MB-231 a diferentes concentraciones (1 µM – 30 µM) de la Macamida 71 tras 24 horas. Los valores representan el promedio ± S.E.M.\* (p<0.05). ANOVA con post-hoc Test de Tukey.

Fuente: Elaboración propia

La **Fig. 19** muestra el efecto antineoplásico concentración-dependiente de la Macamida 71 (1 µM-30 µM) sobre las células MDA-MB-231 luego de 24 horas de exposición a la Macamida 71.

**Tabla N° 26** Resumen estadístico de las Macamidas 71 tras 24 horas de Incubación

Grupos Experimentales	Cantidad	Promedio	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Control	18	100,00	0,59	98,87	101,13
1 $\mu$ M	18	85,88	1,03	84,14	87,83
3 $\mu$ M	18	90,26	0,69	88,68	91,11
10 $\mu$ M	18	94,78	0,91	93,30	96,32
30 $\mu$ M	18	77,97	0,91	76,51	80,36

Fuente: Elaboración propia

El porcentaje de células viables de la **Tabla N° 26** se determinó mediante una prueba de ANOVA (análisis de varianza) en la **Tabla N° 27**.

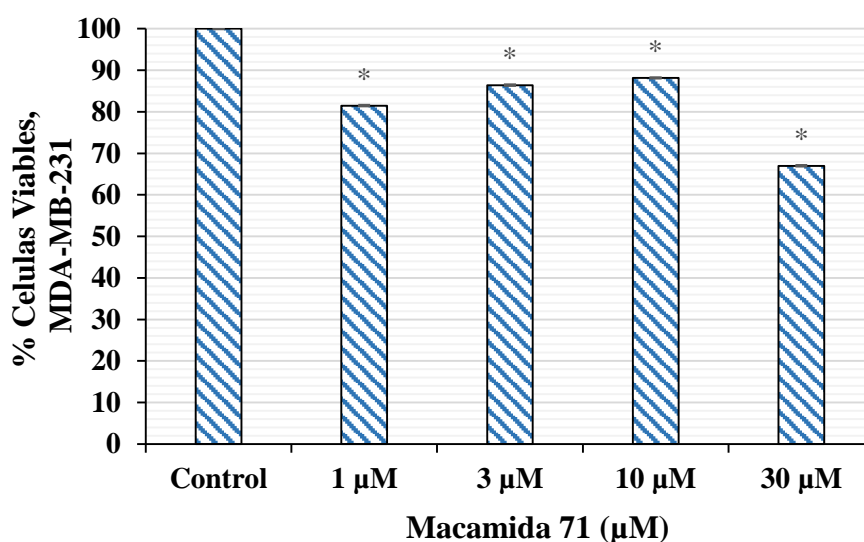
**Tabla N° 27** ANOVA de los grupos experimentales de las Macamidas 71 tras 24 horas de Incubación

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Cuadrado medio	F-Ratio	Valor-p
Entre grupos	5119,58	4	1279,90	1815,60	0,0001
Dentro de Grupos	59,92	85	0,70		
Total (Corr.)	5179,50	89			

Fuente: Elaboración propia

Los datos experimentales fueron analizados por el Test de Tukey; con el que se evidenció que a partir de la concentración de 1  $\mu$ M de la Macamida 71 existe una diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) comparada con el control (crecimiento de células en ausencia de la Macamida 71).

Los resultados de la viabilidad celular muestran que las células MDA-MB-231 al ser tratadas con las diferentes concentraciones (1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 10  $\mu$ M y 30  $\mu$ M) de la Macamida 71 son consistentes y se evidencia el efecto antineoplásico de la Macamida 71 en las células MDA-MB-231 *in vitro* habiendo diferencia significativa en todas las concentraciones comparadas con el grupo control (células sin daño).



**Fig. 20** Inhibición de la viabilidad celular, luego de la exposición de las células MDA-MB-231 a diferentes concentraciones (1 µM – 30 µM) de la Macamida 71 tras 48 horas. Los valores representan el promedio  $\pm$  S.E.M.\* ( $p < 0.05$ ). ANOVA con post-hoc Test de Tukey.

Fuente: Elaboración propia

La **Fig. 20** muestra el efecto antineoplásico concentración-dependiente de la Macamida 71 (1 µM - 30 µM) sobre las células MDA-MB-231 luego de 48 horas de exposición a la Macamida 71.

**Tabla N° 28** Resumen Estadístico de las Macamidas 71 tras 48 horas de Incubación

Grupos Experimentales	Cantidad	Promedio	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Control	18	100,01	0,49	99,12	100,70
1 µM	18	81,49	0,90	79,17	82,64
3 µM	18	86,42	0,72	84,77	87,38
10 µM	18	88,16	0,77	86,64	89,30
30 µM	18	66,99	0,88	65,98	69,15

Fuente: Elaboración propia

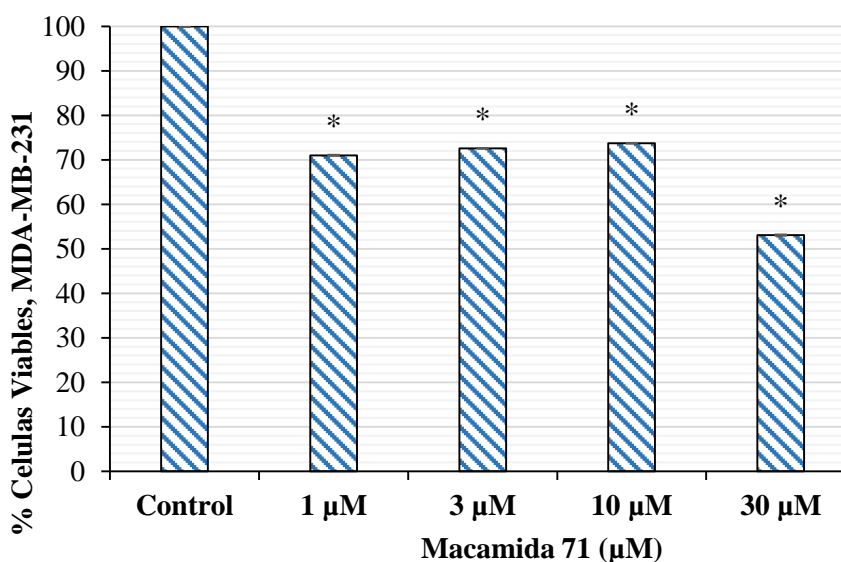
El porcentaje de células viables de la **Tabla N° 28** se determinó mediante una prueba de ANOVA (análisis de varianza) que se evidencia en la **Tabla N° 29**.

**Tabla N° 29** ANOVA de los grupos experimentales de las Macamidas 71 tras 48 horas de Incubación

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Cuadrado medio	F-Ratio	Valor-p
Entre grupos	10319,30	4	2579,83	4383,48	0,0001
Dentro de Grupos	50,02	85	0,59		
Total (Corr.)	10369,30	89			

Fuente: Elaboración propia

Los datos experimentales fueron analizados por el Test de Tukey, utilizando el software Statgraphics Centurion; con el que se evidenció que a partir de la concentración de 1  $\mu\text{M}$  de la Macamida 71 existe una diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) comparada con el control.



**Fig. 21** Inhibición de la viabilidad celular, luego de la exposición de las células MDA-MB-231 a diferentes concentraciones (1  $\mu\text{M}$  – 30  $\mu\text{M}$ ) de la Macamida 71 tras 72 horas. Los valores representan el promedio  $\pm$  S.E.M.\* ( $p < 0.05$ ). ANOVA con post-hoc test de Tukey.

Fuente: Elaboración propia

La **Fig. 21** muestra el efecto antineoplásico concentración-dependiente de la Macamida 71 (1  $\mu\text{M}$  - 30  $\mu\text{M}$ ) sobre las células MDA-MB-231 luego de 72 horas de exposición a la Macamida 71.

**Tabla N° 30** Resumen Estadístico de las Macamidas 71 tras 72 horas de Incubación

Grupos Experimentales	Cantidad	Promedio	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Control	18	100,00	0,83	99,13	101,55
1 $\mu$ M	18	71,00	0,41	70,49	71,51
3 $\mu$ M	18	72,57	0,36	71,89	73,04
10 $\mu$ M	18	73,73	0,35	73,29	74,18
30 $\mu$ M	18	53,05	0,65	51,78	53,82

Fuente: Elaboración propia

**Tabla N° 31** ANOVA de los grupos experimentales de las Macamidas 71 tras 72 horas de Incubación

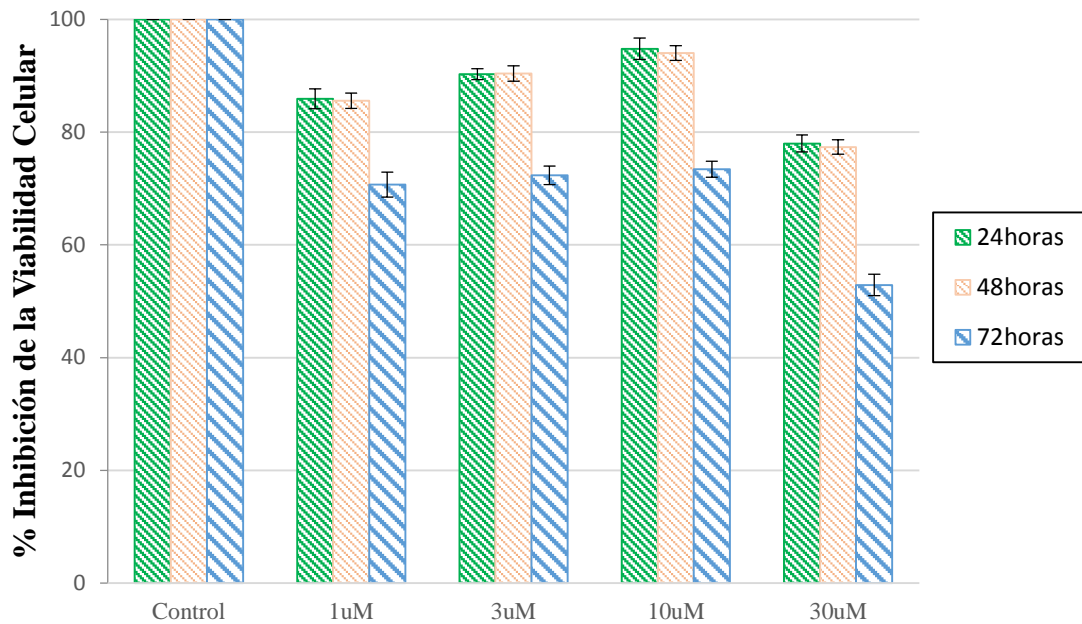
Fuente	Suma de cuadrados	Df	Cuadrado medio	F-Ratio	Valor-p
Entre grupos	20265,30	4	5066,31	16611,05	0,0001
Dentro de Grupos	25,92	85	0,30		
Total (Corr.)	20291,20	89			

Fuente: Elaboración propia

El porcentaje de células viables de la **Tabla N° 30** se determinó mediante una prueba de ANOVA (análisis de varianza) que se evidencia en la **Tabla N° 31**. Los datos experimentales fueron analizados con el Test de Tukey, utilizando el software Statgraphics Centurion; con el que se evidenció que a partir de la concentración de 1  $\mu$ M de la Macamida 71 existe una diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) comparada con el control (células sin daño alguno).

Los resultados de la viabilidad celular muestran que las células MDA-MB-231 al ser tratadas con las diferentes concentraciones (1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 10  $\mu$ M y 30  $\mu$ M) de la Macamida 71 son consistentes y se evidencia el efecto antineoplásico de la Macamida 71 en las células MDA-MB-231 *in vitro* habiendo diferencia significativa en todas las concentraciones comparadas con el grupo control (células sin daño alguno).

**Inhibición de la Viabilidad Celular de la Macamida 71 a las 24, 48 y 72 horas de tratamiento**

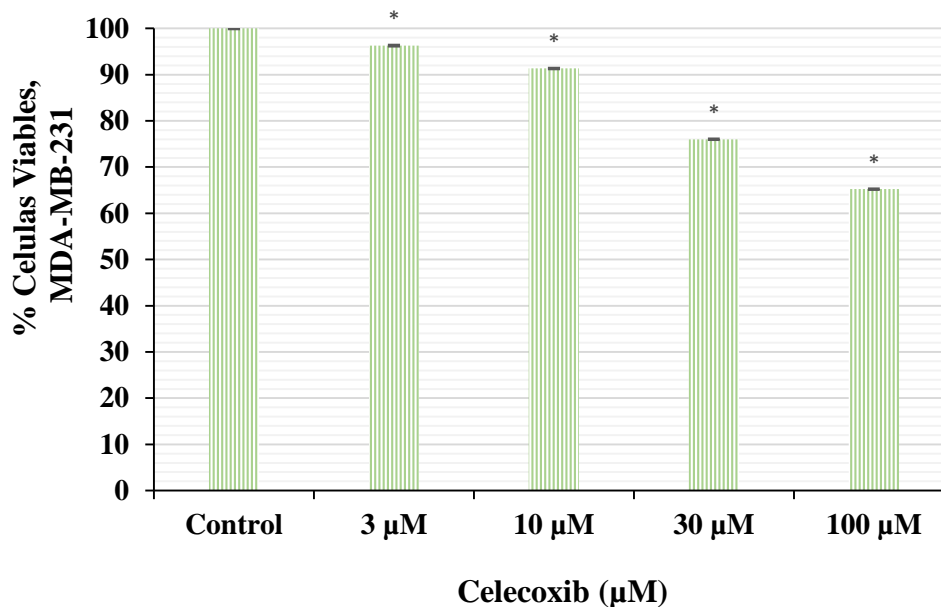


**Fig. 22** Concentraciones utilizadas de Macamida 71 (1  $\mu\text{M}$  – 30  $\mu\text{M}$ ) y el grupo Control en la inhibición de la viabilidad celular a las 24, 48 y 72 horas.  
Fuente: Elaboración propia

La **Fig. 22** evidencia el efecto inhibitorio de las Macamida 71 sobre la viabilidad celular de la línea celular MDA-MB 231 tras 24, 48 y 72 horas de exposición, donde se determinó tienen un efecto significativo a las concentraciones realizadas a comparación del grupo control.

**4.2. Efecto del Celecoxib sobre la viabilidad celular**

La viabilidad celular en el cáncer de mama se mide y se compara en la ausencia y la presencia del efecto de las diferentes concentraciones del Celecoxib en relación con el control (DMSO 1 % y PBS) en las células MDA-MB-231. Se usó el Celecoxib por ser un AINE que ha demostrado inhibición de los tumores de mama e intestinales en modelos animales, también es un inhibidor selectivo de la COX-2 que puede ser un mecanismo importante o una estrategia para la prevención y el tratamiento del cáncer como lo refieren algunos antecedentes investigativos.<sup>82</sup>



**Fig. 23** El Celecoxib en células MDA-MB-231, luego de la exposición con diferentes concentraciones del Celecoxib (3 µM – 100 µM) durante 24 horas. Los valores representan el promedio ± S.E.M. \* (p < 0.05). ANOVA con post-hoc Test de Tukey.

Fuente: Elaboración propia

Los resultados de la viabilidad celular muestran que las células MDA-MB-231 al ser tratadas con las diferentes concentraciones (3 µM, 10 µM, 30 µM) y 100 µM) del Celecoxib son consistentes y se evidencia el efecto antineoplásico en las células MDA-MB-231 *in vitro* habiendo diferencia significativa en todas las concentraciones comparadas con el grupo control (células sin daño alguno).

**Tabla N° 32** Resumen Estadístico del Celecoxib tras 24 horas de Incubación

Grupos Experimentales	Cantidad	Promedio	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Control	18	100,00	0,74	98,62	101,02
3 µM	18	96,27	0,80	94,88	97,33
10 µM	18	91,33	0,67	90,31	92,21
30 µM	18	76,02	0,66	74,94	77,28
100 µM	18	65,22	0,76	63,92	66,58
Total	90	85,77	13,21	63,92	101,02

Fuente: Elaboración propia

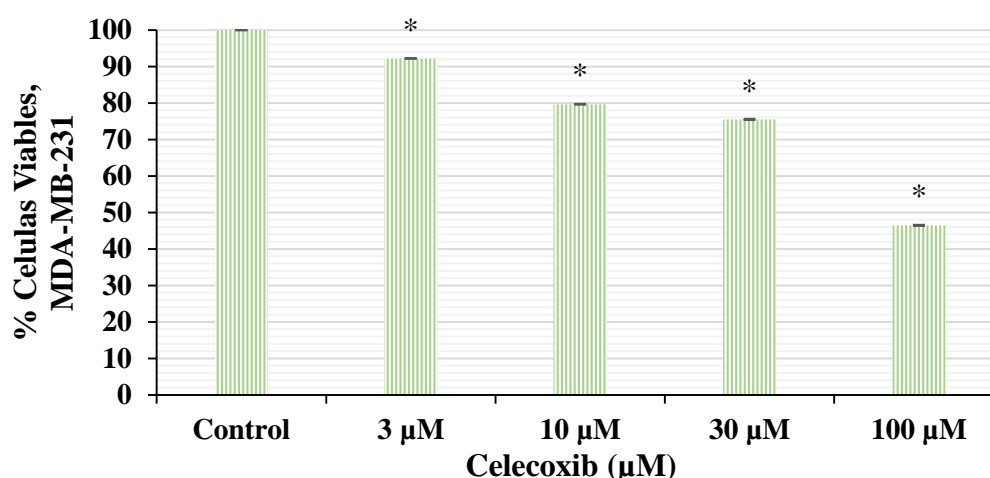
El análisis estadístico evidencia la disminución de la viabilidad celular que es estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) como se muestra en **Tabla N° 32** a concentraciones iguales o mayores a  $3 \mu\text{M}$ , con el cual inhibió significativamente el crecimiento celular. Estos estudios mencionados utilizaron la misma línea celular.<sup>83</sup>

**Tabla N° 33** ANOVA de los grupos experimentales del Celecoxib tras 24 horas de Incubación

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Cuadrado medio	F-Ratio	Valor-p
Entre grupos	15497,60	4	3874,40	7287,03	0.0001
Dentro de Grupos	45,19	85	0,53		
Total (Corr.)	15542,80	89			

Fuente: Elaboración propia

Se evidencia en la **Tabla N° 33** los datos estadísticos y el Test de Tukey. Donde cabe destacar que los resultados mostrados de la efectividad tras las 24 horas de incubación, ratifican y guardan semejanza al estudio de Half y Rezaei con sus respectivos colaboradores, tras su estudio con el Celecoxib en líneas cancerosas del seno.<sup>82,84</sup>



**Fig. 24** El Celecoxib en células MDA-MB-231, luego de la exposición con diferentes concentraciones del Celecoxib ( $3 \mu\text{M}$  –  $100 \mu\text{M}$ ) durante 48 horas. Los valores representan el promedio  $\pm$  S.E.M.\*( $p < 0.05$ ). ANOVA con post-hoc Test de Tukey.

Fuente: Elaboración propia

La **Fig. 24** muestra el efecto antineoplásico concentración-dependiente del Celecoxib (3  $\mu\text{M}$  - 100  $\mu\text{M}$ ) sobre las células MDA-MB-231 luego de 48 horas de exposición al Celecoxib.

**Tabla N° 34** Resumen Estadístico del Celecoxib tras 48 horas de Incubación

Grupos Experimentales	Cantidad	Promedio	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Control	18	100,00	0,48	99,19	100,85
3 $\mu\text{M}$	18	92,19	0,69	90,67	93,64
10 $\mu\text{M}$	18	79,64	0,60	78,57	80,52
30 $\mu\text{M}$	18	75,50	0,74	74,54	77,14
100 $\mu\text{M}$	18	46,47	0,66	45,41	47,92
Total	90	78,76	18,47	45,41	100,85

Fuente: Elaboración propia

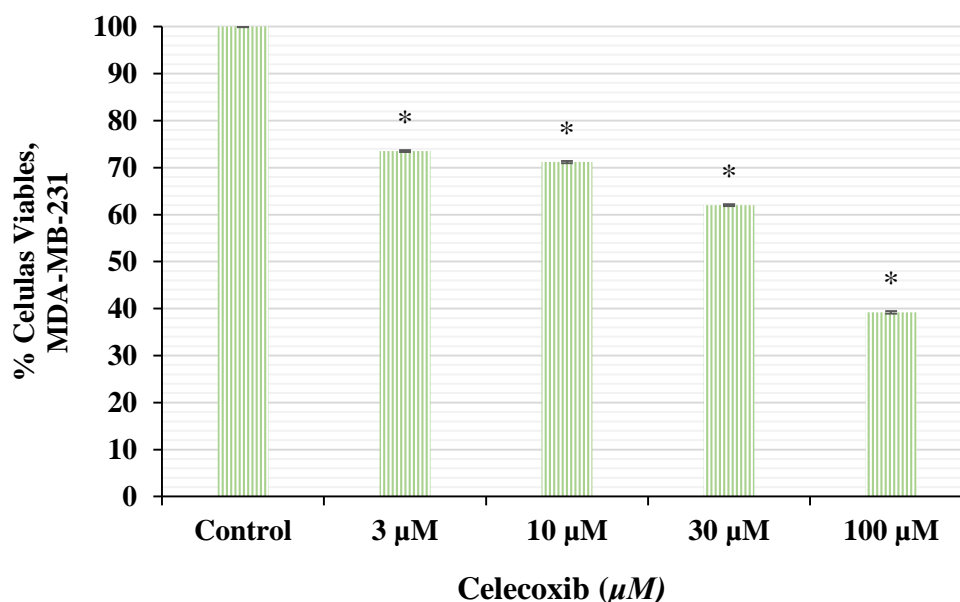
El porcentaje de células viables de la **Tabla N° 34** se determinó mediante una prueba de ANOVA (análisis de varianza) que se evidencia en la **Tabla N° 35**.

**Tabla N° 35** ANOVA de los grupos experimentales del Celecoxib tras 48 horas de Incubación

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Cuadrado medio	F-Ratio	Valor-p
Entre grupos	30343.5	4	7585.88	18389.75	0.0001
Dentro de Grupos	35.063	85	0.412506		
Total (Corr.)	30378.6	89			

Fuente: Elaboración propia

Los datos experimentales fueron analizados con el Test de Tukey, utilizando el software Statgraphics Centurion; con el que se evidenció que a partir de la concentración de 3  $\mu\text{M}$  del Celecoxib existe una diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) comparada con el control (células sin daño alguno).



**Fig. 25** El Celecoxib en células MDA-MB-231, luego de la exposición con diferentes concentraciones del Celecoxib (3 µM – 100 µM) durante 72 horas. Los valores representan el promedio ± S.E.M.\*(p<0.05). ANOVA con post-hoc test de Tukey.  
Fuente: Elaboración propia

La **Fig. 25** muestra el efecto antineoplásico concentración-dependiente del Celecoxib (3 µM - 100 µM) sobre las células MDA-MB-231 luego de 72 horas de exposición al Celecoxib.

**Tabla N° 36** Resumen Estadístico del Celecoxib tras 72 horas de Incubación

Grupos Experimentales	Cantidad	Promedio	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Control	18	10,02	0,62	98,96	101,3
3 µM	18	73,50	0,81	72,08	75,17
10 µM	18	71,20	1,00	68,97	72,92
30 µM	18	62,04	0,87	61,02	64,16
100 µM	18	39,20	1,17	36,51	40,82
Total	90	69,19	19,74	36,51	101,30

Fuente: Elaboración propia

**Tabla N° 37** ANOVA de los grupos experimentales del  
Celecoxib tras 72 horas de Incubación

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Cuadrado medio	F-Ratio	Valor-p
Entre grupos	34626,90	4	8656,72	10405,50	0,0001
Dentro de Grupos	70,71	85	0,83		
Total (Corr.)	34697,60	89			

Fuente: Elaboración propia

El porcentaje de células viables de la **Tabla N° 36** se determinó mediante una prueba de ANOVA (análisis de varianza) que se evidencia en la **Tabla N° 37**. Los datos experimentales fueron analizados con el Test de Tukey (ANEXO), utilizando el software Statgraphics Centurion; con el que se evidenció que a partir de la concentración de 3  $\mu\text{M}$  del Celecoxib existe una diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) comparada con el grupo control (células sin daño alguno).

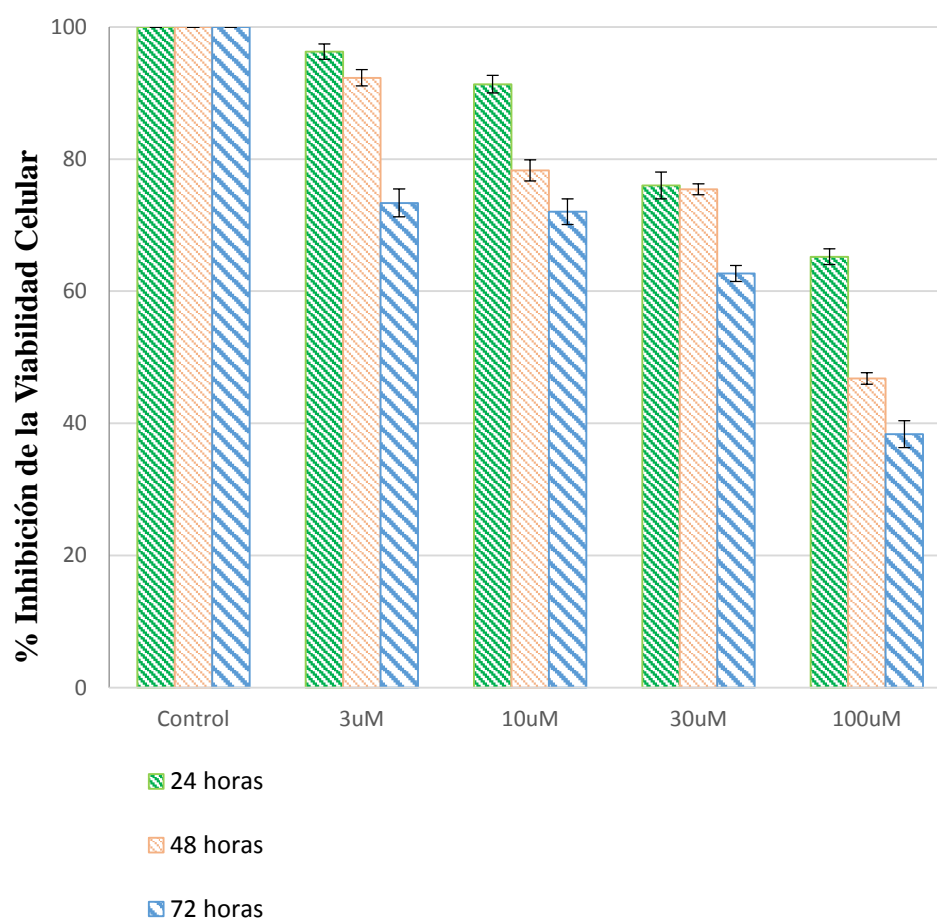
Los resultados de la viabilidad celular muestran que las células MDA-MB-231 al ser tratadas con las diferentes concentraciones (3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$ ) del Celecoxib son consistentes y se evidencia el efecto antineoplásico en las células MDA-MB-231 *in vitro* habiendo diferencia significativa en todas las concentraciones comparadas con el grupo control (células sin daño alguno). Cabe destacar que los resultados mostrados de la efectividad son tras 72 horas de incubación.

La ciclooxigenasa-2 (COX-2) promueve la carcinogénesis, la proliferación tumoral, la angiogénesis, la prevención de la apoptosis y la inmunosupresión. Mientras tanto, la sobreexpresión de COX-2 se ha asociado con el comportamiento del tumor y el pronóstico en varios cánceres.

Este estudio investigó los efectos antitumorales del inhibidor selectivo de la COX-2, el Celecoxib, sobre el cáncer de mama *in vitro*.

Estudios realizados con anterioridad informan que el Celecoxib inhibe la proliferación de dos líneas celulares, MCF-7 y MDA-MB-231 *in vitro* donde se observó el tiempo y forma dependiente de la dosis. El Celecoxib efectivamente regula la expresión de COX-2.<sup>85,86</sup>

### Inhibición de la Viabilidad Celular del Celecoxib a las 24, 48 y 72 horas de tratamiento



**Fig. 26** Concentraciones utilizadas de Celecoxib (3 µM –100 µM) y el grupo Control en la inhibición de la viabilidad celular a las 24, 48 y 72 horas.

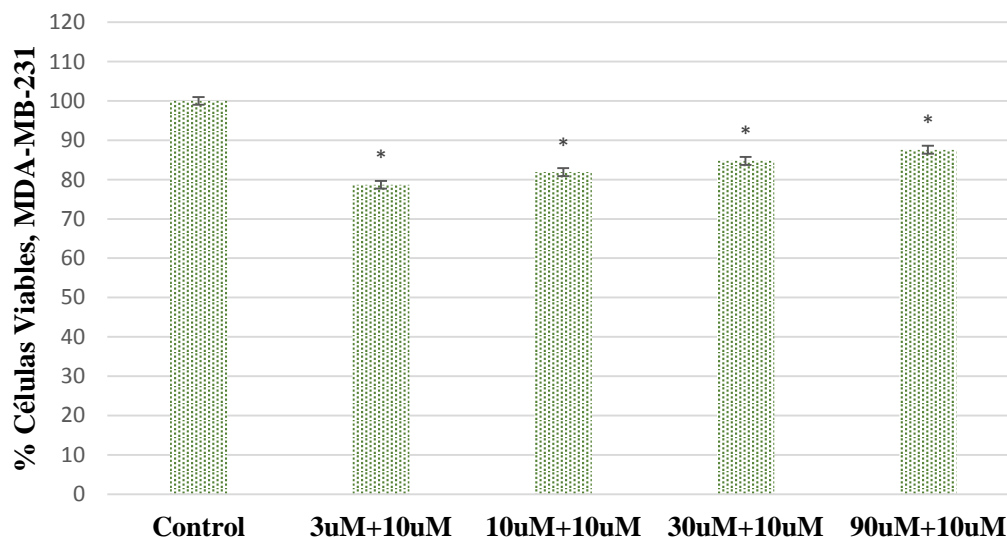
Fuente: Elaboración propia

La **Fig. 26** evidencia el efecto inhibitorio del Celecoxib sobre la viabilidad celular de la línea celular MDA-MB 231 tras 24, 48 y 72 horas de exposición, donde se determinó tienen un efecto significativo a las concentraciones realizadas a comparación del grupo control.

#### 4.3. Efecto de la combinación de la Macamida 71 y el Celecoxib sobre la viabilidad de células MDA-MB-231

En el presente estudio se evaluó el efecto que produce la combinación de diferentes concentraciones de la Macamida 71 ( $3\mu\text{M}$  –  $90\mu\text{M}$ ) con el Celecoxib a una concentración de  $10\mu\text{M}$ . La concentración de  $10\mu\text{M}$  del Celecoxib fue tomada como referencia de antecedentes investigativos para evaluar un posible escenario de potenciación antineoplásico tras la combinación con las concentraciones de la Macamida 71.

Existe evidencia experimental de que la combinación de la Macamida 71 con el Celecoxib mantiene un efecto antineoplásico en todas las combinaciones en las primeras 24 horas; sin embargo, su efectividad es menor a lo esperado tras la combinación de ambos tratamientos, es decir su efecto antineoplásico individualmente es mucho mejor que estando en combinación.



**Fig. 27** Efecto de la Macamida 71 y el Celecoxib en células MDA-MB-231, luego de la exposición con diferentes combinaciones de la Macamida 71 ( $3\mu\text{M}$  -  $90\mu\text{M}$ ) y Celecoxib ( $10\mu\text{M}$ ), durante 24 horas. Los valores representan el promedio  $\pm$  S.E.M. \* ( $p < 0.05$ ) ANOVA con post-hoc Test de Tukey.

Fuente: Elaboración propia

La **Fig. 27** muestra el efecto antineoplásico de la combinación de la Macamida 71 y el Celecoxib en las células MDA-MB-231.

En este estudio, el Celecoxib añadido a la Macamida 71 dio lugar a la muerte celular, pero los efectos antagónicos aparentemente fueron consistentes tras 24 horas de exposición de la línea celular MD-MB-231 en las combinaciones de las concentraciones más altas de la Macamida 71 con el Celecoxib.

**Tabla N° 38** Resumen Estadístico de la Macamida 71 con Celecoxib tras 24 horas de Incubación

Grupos Experimentales	Cantidad	Promedio	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Control	18	100,00	0,73	98,89	101,29
3 µM+10 µM	18	78,69	0,99	76,98	80,47
10 µM+10 µM	18	81,90	0,86	80,47	83,71
30 µM+10 µM	18	84,76	0,76	83,71	85,95
90 µM+10 µM	18	87,57	1,20	85,05	89,42
Total	90	86,58	7,42	76,98	101,29

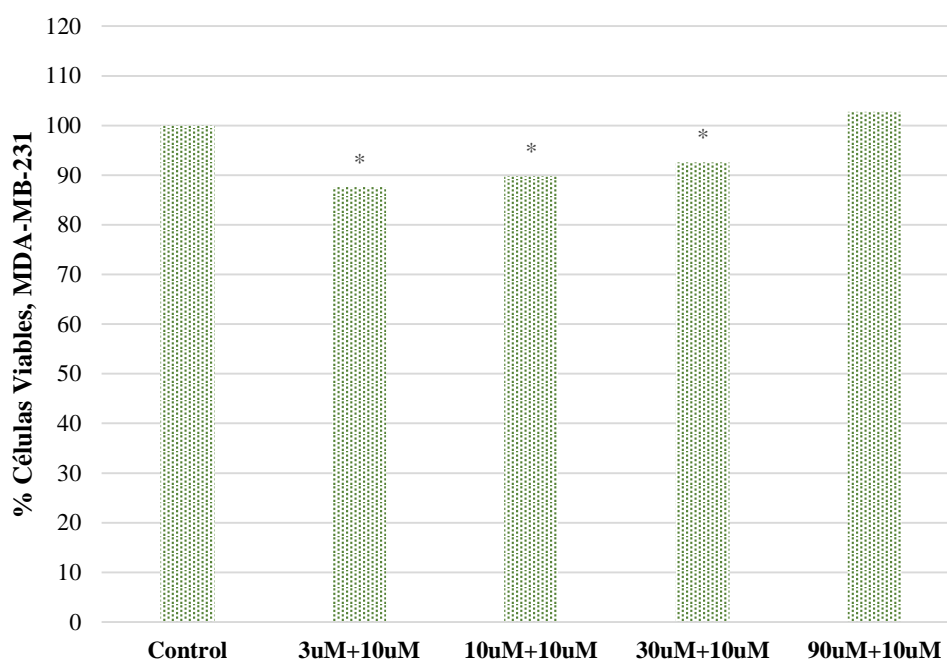
Fuente: Elaboración propia

No obstante, se realizó el análisis estadístico que se observa en la **Tabla N° 38**, el análisis de varianza ANOVA de **Tabla N° 39** con post hoc Test de Tukey, donde se evidenció una disminución significativa de la viabilidad celular ( $p < 0.05$ ) comparado con el grupo control tras las combinaciones.

**Tabla N° 39** ANOVA de los grupos experimentales 24 horas de incubación

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Cuadrado medio	F-Ratio	Valor-p
Entre grupos	4832.61	4	1208.15	1412.68	0.0001
Dentro de Grupos	72.69	85	0.85		
Total (Corr.)	4905.31	89			

Fuente: Elaboración propia



**Fig. 28** Efecto de la Macamida 71 y el Celecoxib en células MDA-MB-231, luego de la exposición con diferentes combinaciones de la Macamida 71 (3  $\mu$ M - 90  $\mu$ M) y Celecoxib (10  $\mu$ M), durante 48 horas. Los valores representan el promedio  $\pm$  S.E.M. \* ( $p < 0.05$ ). ANOVA con post-hoc Test de Tukey.  
Fuente: Elaboración propia

La **Fig. 28** muestra el efecto antineoplásico de la combinación de la Macamida 71 y Celecoxib en las células MDA-MB-231.

**Tabla N° 40** Resumen Estadístico de la Macamida 71 con el Celecoxib tras 48 horas de Incubación

Grupos Experimentales	Cantidad	Promedio	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Control	18	10,00	0,68	98,58	101,27
3 $\mu$ M+10 $\mu$ M	18	87,58	0,87	86,06	89,05
10 $\mu$ M+10 $\mu$ M	18	89,79	0,72	88,54	91,09
30 $\mu$ M+10 $\mu$ M	18	92,58	0,86	91,07	93,92
90 $\mu$ M+10 $\mu$ M	18	102,74	0,99	101,11	104,33
Total	90	94,54	5,95	86,06	104,33

Fuente: Elaboración propia

**Tabla N° 41** ANOVA de los grupos experimentales 48 horas de incubación

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Cuadrado medio	F-Ratio	Valor-p
Entre grupos	3091,95	4	772,99	1111,41	0,0001
Dentro de Grupos	59,12	85	0,69		
Total (Corr.)	3151,07	89			

Fuente: Elaboración propia

Se realizó el análisis estadístico que se observa en la **Tabla N° 40**, el análisis de varianza ANOVA de la **Tabla N° 41** con post hoc Test de Tukey, donde se evidenció una disminución significativa de la viabilidad celular ( $p < 0.05$ ) comparado con el grupo control tras el grupo de combinaciones.

Se observa que existe diferencia significativa casi en todas las combinaciones exceptuando la concentración de 90  $\mu\text{M}$  de la Macamida 71 con 10  $\mu\text{M}$  del Celecoxib donde no se da la diferencia significativa tras 48 horas de incubación puesto a que se da un aparente antagonismo y resistencia a la vez.; no obstante, estas células aparentemente presentan mayor efectividad en concentraciones de 3  $\mu\text{M}$  de la Macamida 71 con 10  $\mu\text{M}$  del Celecoxib, y 10  $\mu\text{M}$  de la Macamida 71 con 10  $\mu\text{M}$  del Celecoxib, tal como se dio en las primeras 24 horas. Sin embargo, se evidencia que los porcentajes de células viables MDA-MB-231 por cada combinación pierden cierta efectividad sobre la línea celular mencionada, pero aún se mantiene constante dicha diferencia significativa.

Es decir, ya que no se conoce el mecanismo de acción de la Macamida 71, se da la posibilidad que el Celecoxib antagonice algunas de las vías antitumorales de la Macamida 71, provocando un porcentaje de efectividad menor a lo esperado. Dicha acción similar hace referencia Bijman et al, cuya investigación consistió en la combinación del Celecoxib con el Cisplatino, donde el Celecoxib indujo la fosforilación de una proteína involucrada en la efectividad del Cisplatino, antagonizando las vías de apoptosis que usaba el Cisplatino ante diversas líneas celulares cancerosas.<sup>87</sup>

Por otro lado, Cussimano *et al.*, informa en su estudio la interacción entre el Celecoxib y una droga de experimentación PI MG132 en dos líneas celulares HepG2 y HA22T / VGH. Cuyos datos mostraron que cada inhibidor redujo la proliferación y la apoptosis inducida de forma dosis-dependiente en ambas líneas celulares. Además, la combinación del Celecoxib con MG132 inhibió sinérgicamente la viabilidad celular y aumentó la apoptosis, tanto solos como en combinación, en otras palabras, ambos fármacos tienen similar mecanismo de acción ya que ambos indujeron a un estrés del retículo endoplasmático (ER) donde se da la expresión de diversos genes comprometidos en el desarrollo tumoral.<sup>88</sup>



## CONCLUSIONES

1. El presente estudio concluye que la Macamida 71 tiene el mayor efecto inhibitorio sobre la enzima FAAH, y al evaluar su actividad en la línea celular MDA- MB-231 produce una disminución significativa de la viabilidad celular al igual que el Celecoxib, sin embargo la combinación de ambos tratamientos no tiene sinergismo.
2. Las tres Macamidas sintéticas (Macamida 71, Macamida 89 y Macamida 94) podrían producir la actividad inhibitoria de la enzima Amida Hidrolasa de Ácidos Grasos (FAAH); sin embargo, la respuesta a la enzima mencionada FAAH, se realizó para seleccionar a la Macamida con mayor efecto inhibitorio, logrando optar por la Macamida N-(Piridin-3-ilmetil) oleamida o declarada como Macamida 71, debido a su mejor efecto inhibitorio durante las primeras 24 horas.
3. La Macamida 71 podría producir la inhibición de la actividad de la enzima FAAH sobre la exposición de las células humanas MDA-MB-231; cabe destacar, la respuesta de las células frente a la Macamida 71 no es constante y uniforme, debido a que existen proteínas que promueven la rápida proliferación celular y la resistencia a múltiples fármacos.
4. Las distintas concentraciones del Celecoxib podrían afectar a la viabilidad de las células MDA-MB-231 del cáncer de mama, mostrando daño significativo en todas las concentraciones y siendo uniformes y constantes.
5. Después de la exposición de las células humanas MDA-MB-231 a la Macamida 71 y el Celecoxib individualmente, se evidenció su efectividad inhibitoria dosis-dependiente.
6. La combinación de las distintas concentraciones de la Macamida 71 con el Celecoxib, se podría afirmar que muestran una efectividad tras las primeras 24 horas; sin embargo, mientras el tiempo va transcurriendo estas mismas van perdiendo su capacidad inhibitoria y muestran un antagonismo aparente frente a las células MDA-MB-231.

## SUGERENCIAS

1. Ampliar las pruebas realizadas en este trabajo de investigación con nuevos tipos de macamidas y con la combinación de ellas para crear un sinergismo citotóxico en diversas líneas celulares.
2. Extender dicha investigación sobre la Macamida 71 logrando así conocer los distintos mecanismos de acción en líneas celulares de los tipos de cáncer predominantes en nuestro país, para optimizar su efectividad anticancerígena.
3. Evaluar el efecto anticancerígeno de la investigación expuesta en animales de experimentación.



## BIBLIOGRAFÍA

1. OPS. Día Mundial contra el cáncer 2017 [Internet]. Organización Panamericana de la Salud. 2017 [cited 2017 Oct 2]. Available from: <http://www.paho.org>
2. LLC. Cáncer de Mama [Internet]. Liga Contra el Cáncer. 2017 [cited 2017 Oct 2]. Available from: <http://www.ligacancer.org.pe>
3. Van't Veer L, Dai H, van de Vijver M, He Y, Hart A, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002;415(6871):530–6.
4. Harris RE, Alshafie GA, Abou-Issa H, Seibert K. Chemoprevention of breast cancer in rats by celecoxib, a cyclooxygenase 2 inhibitor. *Cancer Res*. 2000;60(8):2101–3.
5. Basu GD, Pathangey LB, Tinder TL, Gendler SJ, Mukherjee P. Mechanisms underlying the growth inhibitory effects of the cyclo-oxygenase-2 inhibitor celecoxib in human breast cancer cells. *Breast cancer Res*. 2005;7(4):422–35.
6. Massi P, Valenti M, Vaccani A, Gasperi V, Perletti G, Marras E, et al. 5-Lipoxygenase and anandamide hydrolase (FAAH) mediate the antitumor activity of cannabidiol, a non-psychoactive cannabinoid. *J Neurochem*. 2008;104(4):1091–100.
7. Mahassni SH, Al-Reemi RM. Apoptosis and necrosis of human breast cancer cells by an aqueous extract of garden cress (*Lepidium sativum*) seeds. *Saudi J Biol Sci*. 2013;20(2):131–9.
8. Miki Y, Swensen J, Shattuck-eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, et al. Strong Candidate for the Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Gene BRCA1. *Science* (80- ). 1994;266:66–71.
9. INSP. Cáncer de mama. Instituto Nacional de Salud Pública. Mexico D.F.; 2007. p. 1–6.
10. Fernández JG, Ovares CEU. La Glándula Mamaria, Embriología, histología, Anatomía y una de sus principales patologías, el Cáncer de mama. *Rev Medica Costa Rica y Cent Am LXIX*. 2012;602:317–20.
11. FUCA. Cáncer de mama. Fundación cancer. 2016;1–2.
12. American Cancer Society. Cáncer de seno [Internet]. American Cancer Society. 2017. Available from: <https://www.cancer.org/es.html>
13. Packard L. Anatomía del Seno [Internet]. Children's Hospital Stanford. 2017. Available from: <http://www.stanfordchildrens.org>
14. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2012;136(5):359–86.
15. Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. Registro de Cáncer de Lima Metropolitana. 2013. p. 1–217.
16. Khatib OMN, Modjtabai A. Guidelines for the Early Detection and Screening of Breast Cancer. World Health Organization. Cairo, Egypt; 2006. p. 1–57.
17. Hortobagyi GN. Treatment of Breast Cancer. *N Engl J Med*. 1998;339(14):974–84.
18. Ministerio de Salud. Cáncer de mama [Internet]. Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN). 2009. Available from: <http://portal.inen.sld.pe/>

19. Ford D, Easton DF, Stratton M, Narod S, Goldgar D, Devilee P, et al. Genetic Heterogeneity and Penetrance Analysis of the BRCA1 and BRCA2 Genes in Breast Cancer Families. *Am J Hum Genet.* 1998;62(3):676–89.
20. Aarnio M, Sankila R, Pukkala E, Salovaara R, Aaltonen LA, de la Chapelle A, et al. Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *Int J cancer.* 1999;81(2):214–8.
21. Leeneer K De, Coene I, Crombez B, Simkens J, Broecke R Van Den, Bols A, et al. Prevalence of BRCA1/2 mutations in sporadic breast/ovarian cancer patients and identification of a novel de novo BRCA1 mutation in a patient diagnosed with late onset breast and ovarian cancer: implications for genetic testing. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;132(1):87–95.
22. Croce CM. Oncogenes and Cancer. *N Engl J Med.* 2008;358(5):502–11.
23. Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, Bartram CF, Grosveld G. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell.* 1984;36(1):93–9.
24. Gayther SA, Harrington P, Russell P, Kharkevich G, Garkavtseva RF, Ponder BAJ, et al. Rapid Detection of Regionally Clustered Germ-Line BRCA1 Mutations by Multiplex Heteroduplex Analysis. *Am J Hum Genet.* 1996;58(3):451–6.
25. Narod SA, Ford D, Devilee P, Barkardottir RB, Lynch HT, Smith SA, et al. An Evaluation of Genetic Heterogeneity in 145 Breast-Ovarian Cancer Families. *Am J Hum Genet.* 1995;56(1):254–64.
26. Claus EB, Risch N, Thompson WD. Autosomal Dominant Inheritance of Early-Onset Breast Cancer. *Obstet Gynecol Surv.* 1994 Jun;49(6):401–2.
27. Falkenberg SS, Legare RD. Risk factors for breast cancer. *Risk factors breast cancer Obstet Gynecol Clin.* 2002;29(1):159–72.
28. Meister K, Morgan J. Risk Factors for Breast Cancer. *Am Counc Sci Heal.* 2000;1–25.
29. Horvath E, Cifras P, Traipe E, Uchida M, Salazar A. Ultrasonido en Cáncer Mamario. *Jornada Chilena de Consenso en Cáncer de mama.* 2015. p. 21–34.
30. Andersson I, Aspegren K, Janzon L, Landberg T, Lindholm K, Linell F, et al. Mammographic screening and mortality from breast cancer: the Malmö mammographic screening trial. *BMJ.* 1988;297(6654):943–8.
31. NIH. Mamografía. *Inst Nac Bioingeniería e Imágenes Biomédicas.* 2013;1–3.
32. Maza García M, Padilla Herrera A. Nivel de conocimiento de la prevención del cáncer de mama en los estudiantes de primer año de la Escuela de Enfermería de la Universidad de Guayaquil 2014. *Universidad de Guayaquil;* 2014.
33. Charpin C, Andrac L, Habib M, Vacheret H, Xerri L, Devictor B, et al. Immunodetection in Fine-Needle Aspirates and Multiparametric (SAMBA) Image Analysis. *Cancer.* 1989;63(5):863–72.
34. La Rosa G, Belfiore A, Giuffrida D, Sicurella C, Ippolito O, Russo G, et al. Evaluation of the fine needle aspiration biopsy in the preoperative selection of cold thyroid. *Cancer.* 1991;67(8):2–6.
35. Junta Editorial del Cáncer. Cáncer de mama: Estadios [Internet]. *Cáncer.NET.* 2017. Available from: <http://www.cancer.net/es/>
36. Rebbeck TR, Friebel T, Lynch HT, Neuhausen SL, Van't Veer L, Garber JE, et al. Bilateral prophylactic mastectomy reduces breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: The PROSE study group. *J Clin Oncol.*

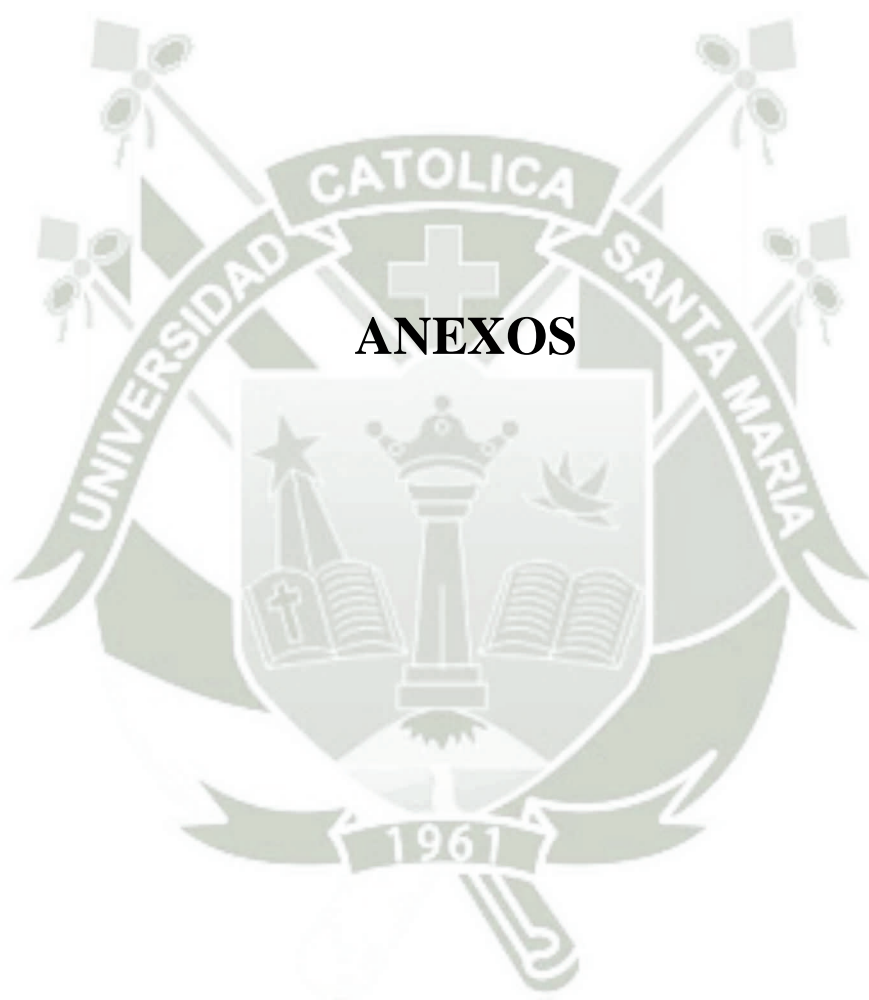
- 2004;22(6):1055–62.
37. Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, et al. Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin.* 2005;55(1):10–30.
  38. Fisher B, Anderson S, Redmond CK, Wolmark N, Wickerham DL, Cronin WM, et al. Trial Comparing Total Mastectomy With Lumpectomy With or Without Irradiation in the Treatment of Breast Cancer. *N Engl J Med.* 1995;333:1456–61.
  39. Overgaard M, Ansen P, Overgaard J, Rose C, Andersson M, Bach F. Postoperative radiotherapy in high-risk premenopausal women with breast cancer who receive adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med.* 1997;337(14):949–55.
  40. Darby S, McGale P, Peto R, Granath F, Hall P, Ekbom A. Mortality from cardiovascular disease more than 10 years after radiotherapy for breast cancer: nationwide cohort study of 90 000 Swedish women. *BMJ.* 2003;326(7383):256–7.
  41. Rutqvist LE, Pettersson D, Johansson H. Adjuvant radiation therapy versus surgery alone in operable breast cancer: long-term follow-up of a randomized clinical trial. *Radiother Oncol.* 1993;26(2):104–10.
  42. Nissen-Meyer R, Kjellgren K, Mansson B. Adjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. In: *Adjuvant Therapies of Cancer.* Springer; 1982. p. 142–9.
  43. Charfare H, Limongelli S, Purushotham AD. Neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Br J Surg.* 2005;92(1):14–23.
  44. Ariza Y, Briceño I, Ancízar F. Tratamiento de cáncer de seno y farmacogenética. *Rev Colomb Biotecnol.* 2016;18(1):121–34.
  45. Locker G. Hormonal Therapy of breast cancer. *Cancer Treat Rev.* 1998;24(3):221–40.
  46. McGuire W. Endocrine therapy of breast cancer. *Annu Rev Med.* 1975;26(1):353–63.
  47. Love R, Mazess R, Barden H, Epstein S, Newcomb P, Jordan V, et al. Effects of Tamoxifen on bone mineral density in postmenopausal women with breast cancer. *N Engl J Med.* 1992;326(13):852–6.
  48. Mauriac L, Pippin J, Albano J, Gertler S, Osborne C. Fulvestrant (Faslodex™) versus anastrozole for the second-line treatment of advanced breast cancer in subgroups of postmenopausal women with visceral and non-visceral metastases: combined results from two multicentre trials. *Eur J Cancer.* 2003;39(9):1228–33.
  49. Domínguez M, Marcos M, Meiriño R, Villafranca E, Dueñas M, Arias F, et al. Factores pronósticos y predictivos en el cáncer de mama temprano. *An Sist Sanit Navar.* 2001;24:99–110.
  50. Molina M, Codony-Servat J, Albanell J, Rojo F, Arribas J, Baselga J. Trastuzumab (Herceptin), a humanized anti-HER2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated HER2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. *Cancer Res.* 2001;61(12):4744–9.
  51. Baselga J, Cortés J, Kim S, Im S, Hegg R, Im Y, et al. Pertuzumab plus Trastuzumab plus Docetaxel for Metastatic Breast Cancer. *New Engl J.* 2012;366(2):327–34.
  52. Fragoso L, Baltasar E, Esparza J. El ciclo celular: características, regulación e importancia en el cáncer. *Biotecnol Apl.* 2014;21(2):60–69.

53. Fine PG, Rosenfeld MJ. The Endocannabinoid System, Cannabinoids, and Pain. *Rambam Maimonides Med J.* 2013;4(4):1–15.
54. Grotenhermen F, Müller-Vahl K. The Therapeutic Potential of Cannabis and Cannabinoids. *Dtsch Arztebl Int.* 2012;109(29–30):495–501.
55. Parolaro D, Massi P, Rubino T, Monti E. Endocannabinoids in the immune system and cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2002;66(2–3):319–32.
56. Morales-Hernández P, Bermúdez-Ocaña D, Tovilla-Zarata C. Celecoxib: más allá de su actividad antiinflamatoria, antipirética y analgésica. *Salud en Tabasco.* 2016;22(1):46–50.
57. Yamakawa N, Suzuki K, Yamashita Y, Katsu T, Hanaya K, Shoji M, et al. Structure-activity relationship of celecoxib and rofecoxib for the membrane permeabilizing activity. *Bioorganic Med Chem.* 2014;22(8):2529–34.
58. Ristimaki A, Sivula A, Lundin J, Lundin M, Salminen T, Haglund C, et al. Advances in Brief Prognostic Significance of Elevated Cyclooxygenase-2 Expression in Breast Cancer 1. *Cancer Res.* 2002;62(17):632–5.
59. Kozak K, Marnett L. Oxidative metabolism of endocannabinoids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2002;66(2):211–20.
60. Jhaveri M, Richardson D, Chapman V. Endocannabinoid metabolism and uptake: novel targets for neuropathic and inflammatory pain. Vol. 152, *British Journal of Pharmacology.* 2009. p. 624–32.
61. Lim TK. *Lepidium meyenii*. In: *Edible Medicinal and Non Medicinal Plants.* Dordrecht: Springer; 2015. p. 801–28.
62. Lee MS, Shin BC, Yang EJ, Lim HJ, Ernst E. Maca (*Lepidium meyenii*) for treatment of menopausal symptoms: A systematic review. *Maturitas.* 2011;70(3):227–33.
63. Gonzales GF. Ethnobiology and Ethnopharmacology of *Lepidium meyenii* (Maca), a Plant from the Peruvian Highlands. *Evidence-Based Complement Altern Med.* 2012;2012:1–10.
64. Gonzales GF, Gonzales C, Gonzales-Castañeda C. *Lepidium meyenii* (Maca): a plant from the highlands of Peru--from tradition to science. *Complement Med Res.* 2009;16(6):373–80.
65. Toledo J, Dehal P, Jarrin F, Hu J, Hermann M, Al-Shehbaz I, et al. Genetic variability of *Lepidium meyenii* and other Andean *Lepidium* species (Brassicaceae) assessed by molecular markers. *Ann Bot.* 1998;82(4):523–30.
66. Li G, Ammermann U, Quirós C. Glucosinolate contents in maca (*Lepidium peruvianum* Chacón) seeds, sprouts, mature plants and several derived commercial products. *Econ Bot.* 2001;55(2):255–62.
67. Muhammad I, Zhao J, Dunbar D, Khan I. Constituents of *Lepidium meyenii* “maca.” *Phytochemistry.* 2002 Feb;59(1):105–10.
68. Boonen J, Bronselaer A, Nielandt J, Veryser L, De Tré G, De Spiegeleer B. Alkamid database: Chemistry, occurrence and functionality of plant N-alkylamides. *J Ethnopharmacol.* 2012;142(3):563–90.
69. Dording CM, Schettler PJ, Dalton ED, Parkin SR, Walker RSW, Fehling KB, et al. A Double-Blind Placebo-Controlled Trial of Maca Root as Treatment for Antidepressant-Induced Sexual Dysfunction in Women. *Evidence-Based Complement Altern Med.* 2015;2015:1–9.
70. Sigma Aldrich. *Fundamental Techniques in Cell Culture.* Vol. 12, Health

- Protection Agency. 2015. 1-67 p.
71. Li Y, Upadhyay S, Bhuiyan M, Sarkar FH. Induction of apoptosis in breast cancer cells MDA-MB-231 by genistein. *Oncogene*. 1999;18(20):3166–72.
  72. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, et al. Cell Viability Assays. In: *Assay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2013. p. 785–96.
  73. C.J. G, S.J. H, S. D, N.J. M. Microculture tetrazolium assays: a comparison between two new tetrazolium salts, XTT and MTS. *J Immunol Methods*. 1995;179(1):95–103.
  74. Cayman Chemical. Fatty Acid Amide Hydrolase Inhibitor Screening Assay Kit. USA; 2017. p. 1–15.
  75. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current protocols in immunology* / edited by John E. Coligan. 2015. p. 1–3.
  76. Kang J, Lee Y, Yu B, Yang B-S, Cho K-H, Yoon D, et al. Adiponectin induces growth arrest and apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cell. *Arch Pharm Res*. 2005;28(11):1263–9.
  77. Dewey CM, Cenik B, Sephton CF, Dries DR, Mayer P, Good SK, et al. TDP-43 Is Directed to Stress Granules by Sorbitol, a Novel Physiological Osmotic and Oxidative Stressor. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2011;31(5):1098–108. Available from: <http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.01279-10>
  78. Almukadi H, Wu H, Böhlke M, Kelley CJ, Maher TJ, Pino-Figueroa A. The macamide N-3-methoxybenzyl-linoleamide is a time-dependent fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitor. *Mol Neurobiol*. 2013;48(2):333–9.
  79. Hwang J, Adamson C, Butler D, Janero DR, Makriyannis A, Bahr BA. Enhancement of endocannabinoid signaling by fatty acid amide hydrolase inhibition: A neuroprotective therapeutic modality. *Life Sci*. 2010;86(15):615–23.
  80. Pino-Figueroa A, Vu H, Kelley CJ, Maher TJ. Mechanism of action of *Lepidium meyenii* (Maca): An explanation for its neuroprotective activity. *Am J Neuroprot Neuroregen*. 2011;3(1):87–92.
  81. Vu H. Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH) Inhibitors: Discovery in *Lepidium meyenii* (Maca) Extracts. *Proc Natl Conf Undergrad Res*. 2012;29–31.
  82. Steinbach G, Lynch PM, Phillips RKS, Wallace MH, Hawk E, Gordon GB, et al. The Effect of Celecoxib, a Cyclooxygenase-2 Inhibitor, in Familial Adenomatous Polyposis. *N Engl J Med*. 2000;342(26):1946–52.
  83. Half E, Tang XM, Gwyn K, Sahin A, Wathen K, Sinicrope F a. Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancers and adjacent ductal carcinoma in situ. *Cancer Res*. 2002;62(6):1676–81.
  84. Rezaei M, Vardanjani H, Pashmforoosh M, Alipour D, Nesari A, Mansourzade Z, et al. Involvement of spinal CB1 cannabinoid receptors on the antinociceptive effect of celecoxib in rat formalin test. *Jundishapur J Nat Pharm Prod*. 2016;11(3):1–6.
  85. Chen C, Shen HL, Yang J, Chen QY, Xu WL. Preventing chemoresistance of human breast cancer cell line, MCF-7 with celecoxib. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2011;137(1):9–17.
  86. Bocca C, Bozzo F, Bassignana A, Miglietta A. Antiproliferative effects of COX-2 inhibitor celecoxib on human breast cancer cell lines. *Mol Cell Biochem*. 2011;350(2):59–70.

87. Bijman MN a, Hermelink C a, van Berkel MP a, Laan AC, Janmaat ML, Peters GJ, et al. Interaction between celecoxib and docetaxel or cisplatin in human cell lines of ovarian cancer and colon cancer is independent of COX-2 expression levels. *Biochem Pharmacol.* 2008;75(2):427–37.
88. Cusimano A, Azzolina A, Iovanna JL, Bachvarov D, McCubrey JA, D’Alessandro N, et al. Novel combination of celecoxib and proteasome inhibitor MG132 provides synergistic antiproliferative and proapoptotic effects in human liver tumor cells. *Cell Cycle.* 2010;9(7):1399–410.





**Anexo 1**

**TEST DE TUKEY PARA CADA UNA DE LAS MACAMIDAS EN TODAS  
SUS CONCENTRACIONES SOBRE EL ENSAYO FAAH**

**Test de Tukey de la Macamida 71 tras 24 horas de incubación**

Nivel	Cantidad	Media	Grupos homogéneos
Control	4	0.00	X
3 $\mu$ M	4	20.79	X
10 $\mu$ M	4	50.21	X
30 $\mu$ M	4	70.25	X

Fuente: Elaboración Propia

**Test de Tukey de la Macamida 89 tras 24 horas de incubación**

Nivel	Cantidad	Media	Grupos homogéneos
Control	4	0.00	X
3 $\mu$ M	4	6.55	X
10 $\mu$ M	4	11.09	X
30 $\mu$ M	4	13.19	X

Fuente: Elaboración Propia

**Test de Tukey de la Macamida 94 tras 24 horas de incubación**

Nivel	Cantidad	Media	Grupos homogéneos
Control	4	0.00	X
3 $\mu$ M	4	26.29	X
10 $\mu$ M	4	38.92	X
30 $\mu$ M	4	48.40	X

Fuente: Elaboración Propia

Anexo 2

**TEST DE TUYEK EN COMPARACIÓN DE LAS MACAMIDAS A  
DIFERENTES CONCENTRACIONES**

**Test de Tukey de las distintas Macamidas a una concentración de 3  $\mu$ M tras 24 horas**

Nivel	Cantidad	Media	Grupos homogéneos
Control	4	0.00	X
Macamida 71	4	20.79	X
Macamida 89	4	6.55	X
Macamida 94	4	26.29	X

Fuente: Elaboración Propia

**Test de Tukey de las distintas Macamidas a una concentración de 10  $\mu$ M tras 24 horas**

Nivel	Cantidad	Media	Grupos homogéneos
Control	4	0.00	X
Macamida 71	4	50.21	X
Macamida 89	4	11.09	X
Macamida 94	4	38.92	X

Fuente: Elaboración Propia

**Test de Tukey de las distintas Macamidas a una concentración de 30  $\mu$ M tras 24 horas**

<i>Nivel</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Control	4	0.00	X
Macamida 71	4	70.25	X
Macamida 89	4	13.19	X
Macamida 94	4	48.40	X

Fuente: Elaboración Propia

### Anexo 3

#### TEST DE TUKEY EN EL TRATAMIENTO CON MACAMIDA 71

**Test de Tukey de las distintas concentraciones de la Macamida 71 tras 24 horas de incubación**

Nivel	Cantidad	Media	Grupos homogéneos
30 $\mu$ M	18	77.97	X
10 $\mu$ M	18	94.78	X
3 $\mu$ M	18	90.26	X
1 $\mu$ M	18	85.88	X
Control	18	100.00	X

Fuente: Elaboración Propia

**Test de Tukey de las distintas concentraciones de la Macamida 71 tras 48 horas de incubación**

Nivel	Cantidad	Media	Grupos homogéneos
30 $\mu$ M	18	66.99	X
10 $\mu$ M	18	88.16	X
3 $\mu$ M	18	86.42	X
1 $\mu$ M	18	81.49	X
Control	18	100.01	X

Fuente: Elaboración Propia

**Test de Tukey de las distintas concentraciones de la Macamida 71 tras 72 horas de incubación**

Nivel	Cantidad	Media	Grupos homogéneos
30 $\mu$ M	18	53.05	X
10 $\mu$ M	18	73.73	X
3 $\mu$ M	18	72.57	X
1 $\mu$ M	18	71.00	X
Control	18	100.00	X

Fuente: Elaboración Propia

#### Anexo 4

#### TEST DE TUKEY EN EL TRATAMIENTO DE CELECOXIB

##### Test de Tukey de las distintas concentraciones del Celecoxib tras 24 horas de incubación

Nivel	Cantidad	Media	Grupos homogéneos
100 $\mu$ M	18	65.22	X
30 $\mu$ M	18	76.02	X
10 $\mu$ M	18	91.33	X
3 $\mu$ M	18	96.27	X
Control	18	100.00	X

Fuente: Elaboración Propia

##### Test de Tukey de las distintas concentraciones del Celecoxib tras 48 horas de incubación

Nivel	Cantidad	Media	Grupos homogéneos
100 $\mu$ M	18	46.47	X
30 $\mu$ M	18	75.50	X
10 $\mu$ M	18	79.64	X
3 $\mu$ M	18	92.19	X
Control	18	100.00	X

Fuente: Elaboración Propia

##### Test de Tukey de las distintas concentraciones del Celecoxib tras 72 horas de incubación

Nivel	Cantidad	Media	Grupos homogéneos
100 $\mu$ M	18	39.20	X
30 $\mu$ M	18	62.04	X
10 $\mu$ M	18	71.20	X
3 $\mu$ M	18	73.50	X
Control	18	100.02	X

Fuente: Elaboración Propia

Anexo 5

**TEST DE TUKEY EN LA COMBINACIÓN DE MACAMIDA 71 Y  
CELECOXIB**

**Test de Tukey de la combinación de la Macamida 71 con el celecoxib tras 24 horas de incubación**

Nivel	Cantidad	Media	Grupos homogéneos
3 $\mu\text{M}$ +10 $\mu\text{M}$	18	78.69	X
10 $\mu\text{M}$ +10 $\mu\text{M}$	18	81.90	X
30 $\mu\text{M}$ +10 $\mu\text{M}$	18	84.76	X
90 $\mu\text{M}$ +10 $\mu\text{M}$	18	87.57	X
Control	18	100.00	X

Fuente: Elaboración Propia

**Test de Tukey de la combinación de la Macamida 71 con el celecoxib tras 48 horas de incubación**

Nivel	Cantidad	Media	Grupos homogéneos
3 $\mu\text{M}$ +10 $\mu\text{M}$	18	87.58	X
10 $\mu\text{M}$ +10 $\mu\text{M}$	18	89.79	X
30 $\mu\text{M}$ +10 $\mu\text{M}$	18	92.58	X
90 $\mu\text{M}$ +10 $\mu\text{M}$	18	102.74	X
Control	18	100.00	X

Fuente: Elaboración Propia