

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**

**LA MOLINA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**



**«ANÁLISIS MOLECULAR DE LA FRACCIÓN <10 kDa DE LA  
APITOXINA DE *Apis mellifera* Y SU EFECTO SOBRE LA  
APOPTOSIS CELULAR»**

Presentada por:

**GIANINA LEONOR CUYA LOZADA**

Tesis para Optar el Título Profesional de:

**BIÓLOGA**

Lima - Perú

2019

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**“ANÁLISIS MOLECULAR DE LA FRACCIÓN <10 kDa DE LA  
APITOXINA DE *Apis mellifera* Y SU EFECTO SOBRE LA  
APOPTOSIS CELULAR”**

Presentada por:

**GIANINA LEONOR CUYA LOZADA**

Tesis para Optar el Título Profesional de:

**BIÓLOGA**

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

---

Ph.D. Ana Kitazono Sugahara  
**PRESIDENTE**

---

Dr. Víctor Meza Contreras  
**MIEMBRO**

---

Mg. Sc. Elva Ríos Ríos  
**MIEMBRO**

---

Mg. Sc. Patricia Moreno Díaz  
**ASESORA**

---

Ph.D. Michael Talledo Albújar  
**CO-ASESOR**

## **DEDICATORIA**

A mis padres, por su apoyo, sus enseñanzas, su paciencia y amor.

A mi amado sobrino Raelito, por su gran enseñanza de vida, porque  
sé que me cuida desde donde está.

A Joao, por todo su apoyo, su paciencia, sus enseñanzas e inmenso amor.

A mi hermana Elizabeth, por su amistad y cariño.

La presente tesis ha sido financiada por el Programa Nacional de Innovación Agraria (PNIA) y forma parte del proyecto de investigación «Evaluación de los efectos antiinflamatorios y antivirales del veneno de *Apis mellifera* en linfocitos infectados por el virus linfotrópico de células T humanas tipo I» financiado por el PNIA (Convenio 024-2015-INIA-PNIA/UPMSI/IE), ejecutado por el Instituto de Medicina Tropical «Alexander von Humboldt» de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y la Empresa Alimentos Naturales del Perú SAC.

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	i
ABSTRACT .....	ii
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Apitoxina .....	4
2.2. Marcadores de superficie de leucocitos .....	6
2.3. Apoptosis .....	6
2.3.1. Rol de la familia Bcl-2 en la apoptosis .....	7
2.3.2. Caspasas .....	13
2.3.3. Caspasas 3 y 7 .....	13
2.3.4. Rutas apoptóticas .....	14
2.4. HTLV-1 y la apoptosis .....	17
2.5. Efecto antiproliferativo de la apitoxina .....	18
2.6. Citometría de flujo .....	20
2.7. Cromatografía líquida UHPLC (Ultra high performance liquid chromatography).....	21
2.8. Líneas celulares .....	22
2.8.1. Línea celular K562.....	22
2.8.2. Línea celular MT-2 .....	22
III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	23
3.1. Materiales y reactivos .....	23
3.2. Líneas celulares - mantenimiento .....	24
3.3. Fracción <10 kDa de la apitoxina.....	26
3.4. Efecto de la fracción <10 kDa sobre el total de células K562 y MT-2 .....	26
3.5. Evaluación de la activación de caspasas.....	28
3.6. Caracterización de los componentes de la fracción <10 kDa de la apitoxina por UHPLC .....	29
3.7. Análisis estadístico .....	30
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	31
4.1. Curva de crecimiento de la línea celular K562.....	31
4.2. Efecto de la fracción <10 kDa en las líneas celulares .....	32

4.2.1.K562.....	32
4.2.2.MT-2 .....	35
4.3. Evaluación de la activación de caspasas en las líneas celulares .....	38
4.3.1.K562.....	38
4.3.2.MT-2 .....	42
4.4. Caracterización de los componentes de la apitoxina .....	45
V. CONCLUSIONES .....	48
VI. RECOMENDACIONES .....	49
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
VIII. ANEXOS .....	58

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 .....	8
Tabla 2. Proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2, subfamilia Bax .....	10
Tabla 3. Proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2, subfamilia BH3 .....	11
Tabla 4. Proteínas que participan en la apoptosis.....	12
Tabla 5. Curva de crecimiento de la línea celular K562 .....	31
Tabla 6. Resumen de la prueba Tukey para los datos de la K562.....	33
Tabla 7. Resumen de la prueba Tukey para los datos de la MT-2 .....	36
Tabla 8. Resultado de la cuantificación de las muestras por UHPLC .....	45
Tabla 9. Concentración de melitina en cada tratamiento evaluado .....	47

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del aguijón o ponzoña de la abeja.....	5
Figura 2. Proteínas de la familia Bcl-2.....	9
Figura 3. Representaciones esquemáticas de las rutas apoptóticas .....	16
Figura 4. Flujograma de trabajo .....	25
Figura 5. Cultivo celular K562 y MT-2 en placa de 96 pozos .....	27
Figura 6. Esquema de las evaluaciones finales en placa de 96 pozos .....	27
Figura 7. Observación al microscopio óptico de las células K562.....	28
Figura 8. Curva de crecimiento de la línea celular K562 .....	31
Figura 9. Observación al microscopio invertido de la línea celular K562 .....	32
Figura 10. Disminución del conteo total de células K562 cultivadas por 24h, 48h y 72h con 0 (control), 0.25, 1, 5 y 10 µg/mL de la fracción <10 kDa de la apitoxina.....	32
Figura 11. Incremento de muerte de las células K562 cultivadas por 24h, 48h y 72h con 0 (control), 0.25, 1, 5 y 10 µg/mL de la fracción <10 kDa de la apitoxina.....	33
Figura 12. Viabilidad de las células K562 cultivadas por 24h, 48h y 72h con 0 (control), 0.25, 1, 5 y 10 µg/mL de la fracción <10 kDa de la apitoxina .....	34
Figura 13. Observación al microscopio invertido de la línea celular MT-2 formando racimos a 80X .....	35
Figura 14. Disminución del total de células MT-2 cultivadas por 24h, 48h y 72h con 0 (control), 1, 5, 10, 15 y 20 µg/mL de la fracción <10 kDa. ....	35
Figura 15. Incremento de la muerte de células MT-2 expuestas a la fracción <10 kDa a las 24h, 48h y 72h. ....	36
Figura 16. Viabilidad en porcentaje de las células MT-2 expuestas a 1, 5, 10, 15 y 20 µg/mL de la fracción <10 kDa a las 24h, 48h y 72h .....	37
Figura 17. Observación al microscopio de fluorescencia de las células K562 vivas y apoptóticas. ....	39
Figura 18. Detección por citometría de flujo de las células K562 apoptóticas .....	40
Figura 19. Porcentaje de células K562 apoptóticas identificadas mediante citometría de flujo usando el fluoróforo caspase-3/7. ....	41

Figura 20. Detección por citometría de flujo de las células K562 muertas/no viables.....	41
Figura 21. Porcentaje de células K562 muertas/no viables identificadas mediante citometría de flujo usando el fluoróforo SYTOX.....	42
Figura 22. Detección por citometría de flujo de las células MT-2 apoptóticas.....	43
Figura 23. Porcentaje de células MT-2 apoptóticas. ....	43
Figura 24. Detección por citometría de flujo de las células MT-2 muertas. ....	44
Figura 25. Porcentaje de células MT-2 muertas marcadas con el fluoróforo SYTOX.....	44
Figura 26. Cromatograma UHPLC de la apitoxina completa de <i>Apis mellifera</i> . ....	46
Figura 27. Cromatograma UHPLC de la fracción <10 kDa de la apitoxina de <i>Apis mellifera</i> . ....	46

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Descripción y aclimatación de una línea celular.....	59
ANEXO 2: Procedimiento de obtención de la fracción <10 kDa de la apitoxina.....	60
ANEXO 3: Datos promedio del conteo de células K562 tratadas con la fracción <10 kDa .....	61
ANEXO 4: Coeficiente de variación y desviación estándar (K562).....	62
ANEXO 5: Datos promedio del conteo de células MT-2 tratadas con la fracción <10 kDa .....	63
ANEXO 6: Coeficiente de variación y desviación estándar (MT-2).....	64
ANEXO 7: Evaluación estadística de los datos de la línea celular K562 .....	65
ANEXO 8: Comparación múltiple de medias (K562) .....	72
ANEXO 9: Evaluación estadística de los datos de la línea celular MT-2.....	75
ANEXO 10: Comparación múltiple de medias (MT-2) .....	79
ANEXO 11: Datos estadísticos de la citometría de las células K562 .....	82
ANEXO 12: Datos estadísticos de la citometría de las células MT-2.....	87
ANEXO 13: Curva estándar de melitina y fosfolipasa .....	92
ANEXO 14: Cálculo de la regresión lineal Probit para los datos de K562.....	94
ANEXO 15: Cálculo de la regresión lineal Probit para los datos de MT-2 .....	96

## RESUMEN

La apitoxina tiene diversas propiedades medicinales, antimicrobianas, antiinflamatorias, antivirales, antiproliferativas y anticancerígenas. Sin embargo, no se tienen estudios del efecto que tiene la apitoxina o de sus fracciones de menor peso molecular sobre las células humanas infectadas con el virus linfotrópico de células T humanas (HTLV-1). En esta tesis se evaluó el efecto que tienen los componentes de la fracción <10 kDa de la apitoxina de *Apis mellifera* sobre la apoptosis de dos líneas celulares, la K562 que no está infectada con HTLV-1 y la MT-2 que sí lo está. Se cultivaron dichas líneas celulares con diferentes concentraciones de la fracción <10 kDa (K562 con 0.25, 1, 5 y 10 µg/mL; MT-2 con 1, 5, 10, 15 y 20 µg/mL). Se ha observado que para lograr una disminución significativa ( $\alpha=0.05$ ) del total de células vivas de ambas líneas celulares se requiere como mínimo de una concentración 5 µg/mL, respectivamente. La CI50 indicó que la fracción <10 kDa es más citotóxica para las células K562 (CI50=9.1 µg/mL) que para las células MT-2 (CI50=33.7 µg/mL). También, se determinó la activación de la muerte celular apoptótica detectando la activación de las caspasas ejecutoras 3/7 en los diferentes tratamientos con la fracción <10 kDa (K562: 1 y 5 µg/mL; MT-2: 1, 5, 10 µg/mL) por citometría de flujo, observándose que hay un incremento de la apoptosis con diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0.05$ ) en los tratamientos con concentraciones de 5 µg/mL para K562; y de 1, 5 y 10 µg/mL para MT-2. Asimismo, se evaluó la muerte celular por citometría, encontrándose un incremento de las células muertas con diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) en las células tratadas con las concentraciones de 5 µg/mL para K562 y de 10 µg/mL para MT-2. Finalmente, se caracterizó por cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC, por sus siglas en inglés) esta fracción <10 kDa, determinando que tiene 17.4 µg/mL de melitina y no se detectó la presencia de fosfolipasa A2.

### **Palabras clave:**

Veneno de abeja, apitoxina, apoptosis celular, melitina, HTLV-1

## ABSTRACT

Bee venom has different medicinal, antimicrobial, anti-inflammatory, antiviral, antiproliferative and anticancer properties. However, there are no studies of the effect that bee venom or its protein fractions of less molecular weight have in HTLV-1 infected cells. In the present thesis, it has been assessed in-vitro effect of <10 kDa fraction components of *Apis mellifera* bee venom in the apoptosis of two cell lines, K562 which is non-infected with the virus and MT-2 which is infected with HTLV-1. These cell lines were cultured with different concentrations of the <10 kDa fraction (K562 with 0.25, 1, 5 y 10  $\mu\text{g/mL}$ ; MT-2 with 1, 5, 10, 15 y 20  $\mu\text{g/mL}$ ). It was observed that it is necessary 5  $\mu\text{g/mL}$  to cause a significant decrease ( $\alpha=0.05$ ) in total alive K562 and MT-2 cell. IC50 indicates that <10 kDa fraction is more cytotoxic for K562 cells (IC50=9.1  $\mu\text{g/mL}$ ) than MT-2 cells (CI50=33.7  $\mu\text{g/mL}$ ). Further, it was determined apoptotic cell death activation measuring 3/7 executioner caspases activation at different concentrations (K562: 1 y 5  $\mu\text{g/mL}$ ; MT-2: 1, 5, 10  $\mu\text{g/mL}$ ) by flow cytometry, observing that there is an increase of apoptosis with statistically significant differences ( $\alpha=0.05$ ) in treatments with concentrations of 5  $\mu\text{g/mL}$  for K562; and 1, 5, 10  $\mu\text{g/mL}$  for MT-2. Likewise, death cell was evaluated by flow cytometry, finding an increase of death cells with significant differences ( $\alpha=0.05$ ) in treatments with concentrations of 5  $\mu\text{g/mL}$  for K562 and 10  $\mu\text{g/mL}$  for MT-2. Finally, this <10 kDa fraction was characterized by UHPLC, determining that it has 17.4  $\mu\text{g/mL}$  of melittin and the presence of phospholipase A2 was not detected.

### Keywords

Bee venom, cellular apoptosis, melittin

## I. INTRODUCCIÓN

El veneno de abeja o apitoxina contiene varios componentes activos: péptidos (melitina, apamina, adolapina, y el péptido de desgranulación de mastocitos; MDC), enzimas (fosfolipasa A2, hialuronidasa y glucosidasa), y aminas biogénicas (histaminas y dopamina). Entre estos, los componentes principales (mayoritarios) de la apitoxina son el péptido melitina (40-50 por ciento del peso seco) y la enzima fosfolipasa (10-12 por ciento del peso seco) (Hider, 1988; Son *et al.*, 2007; Gajski *et al.*, 2013).

El uso de los productos de la abeja en la prevención y tratamiento de enfermedades es conocido como apiterapia (Cherniack *et al.*, 2010; Gajski *et al.*, 2013). La apiterapia es práctica médica alternativa y complementaria a tratamientos de enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide y de enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson (Lee *et al.*, 2005; Son *et al.*, 2007; Hang *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2015).

En investigaciones previas, se ha reportado que la apitoxina tiene efecto antibacteriano *in vitro*, siendo más eficaz contra bacterias gram positivas, como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, que contra las gram negativas como *Escherichia coli* (Atalla *et al.*, 2007). Asimismo, se ha encontrado que la fosfolipasa A2 de la apitoxina tiene actividad tripanocida sobre *Trypanosoma brucei brucei*, así como efecto bacteriostático en bacterias gram negativas como *Escherichia coli* y *Citrobacter freundii* (Boutrín *et al.*, 2008). También se ha encontrado que la melitina tiene efecto antibacteriano sobre las bacterias fitopatógenas como *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola* (González-Rodríguez, 2005).

Estas cualidades de la apitoxina la convierten en un potencial tratamiento contra diversas enfermedades, como lo es el caso de las enfermedades asociadas con el virus linfotrópico de células T humanas (HTLV-1). El HTLV-1 se clasifica dentro de la familia *Retroviridae*, género *Deltavirus* (Coffin, 2015; Hulo *et al.*, 2011), y está catalogado como un oncovirus. Este virus invade principalmente los linfocitos T que expresan la proteína CD4 (CD4+),

puede infectar también a aquellos que expresan la proteína CD8 (CD8+) (Rivera-Caldón *et al.*, 2017).

Actualmente, en el mundo se estima que 5 a 10 millones de personas están infectadas por el virus. Las zonas endémicas del virus son las regiones intertropicales de África (Guinea, Zaire, Gabón), el sur de Japón, la cuenca del Caribe, áreas localizadas de Irán, Melanesia, Australia y países de Sudamérica como Perú, Chile, Brasil y Colombia (Proietti *et al.*, 2005; Gessain y Cassar, 2012; Rivera-Caldón *et al.*, 2017). No todas las personas infectadas con HTLV-1 desarrollan complicaciones: hasta 90 por ciento de los portadores del HTLV-1 permanecen asintomáticos. Sin embargo, el 10 por ciento restante desarrolla enfermedades asociadas al HTLV-1. Algunas de estas enfermedades asociadas pueden ser muy severas, como el linfoma/leucemia de células T del adulto (ATLL por sus siglas en inglés) y la mielopatía asociada a HTLV-1/ paraparesia espástica tropical (PET) (Gotuzzo *et al.*, 2010).

El ATLL es una enfermedad linfoproliferativa fatal que se caracteriza por la proliferación rápida y descontrolada de células T CD25+CD4+ transformadas y maduras, con un pronóstico de vida de aproximadamente 6 meses cuando están en la fase aguda de la enfermedad (Taylor *et al.*, 2008). Por otro lado, PET es una enfermedad inflamatoria y neurodegenerativa que afecta la médula espinal manifestándose principalmente con disfunción en los miembros inferiores (Belrose *et al.*, 2011). Cerca del 1 al 5 por ciento de individuos infectados con HTLV-1 desarrollan ATLL y alrededor del 3 al 5 por ciento desarrollan PET (Rivera-Caldón *et al.*, 2017).

Se han reportado otras enfermedades en individuos infectados con HTLV-1. Entre las que corresponden a síndromes inflamatorios se encuentran: uveítis, tiroiditis, alveolitis, artropatía, polimiositis, síndrome Sjögren; y las que corresponden a complicaciones infecciosas incluyen: estrongiloidiasis, tuberculosis, lepra, sarna, bronquiectasias, paracoccidiodomicosis y dermatitis infecciosa (Taylor *et al.*, 2008; Gotuzzo *et al.*, 2010).

Las células infectadas con HTLV-1 y las células de pacientes con ATLL son muy resistentes a diversos estímulos proapoptóticos, en comparación con las células no infectadas, incluyendo la apoptosis mediada por los receptores de muerte (Fas y TNF), apoptosis por radiación  $\gamma$ , apoptosis por daño inducido al ADN (Taylor *et al.*, 2008).

Se han reportado estudios que evalúan el efecto antiproliferativo de la apitoxina y de su componente principal, la melitina, en células cancerígenas y células primarias de pacientes

con enfermedades crónicas (Hong *et al.*, 2005; Gajski *et al.*, 2013), en los que se han encontrado que la inhibición de la proliferación se lleva a cabo por activación de la apoptosis (Gajski *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2011; Son *et al.*, 2006; Moon *et al.*, 2006; Hong *et al.*, 2005; Xing Liu *et al.*, 2002). Por otro lado, se ha reportado que la melitina tiene actividad viricida contra el virus HIV-1 en la línea celular del epitelio vaginal VK2 y también se ha reportado que inhibe la infección HIV en la línea celular HeLa que expresa los receptores HIV (Hood *et al.*, 2013; Mata *et al.*, 2017).

Sin embargo, no se tienen estudios del efecto que tiene la apitoxina o los compuestos contenidos en la fracción <10 kDa (en adelante, la fracción <10 kDa) que se obtiene de ella, sobre las células humanas infectadas con HTLV-1. Se consideró evaluar esta fracción ya que el péptido melitina, del cual se han reportado propiedades antivirales y antiproliferativas, tiene un peso molecular de 2.8 kDa. El manejo de las líneas celulares tiene como ventaja su menor costo y más fácil manejo, asimismo, se emplea para rastrear la toxicidad *in vitro* (Garza, 1990) y tenerlas como referencia para evaluar, en posteriores ensayos, la toxicidad *in vivo*.

La hipótesis de este trabajo es: «La fracción <10kDa de la apitoxina de *Apis mellifera* incrementa la apoptosis a través de la activación de las caspasas 3/7». El presente estudio tiene como objetivo principal evaluar el efecto *in vitro* de los compuestos contenidos en la fracción <10 kDa de la apitoxina de *Apis mellifera* en la apoptosis celular. Y como objetivos específicos se tienen: i) determinar el efecto de la fracción <10 kDa de la apitoxina en la línea celular sin el virus y la línea infectada con HTLV-1; ii) evaluar la activación de las caspasas 3/7 en las líneas celulares expuestas a la fracción <10 kDa de la apitoxina; iii) caracterizar la fracción <10 kDa de la apitoxina empleando la cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC).

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. APITOXINA

El veneno de las abejas (*Apis mellifera* del latín *apis*, abeja; y *mellifera* proviene del griego «melli», que significa miel y «ferre» que transporta), también conocido como apitoxina, es producido por una glándula de secreción ácida y otra de secreción alcalina incluidas en el interior del abdomen de la abeja obrera (Martínez, 2011).

La localización de la producción del veneno y las estructuras que forman parte de su producción y secreción han sido descritas por el Portal de Educación de la Junta de Castilla y León de España (Educacyl) de la siguiente manera:

«La ponzoña o aguijón (Figura 1) es una estructura que sólo la tiene la hembra e inyecta el veneno. La ponzoña está localizada en una cámara en la parte terminal del abdomen. La aguja de la ponzoña parece ser sólida, pero en realidad está compuesta de tres partes móviles, un estilete y dos lancetas. El estilete termina en punta fina, pero en su parte proximal es bastante ancha, en su parte interior recibe el veneno. Las lancetas son largas, delgadas, puntiagudas y corren a lo largo de la parte inferior del estilete. En el medio de estas tres estructuras se forma un canal por donde pasa el veneno. La abeja encorva el abdomen hacia abajo, expone la ponzoña, y la hunde en la piel. Las lancetas y el estilete tienen, a lo largo de su borde una serie de espinas que facilitan su anclaje en la piel. Por medio de acción muscular, las lancetas se mueven, en forma alterna hacia adelante, penetrando cada vez más en la piel. El veneno sale a la víctima por unas hendiduras en los costados terminales de la ponzoña. La misma sigue bombeando veneno y penetrando aun cuando es desgarrada de la abeja. La abeja muere al picar. El veneno es producido en dos glándulas, la principal es la glándula ácida, mejor conocida como el saco de veneno, la cual produce ácido fórmico. La segunda es la glándula básica. En el saco de veneno se almacenan las secreciones de ambas glándulas, de esta forma siempre existe una reserva de veneno para uso inmediato. El veneno es chupado o succionado, por acción de las lancetas y

una serie de válvulas, del saco de veneno a la base del estilete y finalmente pasa por el canal formado por el estilete y las lancetas.» (Educacyl s.f.: 17).

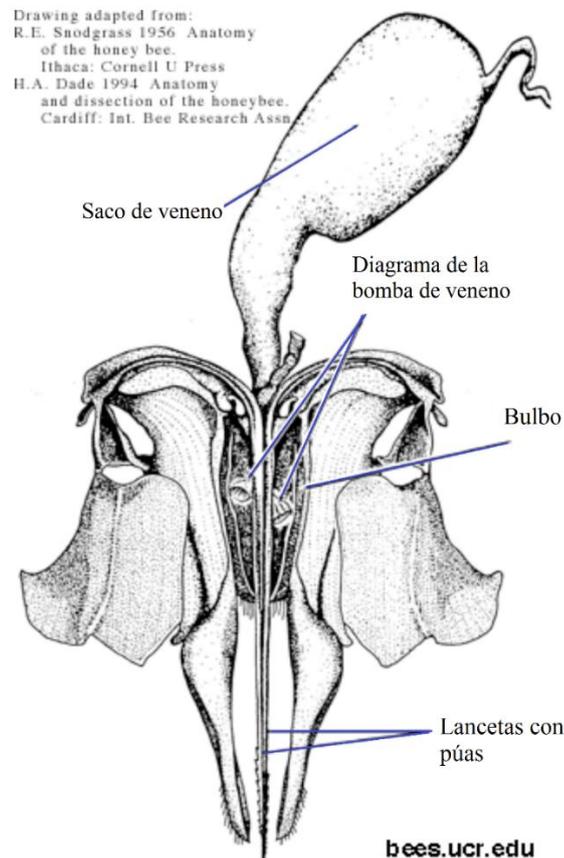


Figura 1. Estructura del aguijón o ponzoña de la abeja.

FUENTE: Visscher *et al.* (1996).

La apitoxina ha sido utilizada en la medicina tradicional para el alivio del dolor y el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas. El interés de las propiedades medicinales y de los efectos anticancerígenos de la apitoxina y de la melitina ha incrementado notoriamente en los últimos años. La apitoxina contiene diferentes péptidos activos como la melitina, la apamina, la adolapina y el péptido de desgranulación de mastocitos. Adicionalmente, contiene enzimas como la fosfolipasa A2 y la hialuronidasa, aminos biológicamente activos y componentes no peptídicos incluyendo lípidos, carbohidratos y aminoácidos libres que poseen actividades celulares (Gajski *et al.*, 2013).

## **2.2. MARCADORES DE SUPERFICIE DE LEUCOCITOS**

Los linfocitos presentan patrones característicos de moléculas de superficie, que son empleados como marcadores de superficie para distinguir y caracterizar distintas poblaciones celulares (Iañez, 2000; Abbas, 2012).

A estas proteínas se les llama a menudo «marcadores» porque identifican y discriminan poblaciones celulares diferentes. El sistema de grupos de diferenciación (CD, del inglés «cluster of differentiation») es un método adoptado de forma uniforme para nombrar las moléculas de una superficie celular que son características de una línea celular en particular o de un estadio de diferenciación, tienen una estructura definida y son reconocidas por un grupo («cluster») de anticuerpos monoclonales (Abbas, 2012).

Por ejemplo, la mayoría de los linfocitos T cooperadores expresan una proteína de superficie llamada CD4 y la mayoría de los linfocitos T citotóxicos expresan una proteína de superficie diferente llamada CD8. Los linfocitos T CD4+ cooperadores tienen como función la diferenciación del linfocito B (inmunidad humoral) y la activación del macrófago (inmunidad celular). Los linfocitos T CD8+ citotóxicos, son linfocitos efectores, que pueden reconocer antígenos en cualquier tipo de célula nucleada y que se activan para matar a la célula; se encargan de la muerte de células infectadas por virus o bacterias intracelulares y el rechazo de aloinjertos (Abbas *et al.*, 2012).

## **2.3.APOPTOSIS**

La apoptosis es un tipo de muerte celular, también conocida como muerte celular programada, en este proceso las células se autodestruyen sin desencadenar reacciones de inflamación (Jordán, 2003; Duprez *et al.*, 2009), ni dejar cicatrices en los tejidos. Por lo que es considerada como una muerte natural fisiológica, resultando en un mecanismo de eliminación de células no deseadas, dañadas o desconocidas y que desempeña un papel protector frente a posibles enfermedades (Jordán, 2003).

La apoptosis se caracteriza porque las células pierden la adherencia a las células vecinas y a la matriz extracelular. Los cambios morfológicos que se llevan a cabo incluyen la condensación del material nuclear, la agrupación de la cromatina en uno o pocos grupos de masas a lo largo de la membrana nuclear, la fragmentación del ADN (se observa una escalera cuando se realiza una electroforesis), la liberación del citocromo c de la mitocondria y la

activación de las caspasas. En el estadio final de la apoptosis, la fosfatidilserina (PS) es traslocada desde la cara interna a la cara externa de la membrana celular, esto sirve como uno de los marcadores para que los macrófagos fagociten las células marcadas; este tipo de muerte celular es afectada por los niveles de ATP (Penaloza *et al.*, 2006)

Durante el desarrollo, la muerte celular apoptótica tiene un rol importante en la remodelación de los tejidos y órganos, como en el desarrollo de los músculos, en la remodelación de las redes interdigitales o en la formación del oído interno. Asimismo, la apoptosis es crucial para el mantenimiento de la homeostasis en el organismo adulto (Penaloza *et al.*, 2006; Duprez *et al.*, 2009)

La detección de la apoptosis ha adquirido gran importancia en la investigación ya que puede ayudar a conocer el mecanismo de acción de fármacos, mecanismos asociados a la naturaleza de la enfermedad, efectividad de los tratamientos, etc. Entre los procesos comúnmente utilizados para detectar la apoptosis está la detección de la degradación del ADN, la presencia de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana celular, cambios en la simetría de la membrana celular y la activación de proteínas específicas como las caspasas 3/7 (Alfaro *et al.*, 2000; Lakhani *et al.*, 2006).

### **2.3.1. Rol de la familia Bcl-2 en la apoptosis**

La familia Bcl-2 (Figura 2) está clasificada en proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Mcl-1, A1, Nr-13) (Tabla 1) y proapoptóticas (Bax, Bad, Bok, Bcl-Xs, Bid, Bik, Blk, Hrk, Bim) (Tablas 2 y 3) (Korsmeyer, 1999). Estas proteínas tienen por lo menos uno de los cuatro motivos conservados, conocidos como dominios homólogos a Bcl-2 (BH1, BH2, BH3 o BH4), y también poseen un dominio transmembrana (TM) (Figura 2). La proteína Bcl-2 tiene los dominios BH1, BH2, BH3, BH4 y TM (Yip *et al.*, 2008). Las proteínas que son más similares a Bcl-2 tienen los cuatro dominios BH. Las proteínas de la familia Bcl-2 controlan la ruta apoptótica mediante la regulación del proceso de permeabilización de la membrana externa de la mitocondria a través de las interacciones proteína-proteína (Dai *et al.*, 2016).

Tabla 1. Proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2

Subfamilia	Siglas (proteína)	Nombre de la proteína	Localización	Mecanismo de acción	Referencia
Proteínas antiapoptóticas o de prosupervivencia					
	Bcl-2	Linfoma de células B2	Se encuentra en la cara citoplásmica de la membrana mitocondrial externa, membrana del retículo endoplásmico y envoltura nuclear.	Bloquea la muerte celular programada. Regula las funciones de Bax y Bak. Bloquea la formación del poro de Bax y Bak preservando la integridad de la membrana mitocondrial.	Tzifi <i>et al.</i> , 2012; UniprotKB.
	Bcl-xl	Linfoma de células B extra grande	Es una proteína transmembrana en la mitocondria.	Previene la liberación del contenido mitocondrial, tal como, el citocromo c, el cual activa a las caspasas.	Michels <i>et al.</i> , 2013; Samat <i>et al.</i> , 2014
Subfamilia Bcl-2	Bcl-W/ Bcl-2-l2	linfoma de células B2 (Bcl-2-like protein 2)	Asociadas a la membrana mitocondrial en las células sanas y durante la apoptosis están fuertemente unidas a la membrana.	Promueve la supervivencia celular.	UniprotKB
	Mcl-1	proteína de diferenciación de célula mielóide 1 inducida Mcl-1	Se localiza en el núcleo, la mitocondria, el citoplasma y la membrana.	La isoforma 1 inhibe la apoptosis.	UniprotKB
	A1/ Bfl-1/ Bcl-2-A1	proteína A1 relacionada a Bcl-2	Se localiza en el citoplasma.	Retarda la apoptosis inducida por privación de interleucina 3.	UniprotKB

Entre las proteínas proapoptóticas están las proteínas con un solo dominio BH3 («BH3 only»), se llaman así porque contienen un dominio que es homólogo al tercer dominio conservado de la proteína Bcl-2); estas proteínas pueden considerarse detectores del estrés celular que pueden unirse a efectores y reguladores de la muerte celular e influir en ellos. En los linfocitos, el detector más importante es la proteína mediadora de la muerte celular que interactúa con Bcl-2 (Bim, por sus siglas en inglés) (Abbas *et al.*, 2012).

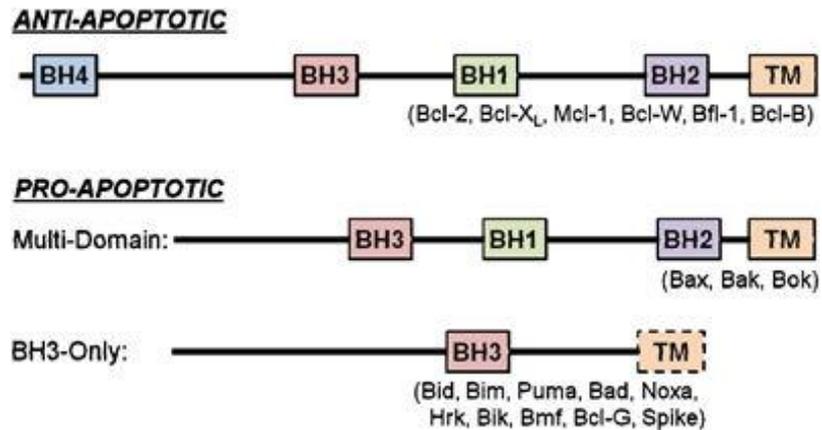


Figura 2. Proteínas de la familia Bcl-2. En la imagen se observan los dominios de homología (BH1, BH2, BH3 o BH4) y también el dominio transmembrana (TM). Algunas proteínas con sólo un dominio BH3 no tienen un TM (línea punteada).

FUENTE: Yip *et al.*, 2008.

Korsmeyer (1999) encontró que Bcl-2 es una proteína que actúa bloqueando la muerte celular programada más que promoviendo la proliferación, permitiendo que la célula mantenga el daño en el ADN y la emergencia de neoplasmas. Korsmeyer (1999) reportó que la proteína Bax forma un heterodímero con Bcl-2 y un homodímero consigo misma. Y observó que cuando Bax se sobreexpresaba en las células, aumentaba la muerte apoptótica en respuesta a una señal de muerte; y cuando Bcl-2 era sobreexpresado, este se heterodimerizaba con Bax y la muerte se reprimía y las células sobrevivían (Cohen, 1997).

Tabla 2. Proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2, subfamilia Bax

<b>Subfamilia</b>	<b>Siglas de la proteína</b>	<b>Nombre de la proteína</b>	<b>Localización</b>	<b>Mecanismo de acción</b>	<b>Referencia</b>
Proteínas proapoptóticas					
Subfamilia Bax	Bax/ Bcl-2-1-4	Regulador de apoptosis X asociado a Bcl-2	Está presente en el citosol y en el retículo endoplasmático.	Se integra a la mitocondria durante la apoptosis y, posteriormente, se oligomeriza, resultando en la liberación de los factores apoptogénicos como el citocromo c y la activación de la cascada de caspasas.	Ramirez-García (2014), Tzifi <i>et al.</i> ,(2011)
	Bak1/ Bak	Proteína asesina 1, antagonista a Bcl-2	Es una proteína integral de la membrana mitocondrial.	Experimenta cambios conformacionales para formar mayores agregados durante la apoptosis.	Ramirez-García (2014), Tzifi <i>et al.</i> ,(2011); HGNC Database.
	Bok	Proteína asesina ovárica asociada a la proteína Bcl-2	Se encuentra en compartimentos nucleares y citoplásmicos en estadios tempranos de la apoptosis y durante la apoptosis se asocia con la mitocondria.	Promueve la apoptosis mitocondrial en respuesta al estrés del retículo endoplásmico a través de la activación posterior de Bax/Bak1 y la regulación positiva de la proteína cinasa R similar a la cinasa del retículo endoplásmico (PERK).	Rello (2008), UniprotKB; HGNC Database.

Tabla 3. Proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2, subfamilia BH3

Subfamilia	Siglas de la proteína	Nombre de la proteína	Localización	Mecanismo de acción	Referencia
Proteínas proapoptóticas					
Subfamilia BH3	Bid	BH3-interacting death agonist domain	Se encuentra en el citosol y la membrana.	Es un activador directo de Bax.	Tzifi et al. (2011), HGNC Database.
	Bik	Bcl-2 interacting killer	Se encuentra alrededor de la envoltura nuclear y de la membrana citoplásmica.	Acelera la muerte celular programada. No interactúa con Bax. La asociación a los represores Bcl-2, Bcl-xl suprime la actividad promotora de muerte.	UniprotKB; HGNC Database.
	Bad	Bcl-2-associated agonist of cell death	Se encuentra libre en la mitocondria. Luego de la fosforilación, se localiza en el citoplasma.	Bad desfosforilada forma un heterodímero con Bcl-2 y Bcl-xl y Bcl-w inactivándolas, lo cual permite que Bax/Bak conduzcan la apoptosis.	Tzifi <i>et al.</i> , (2011), UniProtKB.
	Hrk/ Bid3/ Dp5	- harakiri, Bcl-2 interacting protein - BH3-interacting domain-containing protein 3 - Neuronal death protein DP5	Se localiza en la mitocondria y en la membrana.	Promueve la apoptosis. Se une a las proteínas antiapoptóticas.	UniprotKB
	Bim	- Bcl-2 like 11 o - Bcl-2-interacting mediator of cell death	Se encuentra libre en la mitocondria.	Se une a Bcl-2 o Bcl-XL e inactiva su función antiapoptótica	Tzifi <i>et al.</i> (2011)
	Puma/ Bbc3	- p53-upregulated modulator of apoptosis - Bcl-2-binding component 3	Se localiza en la mitocondria.	Es un mediador crítico de la apoptosis dependiente e independiente de p53. Traduce las señales de muerte principalmente en la mitocondria. Actúa liberando la inhibición de Bax y Bak. Se une y antagoniza a todos los miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2 para alterar la función mitocondrial y activar las caspasas.	Yu y Zhang (2009).

Tabla 4. Proteínas que participan en la apoptosis

<b>Nombre (siglas)</b>	<b>Nombre (inglés)</b>	<b>Nombre de la proteína (en español)</b>	<b>Referencia</b>
DFF45/ ICAD/ DFFA	- DNA fragmentation factor 45 kDa - Inhibitor of caspase-activated deoxynuclease - DNA fragmentation factor subunit alpha	- Factor de fragmentación de ADN de 45 kDa , - Inhibidor de la desoxinucleasa activada por caspasa o - subunidad alfa del factor de fragmentación de ADN.	Saucedo-de-la-Llata et al. (2010), Sharif-Askari et al. (2001), UniprotKB
PARP	- Poly [ADP-ribose] polymerase	Polimerasa poli (ADP-ribosa)	UniprotKB
AIF	Apoptosis-inducing factor 1	Factor inductor de la apoptosis	UniprotKB
Smac/ Diablo	- Second mitochondria-derived activator of caspase - Direct IAP-binding protein with low pI	- Segundo activador de caspasa derivado de la mitocondria - Proteína de unión directa al inhibidor de la apoptosis con bajo pI	Villalonga (2008), UniprotKB
Fas/ CD95/ APO-1	- Fas cell surface death receptor - CD_antigen: CD95	- Receptor de muerte de la superficie celular Fas - Antígeno CD: CD95	UniprotKB
TNF	Tumor necrosis factor	Factor de necrosis tumoral	UniprotKB
TNFR	Tumor necrosis factor receptor	Receptor del factor de necrosis tumoral	UniprotKB
DISC	Death-inducing signaling complex	Complejo de señalización de inducción de muerte	Vega-Manriquez (2009), UniprotKB
GzmB	Granzyme B	Granzima B	UniprotKB

### **2.3.2. Caspasas**

Las caspasas son un grupo de proteasas de cisteína que escinden el enlace C-terminal del ácido aspártico. Y están presentes constitutivamente en la mayoría de las células, residiendo en el citosol como proenzimas de cadena simple. Son activadas por una primera escisión proteolítica que las divide en una subunidad grande y una pequeña, y por una segunda escisión que remueve el dominio N-terminal (prodomio) (Green, 1998).

Las caspasas pueden funcionar en una cascada de activación. Las caspasas con motivos de interacción de proteínas que carecen de prodominios cortos (caspasas 3, 6, y 7) son probablemente activadas a través de la acción de otras proteasas. Estas son llamadas como caspasas efectoras o ejecutoras (Green, 1998).

### **2.3.3. Caspasas 3 y 7**

Las principales caspasas que coordinan la fase de ejecución de la apoptosis son las caspasas 3 y 7 mediante la escisión de múltiples proteínas estructurales y de reparación (Walsh *et al.*, 2008). La caspasa 3 está ampliamente distribuida, con alta expresión en líneas celulares de origen linfocítico, sugiriendo que es un mediador importante de la apoptosis en el sistema inmune (Cohen, 1997). Las caspasas 3 y 7 comparten una secuencia de reconocimiento peptídico óptima y tienen varios sustratos proteicos endógenos en común. Sin embargo, varios sustratos son escindidos por la caspasa 7 y no por la caspasa 3 (Slee *et al.*, 2001, Walsh *et al.*, 2008) y existiría redundancia en ciertos tipos celulares como las células Jurkat (Walsh *et al.*, 2008).

Por otro lado, la activación de la caspasa 7 requiere de los inflamomas de la caspasa 1. La importancia de la caspasa 3 y 7 parece ser dependiente del estímulo y del tipo de célula (Slee *et al.*, 2001). Ambas caspasas escinden y activan la familia de proteínas que se unen al elemento regulatorio del colesterol (SREBP, por sus siglas en inglés, Tabla 4) y que regulan la homeóstasis lipídica del organismo controlando la expresión de numerosas enzimas necesarias para la síntesis de colesterol, ácidos grasos, triglicéridos y fosfolípidos; también escinden proteolíticamente la polimerasa poli(ADP-ribosa) (PARP) (Tabla 4), su sobreexpresión promueve la muerte celular programada (Uniprot).

Slee *et al.* (2001) mostraron que la caspasa 3 es necesaria para la escisión – inducible por citocromo c/dATP – de fodrina, gelsolina, topoisomerasa I, vimentina, Rb (proteína asociada al retinoblastoma), factor 45 de fragmentación de ADN (DFF45, también conocido como inhibidor de la DNAsa activada por caspasa «ICAD») (Tabla 4), etc. También, se ha reportado la activación de la caspasa-7 y no de la caspasa-3 en la línea celular de cáncer de próstata LNCaP luego de ser tratada con lovastatina, llevándose a cabo la apoptosis (Marcelli *et al.*, 1998).

Lakhani *et al.* (2006) reportaron que las caspasas 3 y 7 son mediadores críticos de eventos mitocondriales de la apoptosis controlando la pérdida del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) y la liberación del factor inductor de la apoptosis (AIF) (Lakhani *et al.*, 2006).

La detección de la activación de la caspasa 3 se ha utilizado como marcador temprano de la apoptosis. Este tipo de marcadores son de gran importancia, ya que la detección de la apoptosis *in vivo* por métodos que detectan la degradación de ADN no siempre es exitosa, debido a que estas células pueden ser removidas antes de que dicha degradación se presente. La determinación de la activación de la caspasa-3 presenta la gran ventaja de que es un evento que tiene una alta correlación con la inducción de la apoptosis, por lo que no existe la incertidumbre que tiene con otros marcadores en los que su presencia o ausencia no son determinantes en el proceso de muerte celular programada (Alfaro *et al.*, 2000).

#### **2.3.4. Rutas apoptóticas**

Existen tres rutas principales de la activación de las caspasas asociadas a la apoptosis, las cuales han sido identificadas en mamíferos, y estas son: la extrínseca o ruta del receptor de muerte, la intrínseca o ruta del apoptosoma y la ruta de la granzima B iniciada por el linfocito citotóxico (Cullen y Martin, 2009)

La vía intrínseca (Figura 3A) o ruta de activación de las caspasas está regulada por proteínas de la familia Bcl-2. La vía se inicia cuando las proteínas citoplásmicas de la familia Bcl-2 que pertenecen a la subfamilia de «proteínas con un solo dominio BH3» son inducidas o activadas como resultado de señales celulares, de la privación del factor de crecimiento, de estímulos nocivos o de una alteración del ADN (Abbas *et al.*, 2012). La proteína se activa y

une a dos proteínas efectoras proapoptóticas de la familia Bcl-2 llamadas Bax y Bak, que se oligomerizan e insertan en la membrana mitocondrial externa (Abbas *et al.*, 2012).

La apertura del canal Bax/Bak da como consecuencia la liberación del citocromo c del espacio intermembranal de la mitocondria al citoplasma, lo cual resulta en el ensamblaje del apoptosoma (complejo formado por apaf-1 y citocromo c) que permite la activación de la procaspasa-9 a caspasa-9 dentro de este complejo (Naval *et al.*, 2004). La caspasa 9 propaga una cascada de eventos que escinden y activan las caspasas 3 y 7. La proteína Smac (segundo activador de caspasa derivado de la mitocondria), también llamada DIABLO (proteína de unión directa al inhibidor de la apoptosis con bajo pI) (Tabla 4) es liberada de la mitocondria cuando las células son expuestas al estímulo apoptótico (Cho y Choi, 2002). La caspasa 3 escinde el DFF45 (ICAD), liberando la DNAsa CAD que escinde el ADN celular (Slee *et al.*, 2001). El AIF es otra proteína mitocondrial que es liberada al citoplasma durante la apoptosis (Susin *et al.*, 1999), es una flavoproteína de 57 kDa, homóloga a las oxidorreductasas de las bacterias, contiene dos secuencias de localización mitocondrial, así como dos secuencias señal de localización nuclear. El AIF se localiza en el espacio intermembranal de la mitocondria, y cuando llega la señal apoptótica se puede mover al citoplasma y al núcleo. Se cree que el factor 1 inductor de la apoptosis (AIF) en el núcleo incrementa la condensación de la cromatina y la fragmentación a gran escala del ADN (Cho y Choi, 2002). La liberación del AIF al citosol es controlada por la acción combinada de las caspasas 3 y 7 (Lakhani *et al.*, 2006) y es necesaria para la exposición de fosfatidilserina durante la apoptosis inducida por el receptor de muerte (Preta y Fadeel, 2012).

En la vía extrínseca (Figura 3B), se da la activación tras la unión de una proteína extracelular, como Fas Ligando (ligando CD95 o CD95L) y TNF, a su receptor mortal, Fas (CD95 o APO-1) (Tabla 4) y TNFR1, respectivamente. Los receptores de muerte pertenecen a la familia TNF (Tabla 4) y tienen en su región intracelular el dominio de muerte (DD) (Naval *et al.*, 2004). Los motivos DD tienen una longitud de 80 a 100 aminoácidos y son necesarios para transmitir la señal de muerte (Lavrik y Krammer, 2012). La unión de FasL o anticuerpos agonistas a Fas conduce a la formación de un complejo de señalización de inducción de muerte (DISC) (Tabla 4) que activa a la procaspasa-8, formándose la caspasa 8 activa, la cual activa las caspasas efectoras como la caspasa 3 que ejecuta la apoptosis cortando diversas proteínas celulares (Cohen, 1997; Naval *et al.*, 2004; Krammer *et al.*, 2007; Cullen y Martin, 2009). En muchos tipos celulares, la caspasa 8 escinde y activa a proteínas con un

solo dominio BH3, que induce la apoptosis mitocondrial. En estos casos, la vía mitocondrial sirve para amplificar las señales del receptor mortal (Abbas *et al.*, 2012)

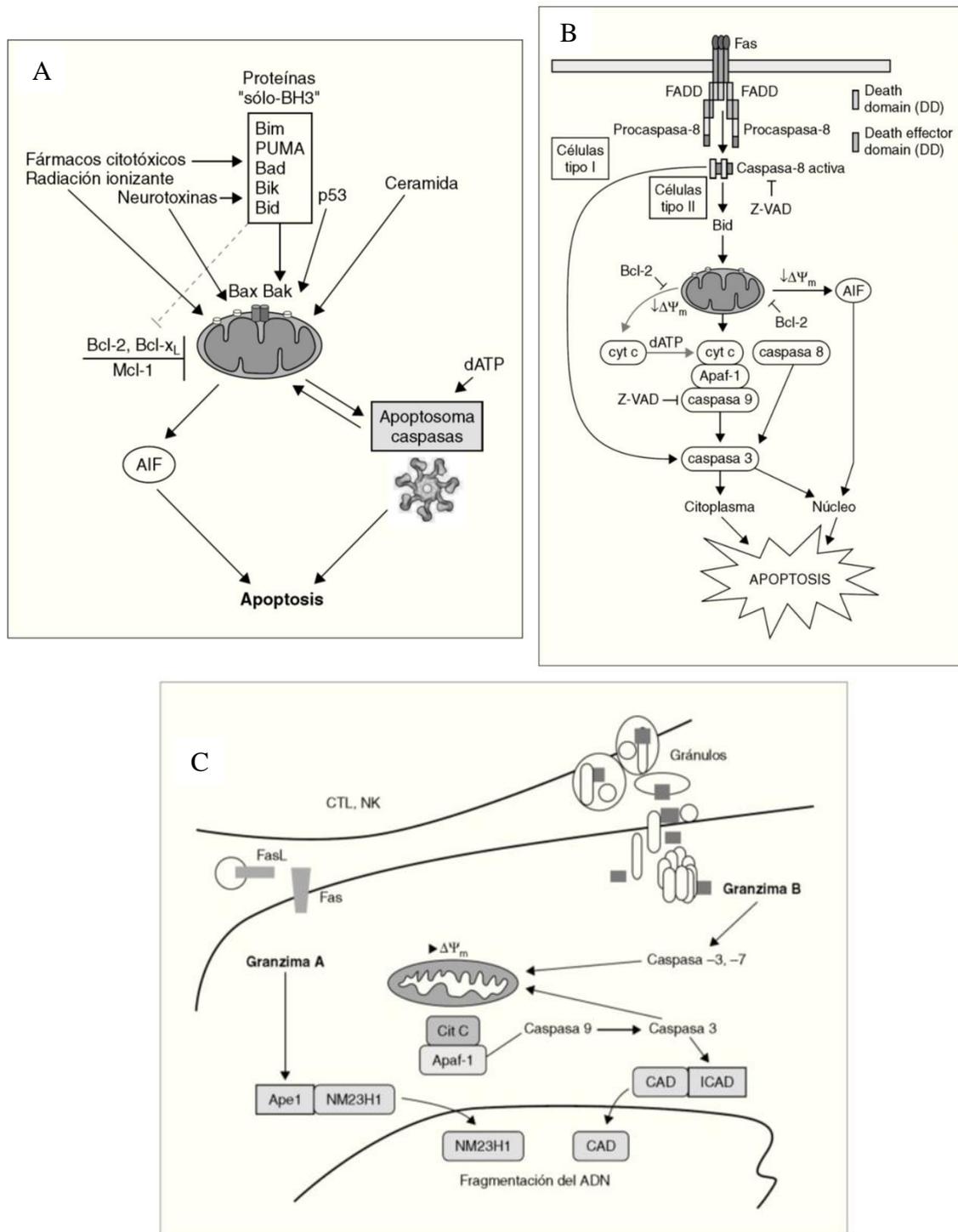


Figura 3. Representaciones esquemáticas de las rutas apoptóticas. A) Vía intrínseca. B) Vía extrínseca. C) Ruta de la granzima B.

FUENTE: Naval *et al.*, 2004

La apoptosis inducida por el sistema Perf/GzmB (perforina/granzima B) (Figura 3C) se inicia mediante el procesamiento de cantidades limitadas de caspasa 3, la cual produce una caída transitoria del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), salida de citocromo c y activación de la caspasa 9. Esta caspasa corta y activa a su vez a más caspasa 3, lo que provoca la fragmentación del ADN, la pérdida irreversible del  $\Delta\Psi_m$  y amplifica la señal apoptótica. La apoptosis inducida por la GzmA es independiente de caspasas. Esta granzima procesa a diversas proteínas de un complejo localizado en el retículo endoplásmico (complejo SET). Este complejo incluye una DNasa, llamada NM23-H1, la cual se transloca al núcleo tras la acción de la GzmA, induciendo roturas de cadena sencilla en el ADN (Naval *et al.*, 2004).

#### **2.4. HTLV-1 y la apoptosis**

El HTLV-1 es un retrovirus con amplia distribución mundial que compromete principalmente linfocitos CD4 (Gotuzzo *et al.*, 2010). Está asociado a la paraparesia espástica tropical (PET) y a la leucemia/linfoma de células T del adulto (ATLL, por sus siglas en inglés) (Rivera-Caldón *et al.*, 2017). ATLL está caracterizado por la proliferación clonal rápida y descontrolada de células T CD25+CD4+ transformadas y maduras y la supervivencia media de los pacientes en la fase aguda de la enfermedad es de 6 meses (Taylor *et al.*, 2008). Cuando el virus toma el control de la célula hospedera genera un aumento de copias del genoma viral (proceso que se mantiene por la expansión clonal de los linfocitos T) y promueve la expresión de genes reguladores virales como *tax*, *rex*, *hbx*, entre otros. El gen *tax* activa el factor nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) y la transcripción de genes involucrados en el crecimiento y proliferación virales e inhibe la apoptosis por supresión de las proteínas p16 y p53 y la degradación de la proteína del retinoblastoma siendo capaz de conducir procesos que llevan a la aparición de ATLL. La proteína Hbx estimula la proliferación celular a través del E2F-1 y permite el avance sobre el punto de control G1/S del ciclo celular, lo que lleva a la transformación maligna ATL (Rivera-Caldón *et al.*, 2017).

La disminución de la apoptosis es una característica del cáncer, por lo que muchos tratamientos contra el cáncer inducen la apoptosis en células susceptibles, principalmente por las rutas extrínseca e intrínseca. Durante el cáncer, las proteínas antiapoptóticas son sobreexpresadas (Dai *et al.*, 2016). La regulación de la apoptosis juega un rol crucial en la

tumorigénesis y en el fracaso de la quimioterapia (Thompson *et al.*, 1995; Morotti *et al.*, 2006) y en la terapia anticancerígena es el mecanismo de muerte celular programada (Thompson *et al.*, 1995). Ha sido implicada en la patogénesis y patofisiología de varias enfermedades humanas, tales como el cáncer, disfunción autoinmune, SIDA y enfermedades neurodegenerativas (Thompson *et al.*, 1995).

Se ha reportado la inhabilidad de las drogas citotóxicas para inducir la apoptosis efectiva en células cancerígenas. Las células cancerígenas pueden expresar rutas anormales de transducción de señales que directamente activan programas antiapoptóticos. Las rutas de supervivencia más relevantes involucradas en la resistencia a la quimioterapia son fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K/Akt) y la ruta del factor nuclear  $\kappa$  de células B (NF- $\kappa$ B) y se ha encontrado que están activadas constitutivamente en varias células cancerígenas o activadas por la exposición a varios agentes quimioterapéuticos como taxol, doxorubicin, daunorubicin, etoposide, vincristine, camptothecin y otros. Se ha relacionado la disminución de la apoptosis con una incrementada actividad de NF- $\kappa$ B a través de la expresión de genes antiapoptóticos (Morotti *et al.*, 2006). Se ha reportado que la proteína Bcl-xL está sobreexpresada en células infectadas con HTLV-1 (Nicot *et al.*, 2000)

## **2.5. EFECTO ANTIPROLIFERATIVO DE LA APITOXINA**

La melitina induce la apoptosis en células leucémicas a través de un aumento de la regulación de Bcl-2 y de los miembros de la familia de inhibidores de la apoptosis (IAP), los reguladores claves son Bcl2 y caspasa 3, controlados a través de la ruta de señalización Akt (Gajski *et al.*, 2013; Moon *et al.*, 2008).

Park *et al.* (2011) demostraron que la apitoxina (1-10  $\mu$ g/mL) y la melitina (0.5-2.5  $\mu$ g/mL) inhibieron el crecimiento celular en las células de carcinoma de próstata (células LNCaP, DU145 y PC-3) mediante la inducción de la muerte celular apoptótica *in vitro*, así como, en el modelo de xenotrasplante *in vivo*, por medio de la activación de la ruta de la caspasa a través de la supresión de la activación de NF- $\kappa$ B. La apitoxina y la melitina disminuyeron las proteínas antiapoptóticas e indujeron las proteínas proapoptóticas. Sus datos demostraron que la apitoxina y la melitina inhibieron la unión al ADN y la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B, molécula involucrada en la regulación de la proliferación celular y la muerte celular apoptótica, que está activada constitutivamente en cánceres de próstata (Park *et al.*, 2011).

Son *et al.* (2006) investigaron el efecto antiproliferativo de la apitoxina y de la melitina y definieron su mecanismo de acción en cultivo de músculo liso vascular aórtico (VSMC) y encontraron que la apitoxina (~0.4 µg/mL) y la melitina (~0.8 µg/mL) inhibieron la proliferación por apoptosis de VSMC inducida por 5 por ciento de suero bovino fetal y 50 ng/ml del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB, por sus siglas en inglés) formado por dos cadenas B (BB). En este estudio examinaron el efecto de la melitina en la activación del NF-κB y encontraron que la fosforilación de IκBα inducidas por PDGF-BB y su degradación fueron inhibidas por la melitina y ésta atenuó la actividad de unión al ADN y la traslocación nuclear de la subunidad p50 del NF-κB en respuesta a la acción de PDGF-BB. El tratamiento con melitina también indujo la expresión de la proteína proapoptótica p53, Bax y caspasa-3. Estos resultados sugirieron el efecto antiproliferativo de la apitoxina y de la melitina en las VSMC a través de la inducción de la apoptosis vía las supresiones de NF-κB y la activación de Akt y estimulación de la ruta de señalización apoptótica (Son *et al.*, 2006).

Moon *et al.* (2006) reportaron que la apitoxina indujo la apoptosis en células leucémicas U937 a través de la disminución de la regulación de ERK y de la ruta de señalización Akt acompañado de la disminución de la regulación de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2, Bcl-xL, XIAP y cIAP-2, de la activación de caspasa 3 y la posterior escisión de la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP). Los resultados indicaron que los reguladores clave en la apoptosis inducida por la apitoxina son las proteínas Bcl-2 y caspasa-3 en células U937 leucémicas humanas (Moon *et al.*, 2006).

Hong *et al.* (2005) investigaron el efecto de la apitoxina en el tratamiento de la sinovitis reumatoide, ellos emplearon fibroblastos sinoviales reumatoides humanos para examinar la inhibición del crecimiento celular y la inducción de la apoptosis. La evaluación de la proliferación celular y la viabilidad mediante el ensayo 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) confirmaron el efecto citotóxico de las células sinoviales reumatoides dependiente de la dosis y del tiempo y estos efectos se hicieron evidentes con 10 µg/mL de la apitoxina por 24 horas. Observaron apoptosis de las células sinoviales de cultivo primario de pacientes con artritis reumatoide que fueron tratadas con 10 µg/mL de la apitoxina por 24 horas y que la apoptosis se llevaba a cabo a través de la disminución de la expresión de los genes BCL-2 y el incremento de la expresión de BAX y CASP3 (caspase-3) (Hong *et al.*, 2005).

En una investigación realizada por Xing Liu *et al.* (2002) estudiaron el efecto antitumoral *in vivo* e *in vitro* de la apitoxina y demostraron que esta inhibió la proliferación o tuvo un efecto citostático en las células de melanoma K1735M2 de ratón. La inhibición de la proliferación que ejerció la apitoxina tuvo una relación directamente proporcional a la concentración y al tiempo de incubación. Con un valor de CI50 de 10 µg/mL. Los resultados indicaron que la apitoxina indujo arresto del ciclo celular en G1 de las células K1735M2, causando la muerte celular por apoptosis. La administración de 1 a 3 mg/kg de la apitoxina a los ratones inyectados con la línea celular B16 de melanoma de ratón, resultó en un retardo significativo del crecimiento con una inhibición de 20 y 52 por ciento, respectivamente, probablemente por actividad citostática contra las células tumorales (Xing Liu *et al.*, 2002).

## **2.6. CITOMETRÍA DE FLUJO**

La citometría de flujo es una técnica con gran potencial analítico, que reside principalmente en la posibilidad de medir diversos parámetros en decenas de millares de células individuales en pocos segundos. Básicamente, el citómetro de flujo mide propiedades de absorción y dispersión de luz por la célula o partícula subcelular, y fluorescencia emitida por fluorocromos unidos a componentes celulares de interés, inducidas por una iluminación apropiada (Monteiro *et al.*, 2002).

Los componentes básicos de un citómetro de flujo incluyen (Monteiro *et al.*, 2002):

- Fuente de luz: que en general es un rayo láser. La luz emitida está concentrada en un haz estrecho. La mayoría de los citómetros actuales disponen de un láser de ión argón.
- Sistema de flujo: en la que se orienta el flujo de células y se consigue el paso de éstas en forma individual.
- Sistema óptico: formado por lentes, espejos dicróicos y filtros, que enfocan el haz de luz para iluminar la muestra y descomponen la emisión de fluorescencia en sus componentes individuales.
- Fotomultiplicadores y convertidores analógicos digitales, que detectan y convierten las señales luminosas en impulsos eléctricos y estos en señales digitales.
- Ordenador para adquisición, almacenamiento y análisis de los datos en tiempo real o en modo de matriz de datos.

## 2.7. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA UHPLC (ULTRA HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY)

La cromatografía líquida de ultra alta eficiencia (UHPLC, por sus siglas en inglés), es un método avanzado de HPLC (cromatografía líquida de alta eficiencia) (Chawla y Ranjan, 2016). El principio de la UHPLC se basa en la curva de Van Deemter, la cual describe la relación entre la velocidad lineal con la altura del plato. La UHPLC tiene una mejora en la rapidez, resolución y sensibilidad; es una categoría avanzada del HPLC, con el mismo principio básico. La ecuación de Van Deemter:

$$H = A + \frac{B}{v} + C_v$$

Donde H representa la altura equivalente al plato teórico (HETP), A, B y C son constantes y v es la tasa de flujo (velocidad lineal) del gas portador. La UHPLC minimiza HETP para mejorar la eficiencia de la columna (Chawla y Ranjan, 2016).

La utilización de la UHPLC es muy importante en el campo toxicológico, farmacéutico y de análisis clínicos (Nováková *et al.*, 2006); ha ayudado en la detección de los metabolitos de drogas y en la mejora de la calidad del espectro de separación (Chawla y Ranjan, 2016).

El UHPLC comprende una mayor presión y una columna con un tamaño de partícula menor de los 2  $\mu\text{m}$ , disminuyendo la longitud de la columna, lo cual reduce el tiempo y el consumo de solvente (Chawla y Ranjan, 2016) y aumenta el caudal, por lo que la separación se da más rápido.

## **2.8. LÍNEAS CELULARES**

Las líneas celulares en estudio son utilizadas en la realización de pruebas de toxicidad *in vitro* ya que resultan más económicas y de más fácil manejo que las células primarias. La principal ventaja es evaluar un número grande de células e identificar los compuestos altamente citotóxicos de los de baja toxicidad, así como la posibilidad de disminuir el número de animales empleados en las pruebas de toxicidad *in vivo* (Garza, 1990).

### **2.8.1. Línea celular K562**

Es una línea derivada de un paciente con leucemia mieloide crónica, altamente indiferenciada que no porta el virus HTLV-1. Se ha demostrado que los blastos son multipotenciales, células malignas hematopoiéticas que espontáneamente se diferencian en progenitores de los eritrocitos, granulocitos y la serie monocítica. Carece de las propiedades de las células B (como la superficie de inmunoglobulinas), del antígeno T y de sensibilidad para la inhibición del crecimiento por timidina. En común con las células B, son lisadas rápidamente por los leucocitos de sangre periférica (Klein *et al.*, 1976).

### **2.8.2. Línea celular MT-2**

Línea celular infectada con el virus de la leucemia T humana tipo I obtenida mediante un cocultivo de linfocitos normales – del cordón umbilical de un varón – con leucocitos periféricos – de una mujer japonesa de 45 años con linfadenopatía generalizada y hepatoesplenomegalia (leucemia de células T adultas). Las células MT-2 están infectadas con HTLV-1 (Romano *et al.*, 2009). Las MT-2 tienen el cariotipo masculino y la presencia del cromosoma Y ha sido confirmada por un perfil STR en la empresa European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC). Se ha demostrado que la línea celular MT-2 tiene características funcionales y fenotípicas de las células T regulatorias humanas y es una herramienta útil para su estudio (Hamano *et al.*, 2015).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. MATERIALES Y REACTIVOS

- Agua destilada apirógena 1L
- *Tips* apirógenos libres de nucleasas de 10  $\mu$ l, 200  $\mu$ L y 1000  $\mu$ L (Axygen)
- Tubos cónicos Corning con tapa de 50 mL y 15 mL (CentriStar)
- Bolsa de pipetas serológicas desh de 5mL y 10 mL (Costar)
- Bolsa de flaks estériles, Canted neck de 25 cm<sup>2</sup> (Falcon)
- Guantes de nitrilo
- Medio Iscove, Thermo (Fisher Scientific)
- L-Glutamina 200 mM (Sigma)
- Bicarbonato de sodio (Sigma)
- Suero Fetal Bovino “inactivado” (Sigma)
- Filtro Stericup / Steritop 0.45  $\mu$ m, (Merk)
- Placas de cultivo de 96 pozos, 24 pozos y fondo U (Falcon)
- Frasco Penicillin 10 000 U/mL Streptomycin 10 000  $\mu$ g/mL (Gibco)
- Sytox red dead cell stain (Molecular Probes)
- Cell Event™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent (Molecular Probes)
- Frasco de azul de tripán 0.4 por ciento
- Cámara de Neubauer
- True North Freezer boxes flat-packed w/div 1.5/2.0, Scientific
- Frasco Agua PCR libre de nucleasas
- Microtubos de 0.2 mL, 0.6 mL
- Columna: Aeris PEPTIDE 2.6  $\mu$ m XB-C18

#### Equipos

- Citómetro de flujo FACSCalibur
- Fluorómetro Qubit (Invitrogen)

- Microscopio invertido Axiovert 25
- Microscopio óptico
- Centrífuga MiniSpin
- Centrífuga Eppendorf 5810 R
- Incubadora
- Cabina de flujo laminar
- Agitador de tubos (vórtex)
- Cromatógrafo con detector de arreglo de diodos (DAD) marca DIONEX Ultimate 3000

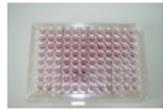
La presente tesis se realizó siguiendo el flujograma mostrado en la Figura 4.

### **3.2. LÍNEAS CELULARES - MANTENIMIENTO**

Se emplearon dos líneas celulares, K562, K562 (ATCC® CCL-243™), línea derivada de un paciente con leucemia mieloide crónica, altamente indiferenciada que no porta el virus HTLV-1 (Klein *et al.*, 1976), y la línea celular MT-2 (Sigma Aldrich, EEUU) que produce continuamente viriones HTLV-1 (Romano *et al.*, 2009).

Ambas líneas se descriopreservaron (Anexo 1) por separado y en meses diferentes y se sembraron en frascos de cultivo de 25 cm<sup>3</sup> para cultivos celulares con un volumen total de 10 ml de medio Iscove suplementado (medio Iscove completo) con 1 por ciento de L-glutamina 200 mM, 10 por ciento de suero fetal bovino y 0.1 por ciento de β-mercaptoetanol 50 mM y se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada con 5 por ciento de CO<sub>2</sub>. Los cultivos se dejaron aclimatar por un promedio de 5 días, en los que se observó diariamente el cultivo, retirando 5 ml de medio con células de la parte superficial que es donde se encuentran las células muertas y agregándole 5 ml de medio recién suplementado. Luego se sembraron las células en las botellas de cultivo de 75cm<sup>3</sup> con un volumen total de 40 ml de medio Iscove completo y se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada con 5 por ciento de CO<sub>2</sub>.

**EFFECTO DE LA FRACCIÓN <10 KDA EN EL CRECIMIENTO CELULAR**



Siembra en placa

**Tratamientos**

µg/mL
0.25
1
5
10
15
20

Fracción <10kDa

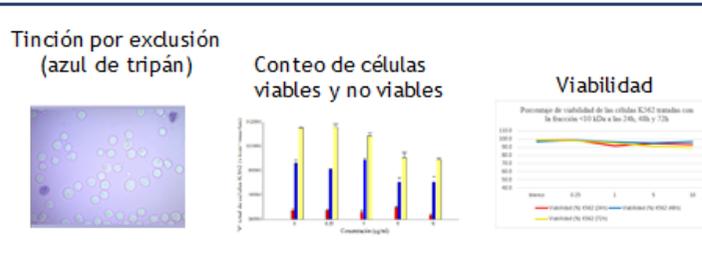
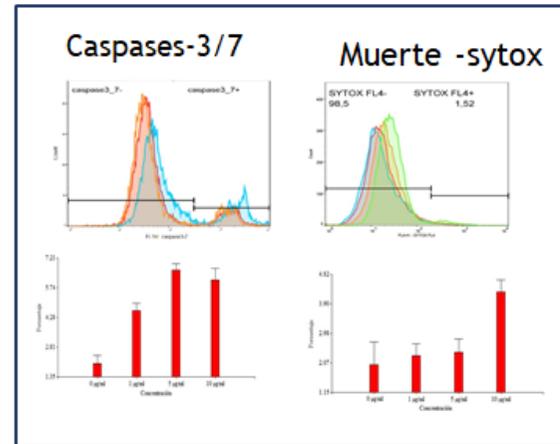


Caspases-3/7

Sytox

**MÉTODOLÓGÍA**

**ACTIVACIÓN DE LAS CASPASAS (Citometría de flujo)**



Fracción <10kDa



Cuantificación



**CARACTERIZACIÓN POR UPLC**

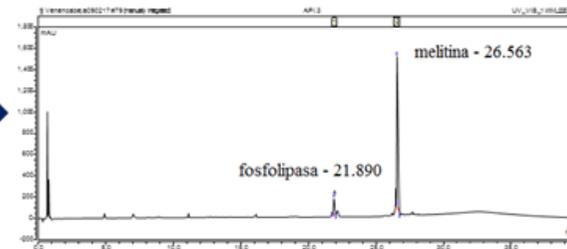


Figura 4. Flujograma de trabajo

### **3.3. FRACCIÓN <10 kDa DE LA APITOXINA**

La fracción <10kDa de la apitoxina fue proporcionada gentilmente por el Instituto de Medicina Tropical Alexander *von* Humboldt, Grupo de Investigación en Virología (en el ANEXO 2 se detalla el procedimiento de obtención de la fracción <10 kDa). La apitoxina se obtuvo de las colmenas ubicadas en Chulucanas del departamento de Piura, se emplearon parrillas colectoras a la entrada de cada colmena con un controlador electrónico que emite pulsos controlados. La apitoxina una vez colectada fue almacenada a -20°C.

Para la presente tesis, se midió la concentración de las proteínas totales contenidas en la fracción <10kDa de la apitoxina proporcionada, empleando la cuantificación por fluorometría con el fluorómetro Qubit (Invitrogen, EEUU). Luego, se almacenó a -20°C en un desecador para su uso.

### **3.4. EFECTO DE LA FRACCIÓN <10 kDa SOBRE EL TOTAL DE CELULAS K562 Y MT-2**

Cada línea celular se trabajó por separado y en semanas diferentes. Se sembró en una placa de 96 pozos, con fondo U, 10000 células por pozo de ambas líneas celulares en placas distintas de 96 pozos con una viabilidad superior al 90 por ciento con medio Iscove, empleando un control (0 µg/mL) y diferentes concentraciones de la fracción <10 kDa de la apitoxina. En las estandarizaciones de K562 se evaluaron diferentes concentraciones como 0.25, 0.5, 1 y 2 µg/mL inicialmente con dos repeticiones (Figura 5A). Se observaron diariamente al microscopio invertido Axiovert 25 (Figura 5C) para evaluar si había incremento del total de células y se realizaron los conteos de las células vivas, muertas y se calculó el porcentaje de viabilidad.

Para la línea celular K562 se evaluaron las concentraciones de 0.25, 1, 5 y 10 µg/mL con 3 repeticiones y para la línea celular MT-2 se evaluaron concentraciones de 1, 5, 10, 15 y 20 µg/mL y un control (0) que no contiene la fracción <10 kDa (Figura 5B) con 3 repeticiones (Figura 6), alrededor de los pozos a evaluar se agregó una banda de humedad que consistía de medio de cultivo Iscove sin suplementar.

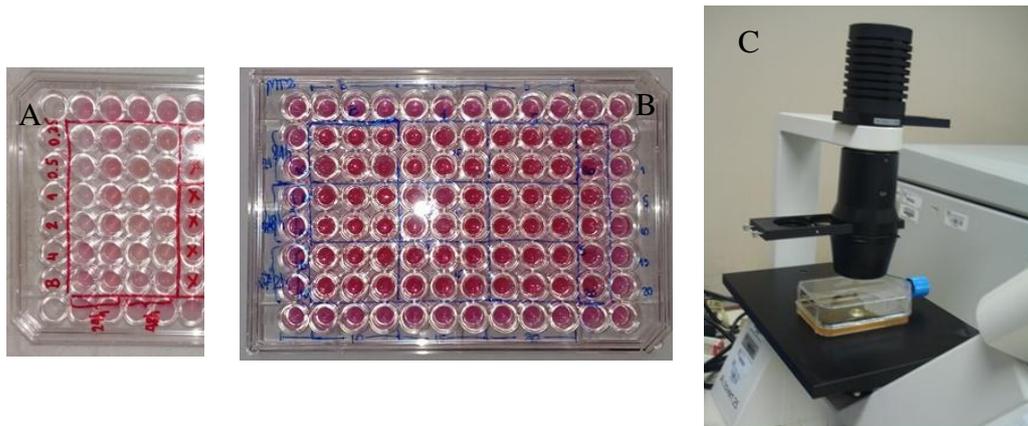


Figura 5. Cultivo celular K562 y MT-2 en placa de 96 pozos. A) Cultivo de K562 en placa con concentraciones a evaluar de 4, 2, 1, 0.5 y 0.25  $\mu\text{g/mL}$ . B) Cultivo de MT-2 en placa con concentraciones de 1, 5, 10, 15 y 20  $\mu\text{g/mL}$ . C) Cultivo en frasco de 75  $\text{cm}^3$  en el microscopio invertido.

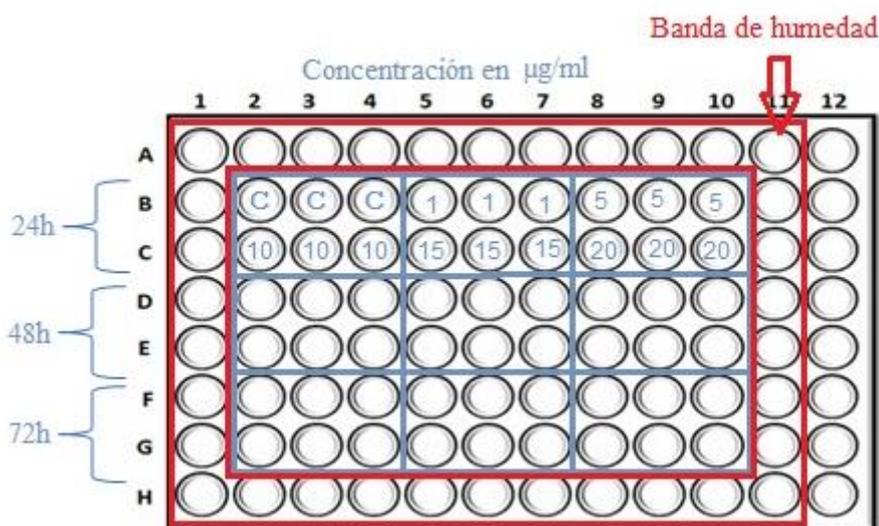


Figura 6. Esquema de las evaluaciones finales en placa de 96 pozos. Evaluaciones realizadas a las células MT-2 con 3 repeticiones, cultivadas por 24h, 48h y 72h.

El conteo del total de células K562 y MT-2 se realizó en diferentes tiempos de incubación (24h, 48h y 72h) haciendo el conteo celular en cámara de Neubauer para evaluar el número de células vivas, muertas y determinar la viabilidad celular utilizando azul de tripán. Se basa en que las células vivas poseen las membranas celulares intactas que excluyen el azul de tripán y las células muertas no. El azul de tripán atraviesa las membranas de las células

muertas (Figura 7). Las células vivas se observan con el citoplasma claro y las células muertas se les observa con el citoplasma azul (Strober, 2015).

Se halló el número total de células contenidas en cada pozo de la placa utilizando la siguiente fórmula:

$$N^{\circ} \text{ total de células} = \frac{N^{\circ} \text{ células vivas}}{4} \times \text{factor dilución (2)} \times 10 \times \text{volumen total en el pozo}$$

Se realizó el cálculo del porcentaje de células vivas con la siguiente fórmula:

$$\text{células vivas (\%)} = \frac{N^{\circ} \text{ total de células vivas}}{N^{\circ} \text{ total de células (vivas y muertas)}} \times 100$$

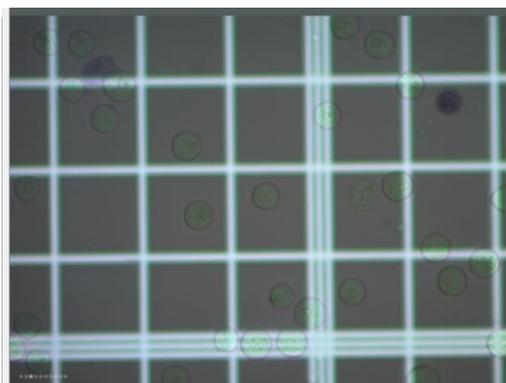


Figura 7. Observación al microscopio óptico de las células K562 Las células muertas fueron teñidas por el azul de tripán y observadas a 400X.

### 3.5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE CASPASAS

Para evaluar la presencia de células apoptóticas y muertas por citometría de flujo, después del tratamiento con la fracción <10 kDa de la apitoxina, las células fueron cosechadas a las 72h en tubos de citometría, centrifugadas a 500 ref por 15 minutos. Luego fueron suspendidas en el buffer PBS que contiene 5 por ciento de suero fetal bovino con 6  $\mu$ M de Cell Event™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent (Invitrogen, EEUU) y fueron incubadas a 37°C por 30 minutos para evaluar la activación de las caspasas. Luego, se les marcó con el reactivo SYTOX™ Red dead cell (Invitrogen, EEUU) y se incubó a 4°C por 15 minutos, según las indicaciones del fabricante. Luego de tratarlas con los reactivos SYTOX y caspasa-

3/7, se realizó el análisis utilizando el citómetro de flujo FACSCalibur y los resultados se analizaron con la plataforma de análisis FlowJo v10.4.

Cell Event™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent (Invitrogen, EEUU) consiste de un péptido de 4 aminoácidos (DEDV: ácido aspártico, ácido glutámico, ácido aspártico y valina), conjugados a un colorante de unión al ácido nucleico. Durante la apoptosis, las caspasas 3 y 7 se activan y son capaces de escindir la secuencia de reconocimiento del reactivo caspase-3/7 codificada en el péptido DEVD y este se une al ADN de las células apoptóticas, marcando las células apoptóticas, emitiendo una señal fluorogénica brillante. La excitación/emisión máxima es de 502/530 nm.

SYTOX™ Red dead cell (Invitrogen, EEUU) es un colorante que se une al ADN y que penetra fácilmente las células con la membrana celular dañada. Después de la incubación con SYTOX, los ácidos nucleicos de las células muertas fluorescen cuando son excitados con una luz láser de 633 o 635 nm.

### **3.6. CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA FRACCIÓN <10 kDa DE LA APITOXINA POR UHPLC**

Se realizó la caracterización de los compuestos contenidos en la fracción <10kDa empleando la cromatografía líquida de ultra eficacia, UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography) con un cromatógrafo con detector de arreglo de diodos (DAD) marca DIONEX Ultimate 3000. Se empleó como muestra la fracción <10 kDa proveída gentilmente por el Grupo HTLV-1 del Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt-Universidad Peruana Cayetano Heredia, teniendo como patrón o control la apitoxina completa. Se evaluó si la fracción <10kDa contenía el péptido melitina y la enzima fosfolipasa (PLA2) empleando estándares comerciales como referencia.

#### **Condiciones de corrida cromatográfica**

Columna: Aeris PEPTIDE 2.6 µm XB-C18

Flujo: 0.5mL/min

Longitud de onda: 220 nm

Temperatura del horno: 30 °C

Fase móvil:

A: 0.1 por ciento de ácido trifluoroacético (TFA) en H<sub>2</sub>O

B: 0.1 por ciento de TFA en Acetonitrilo

Loop: 5 uL

Peso molecular: <10 kDa

Minuto	%A	%B
0	95	5
13	70	30
18	70	30
23	60	40
30	20	80
40	95	5

Las muestras fueron inyectadas directamente por triplicado. Las muestras con alta concentración fueron diluidas con agua tipo I.

### 3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados del conteo de células son expresados como la media  $\pm$  error estándar (SE). Se utilizó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) para la comparación de medias seguido de una prueba de Tukey para una comparación múltiple de medias con el programa Infostat, versión estudiantil 2017 y el programa RStudio (RStudio Team, 2015). Las diferencias con  $P < 0.05$  fueron consideradas estadísticamente significativas para los datos de los conteos y los de citometría.

La concentración inhibitoria media (CI50) se obtuvo realizando la regresión lineal Probit empleando el programa estadístico SPSS. La CI50 fue definida como la concentración de la droga necesaria para inhibir el 50 por ciento del crecimiento celular comparado con el crecimiento de las células control no tratadas (Franke *et al.*, 2012). Los gráficos de barras se realizaron empleando el programa Infostat, versión estudiantil 2017.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 4.1. CURVA DE CRECIMIENTO DE LA LÍNEA CELULAR K562

Se obtuvo la curva de crecimiento de la línea celular K562 (Figuras 8 y 9) haciendo el conteo del número de células vivas y muertas en cámara de Neubauer, utilizando el microscopio óptico, con un inóculo de 2 millones de células con más de 90 por ciento de viabilidad (Tabla 5).

Tabla 5. Curva de crecimiento de la línea celular K562

<b>Inóculo: 2 millones Hora: 3pm</b>	<b>Tiempo (h)</b>	<b>Total vivas</b>	<b>Viabilidad (%)</b>
8 am	16.5	5590000	91.2
11 am	19.5	5912500	96.5
1 pm	20.5	6252500	96.8
3 pm	22.5	9100000	94.8
5 pm	24.5	10000000	93.4
7 pm	26.5	10450000	94
10 am	41.5	11985000	97.2
12 m	43.5	12008000	93.8

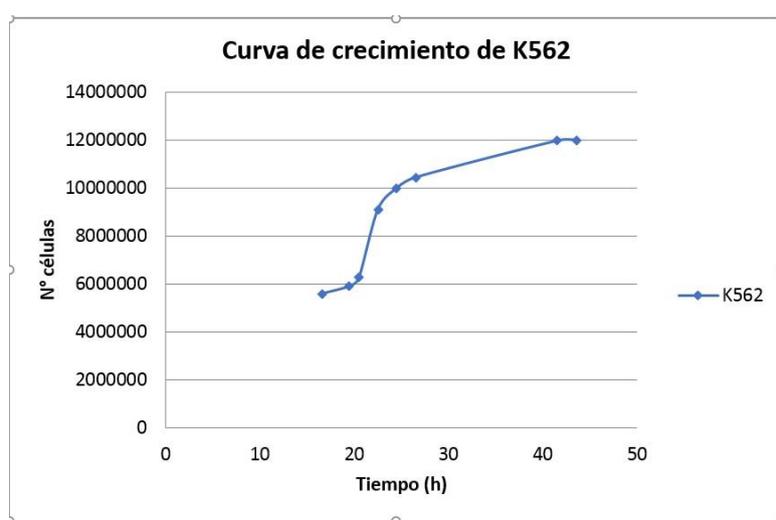


Figura 8. Curva de crecimiento de la línea celular K562.

En la Figura 8 se observa que el cultivo entra a fase logarítmica a las 20 horas de la siembra con un inóculo de 2 millones en frascos de 75 cm<sup>3</sup>.



Figura 9. Observación al microscopio invertido de la línea celular K562. Células cultivadas en medio Iscove completo en frasco de 75 cm<sup>2</sup>, observadas a un aumento de 20X

## 4.2. EFECTO DE LA FRACCIÓN <10 kDa EN LA LÍNEAS CELULARES

### 4.2.1. K562

Se realizaron los conteos (ANEXO 3 y 4) de las células K562 (Figuras 10 y 11) tratadas con las concentraciones de 0.25, 1, 5 y 10 µg/mL, con la fracción <10 kDa además de un control que no contenía la fracción.

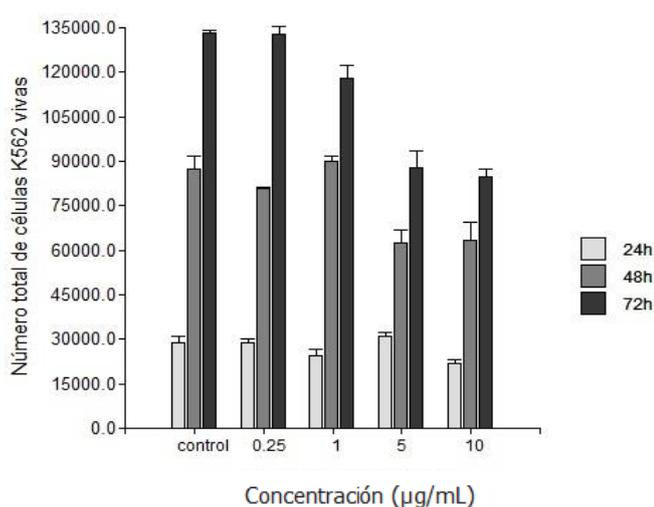


Figura 10. Disminución del conteo total de células K562 cultivadas por 24h, 48h y 72h con 0 (control), 0.25, 1, 5 y 10 µg/mL de la fracción <10 kDa de la apitoxina. Las barras muestran la media del número de células vivas de 3 repeticiones. Las barras muestran la media ± error estándar.

Se realizaron los análisis estadísticos de los datos (ANEXO 7 y 8). Los datos muestran distribución normal y homogeneidad de varianzas, por lo que se realizó la comparación de medias ANOVA y la comparación múltiple de medias con la prueba Tukey (ANEXO 8). A las 24h se observó diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y el control con un  $\alpha=0.05$ , con un p-valor de 0.0495 (Tabla 6, ANEXO 8).

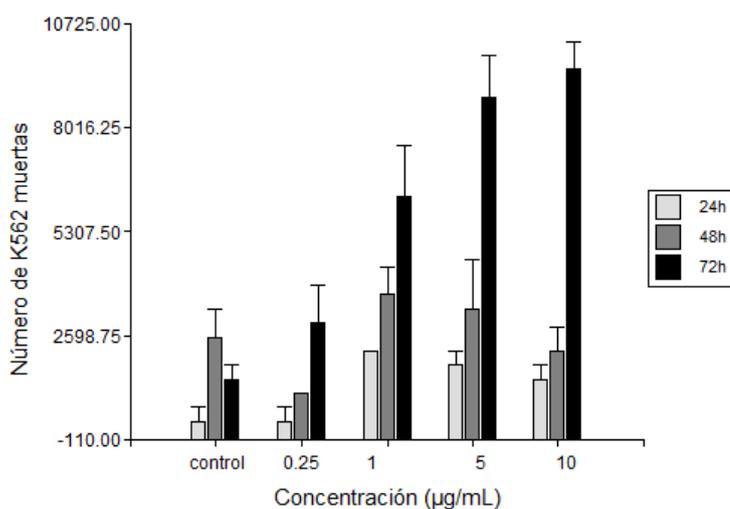


Figura 11. Incremento de muerte de las células K562 cultivadas por 24h, 48h y 72h con 0 (control), 0.25, 1, 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de la fracción <math><10 \text{ kDa}</math> de la apitoxina. Las barras muestran la media de 3 repeticiones  $\pm$  error estándar

Tabla 6. Resumen de la prueba Tukey para los datos de la K562

	Comparación	Pr(> t )		Comparación	Pr(> t )		Comparación	Pr(> t )
	<b>24h</b>	0.25 - control		1.0000	<b>48h</b>		0.25 - control	0.75539
1 - control		0.3410	1 - control	0.9890		1 - control	0.1030	
5 - control		0.8544	5 - control	0.00777 **		5 - control	<0.001***	
10 - control		0.0495 *	10 - control	0.01040 *		10 - control	<0.001***	

Signif. codes: 0 '\*\*\*\*' 0.001 '\*\*\*' 0.01 '\*\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

A las 48h, el análisis de comparación múltiple de medias con la prueba Tukey (Tabla 6 y ANEXO 8) indica que existe una diferencia estadísticamente significativa ( $\alpha=0.05$ ) entre el control y los tratamientos de 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  con p-valor: 0.00777 y 0.01040, respectivamente relacionado al total de células **K562 vivos**. Esta tendencia a la disminución del total de células es directamente proporcional a la concentración (Figuras 10 y 11).

A las 72h, se observa (Figuras 10 y 11) una marcada disminución del conteo total de células K562 con el aumento de la concentración de la fracción <math><10 \text{ kDa}</math> de la apitoxina de *Apis*

*mellifera*. Sin embargo, la comparación múltiple de medias mediante la prueba Tukey (Tabla 6, ANEXO 8) indica que las concentraciones de 5 y 10  $\mu\text{g/mL}$  muestran una diferencia significativa con el control con un p-valor para ambos pares de comparaciones de  $<0.001$ .

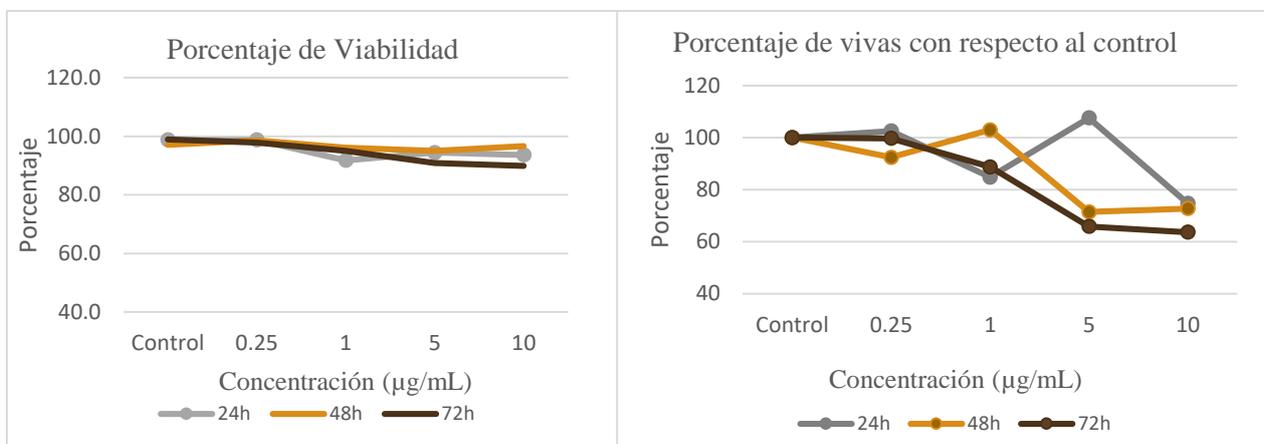


Figura 12. Viabilidad de las células K562 cultivadas por 24h, 48h y 72h con 0 (control), 0.25, 1, 5 y 10  $\mu\text{g/mL}$  de la fracción  $<10$  kDa de la apitoxina (izquierda). Viabilidad con respecto al control luego del tratamiento con la fracción  $<10$  kDa (derecha). Se emplearon los datos porcentuales para realizar las gráficas.

Por otro lado, la viabilidad (Figura 12) marca una ligera tendencia a disminuir cuando se emplean mayores concentraciones (10  $\mu\text{g/mL}$ ). A pesar de ello, no es menor del 80 por ciento debido a que las células que mueren ya no se evidencian al microscopio, se forman los cuerpos apoptóticos y luego no se pueden contar. En la Figura 11, se graficaron el total de células muertas y se observa que el número total de células tiende a incrementar a mayor concentración en comparación con el control. Finalmente, se encontró que la CI50 para las células K562 fue de 9.1  $\mu\text{g/mL}$ .

#### 4.2.2. MT-2

Se realizaron los conteos (ANEXO 5 y 6) de las células MT-2 (Figura 13) tratadas con las concentraciones de 1, 5, 10, 15 y 20  $\mu\text{g/mL}$ , con la fracción  $<10$  kDa además de un control que no contenía la fracción. Se realizaron los análisis estadísticos de los datos (ANEXO 9 y 10), luego de evaluar si cumplen con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, se realizó el ANOVA y la comparación múltiple de medias con la prueba Tukey (ANEXO 10)..



Figura 13. Observación al microscopio invertido de la línea celular MT-2 formando racimos a 80X.

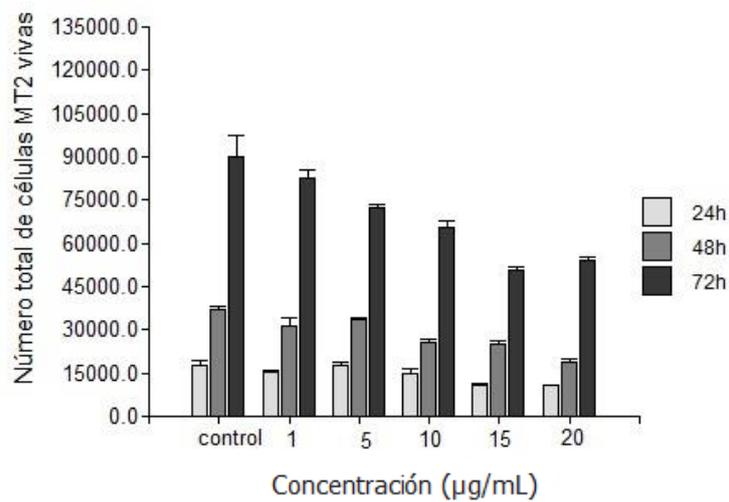


Figura 14. Disminución del total de células MT-2 cultivadas por 24h, 48h y 72h con 0 (control), 1, 5, 10, 15 y 20  $\mu\text{g/mL}$  de la fracción  $<10$  kDa. Se han graficado el número de células MT-2 vivas (3 repeticiones), las barras muestran la media  $\pm$  error estándar

A las 24h (Figura 14 y 15) se observa que la disminución del conteo de células vivas con respecto al control es estadísticamente significativa ( $\alpha=0.05$ ) (Tabla 7, ANEXO 10) para las concentraciones de 15 y 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  con datos de p-valor de 0.0268 y 0.0269, respectivamente.

Tabla 7. Resumen de la prueba Tukey para los datos de la MT-2

	Comparación	Pr(> t )		Comparación	Pr(> t )		Comparación	Pr(> t )
	24h	1-control		0.8395	48h		1-control	0.13146
5-control		1.0000	5-control	0.53928		5-control	0.02499 *	
10-control		0.6313	10-control	0.00181 **		10-control	0.00207 **	
15-control		0.0268 *	15-control	0.00142 **		15-control	< 0.001 ***	
20-control		0.0269 *	20-control	< 0.001 ***		20-control	< 0.001 ***	

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

A las 48h, en los tratamientos con las concentraciones de 10, 15 y 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se observa diferencias estadísticamente significativas con respecto al control sobre el conteo total de células vivas con p-valor de 0.00179, 0.00142 y < 0.001, respectivamente (Tabla 7 y ANEXO 10).

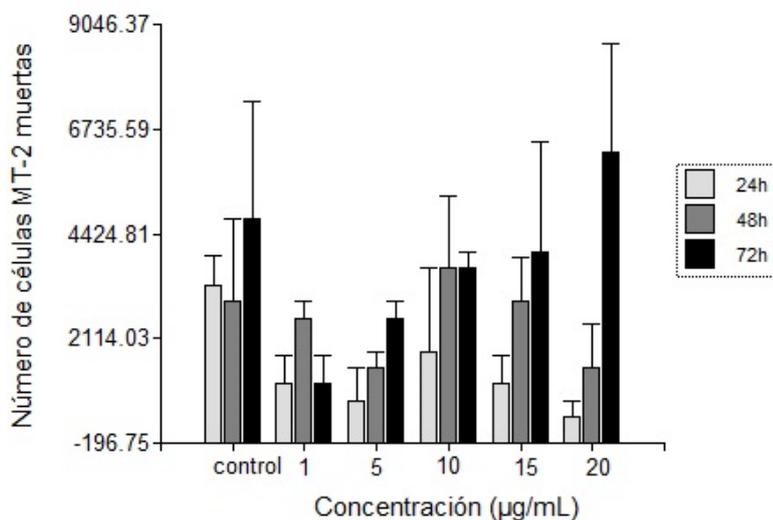


Figura 15. Incremento de la muerte de células MT-2 expuestas a la fracción <10 kDa a las 24h, 48h y 72h. Las barras muestran la media de 3 repeticiones  $\pm$  error estándar.

A las 72h, en los tratamientos con las concentraciones de 5, 10, 15 y 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se observa diferencias estadísticamente significativas con respecto al control sobre el conteo total de

células vivas MT-2 con p-valor de 0.02499, 0.00207, < 0.001 y < 0.001, respectivamente (Tabla 7 y ANEXO 10).

Por otro lado, la viabilidad (Figura 16) marca una tendencia a disminuir cuando se emplean mayores concentraciones (10, 15 y 20  $\mu\text{g/mL}$ ). Sin embargo, no es menor del 85 por ciento debido a que las células que mueren ya no se evidencian al microscopio, se forman los cuerpos apoptóticos y luego la célula se disgrega.

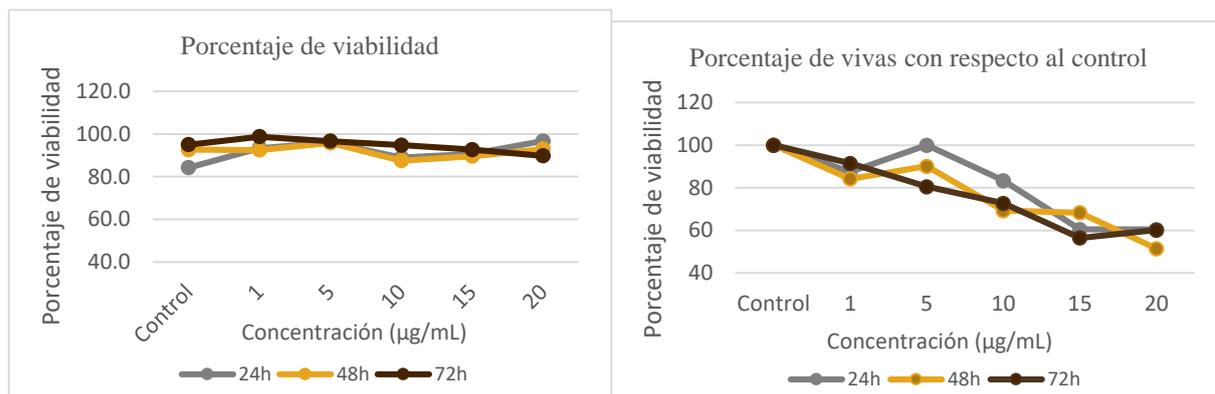


Figura 16. Viabilidad en porcentaje de las células MT-2 expuestas a 1, 5, 10, 15 y 20  $\mu\text{g/mL}$  de la fracción <10 kDa a las 24h, 48h y 72h (izquierda). Porcentaje de células MT-2 vivas con respecto al control luego del tratamiento con la fracción <10 kDa (derecha).

También se graficó el porcentaje de células vivas con respecto al control (Figura 16), observándose una disminución en los tratamientos con mayor concentración. En la Figura 15, se observa que el número total de células muertas tiende a aumentar cuando se incrementa la concentración de la fracción <10 kDa, en comparación con el control. También se observó que en los tratamientos con mayor concentración de la fracción (15 y 20  $\mu\text{g/mL}$ ) las células se mostraban más deformes.

Por otro lado, se encontró que la concentración inhibitoria media (CI50) es de 33.7  $\mu\text{g/mL}$  después de 72h de tratamiento para las células MT-2 tratadas con la fracción <10 kDa de la apitoxina.

En este estudio, se observó que en los tiempos evaluados (24h, 48h y 72h) el total de células fue inversamente proporcional a la concentración de la fracción empleada y al tiempo de incubación, esto podría deberse a una inhibición de la proliferación como lo reportaron Liu *et al.* (2002), Son *et al.* (2006) y Park *et al.* (2011). Asimismo, se ha observado que se

requiere la misma concentración de la fracción <10 kDa de la apitoxina de *Apis mellifera* para causar una disminución significativa ( $\alpha=0.05$ ) sobre la proliferación de las células K562 y MT-2 (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Los valores de CI50 indican que la fracción <10 kDa es más citotóxica para las células K562, células no infectadas con el virus HTLV-1, que para las MT-2. Estos resultados indican que las células infectadas con HTLV-1 son más resistentes a los estímulos proapoptóticos, en comparación con las células no infectadas como lo reportaron Taylor *et al.* (2008).

Según Garza (1990), la utilización de líneas celulares en la realización de pruebas de toxicidad *in vitro* permite evaluar un número grande de células y diferenciar los compuestos altamente citotóxicos de los de baja toxicidad, así como disminuir el número de animales empleados en las pruebas de toxicidad *in vivo*. Sin embargo, si se quiere utilizar los datos de toxicidad *in vitro* para predecir la toxicidad *in vivo* se debe considerar la farmacocinética y biodisponibilidad de los compuestos evaluados. Así mismo, Garza (1990) indica que si se requiere conocer la posible actividad selectiva de un compuesto se debe considerar la utilización de un cultivo celular primario.

### **4.3.EVALUACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE CASPASAS EN LAS LÍNEAS CELULARES**

#### **4.3.1. K562**

Se realizó la estandarización del fluoróforo para la detección de las caspasas-3/7 y se observaron al microscopio de fluorescencia las células K562 incubadas con 4  $\mu\text{M}$  (Figura 17A) y 8  $\mu\text{M}$  (Figura 17C) del trazador.

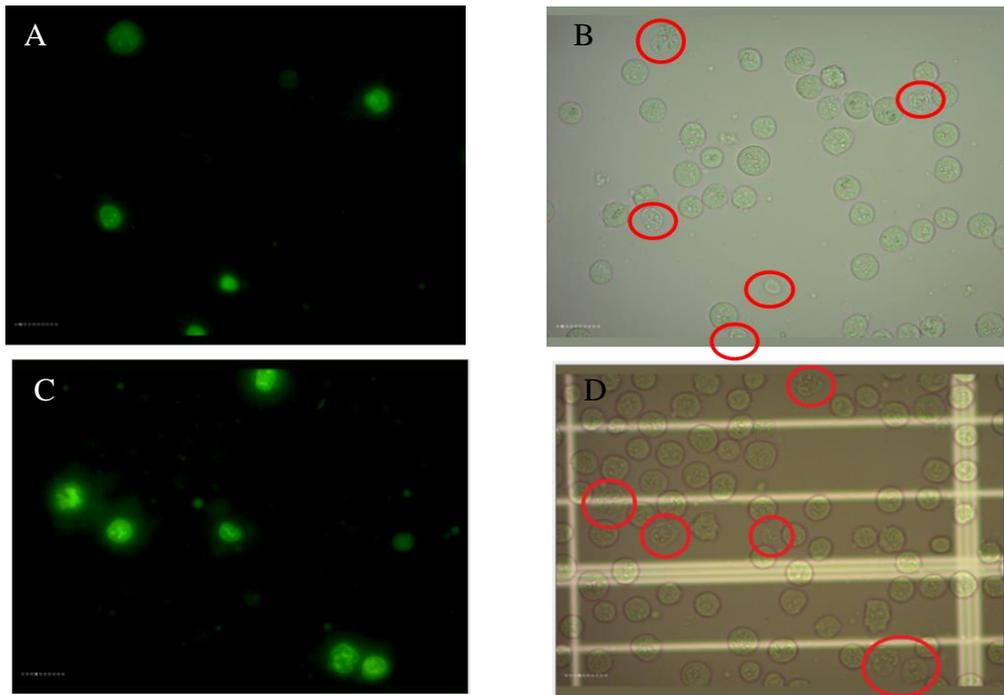


Figura 17. Observación al microscopio de fluorescencia de las células K562 vivas y apoptóticas. A y C) Células apoptóticas marcadas con el fluoróforo para la detección de las caspasas-3/7. B y D) Las células apoptóticas se muestran encerradas en una circunferencia roja.

Luego del tratamiento de las células K562 con las concentraciones de 0.25, 1, 5 y 10  $\mu\text{g/mL}$  de la fracción  $<10$  kDa por 72h, se cosecharon las células y se trataron con los fluoróforos caspase-3/7 para la detección de las caspasas-3/7 y con SYTOX para la detección de las células muertas. La citometría se les realizó a los tratamientos con las concentraciones de 1 y 5  $\mu\text{g/mL}$  y al control.

La Figura 18 y 19 muestran los histogramas de la citometría de flujo de las células K562 tratadas con el fluoróforo para detectar las caspasas presentes en cada tratamiento. La información en X representa la intensidad de fluorescencia e Y el número de células que emiten cada intensidad. En la Figura 18 se observan 2 grupos de picos, los de mayor intensidad de caspasas a la derecha con menor cantidad de células contadas; y los de menor intensidad a la izquierda que son caspasas negativas, con mayor cantidad de células contadas. Se observa que la intensidad de la señal de caspasas aumenta con la concentración de la fracción  $<10$  kDa empleada, por lo tanto, hay mayor número de células apoptóticas, (Figura 18 y 19), siendo mayor en el tratamiento con 5  $\mu\text{g/mL}$ . Se encontraron diferencias

estadísticamente significativas ( $\alpha= 0.05$ ) entre el control y el tratamiento de 5  $\mu\text{g/mL}$  (ANEXO 11).

Las Figuras 20 y 21 muestran los histogramas y la gráfica de barras, respectivamente, de las células incubadas con SYTOX. Hay diferencias estadísticamente significativas entre el control y el tratamiento de 5  $\mu\text{g/mL}$  para la evaluación de muerte celular de la línea celular K562 con SYTOX por citometría (ANEXO 11).

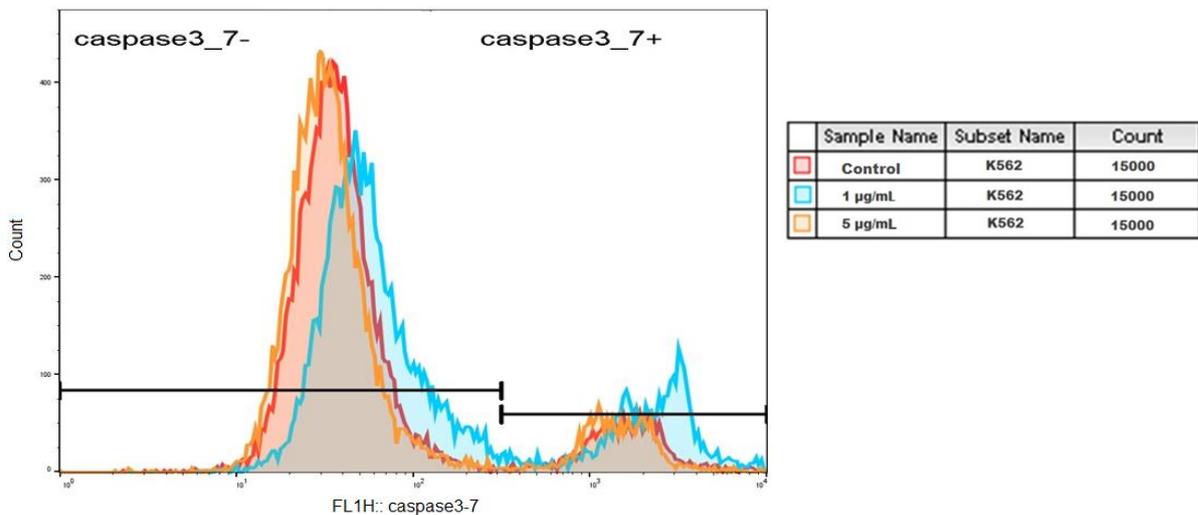


Figura 18. Detección por citometría de flujo de las células K562 apoptóticas. El histograma muestra el aumento de la apoptosis a mayor concentración de la fracción  $<10$  kDa. Los picos de la derecha representan las células apoptóticas y los de la izquierda, las células vivas. Rojo: control, celeste: 1  $\mu\text{g/mL}$ , anaranjado: 5  $\mu\text{g/mL}$ .

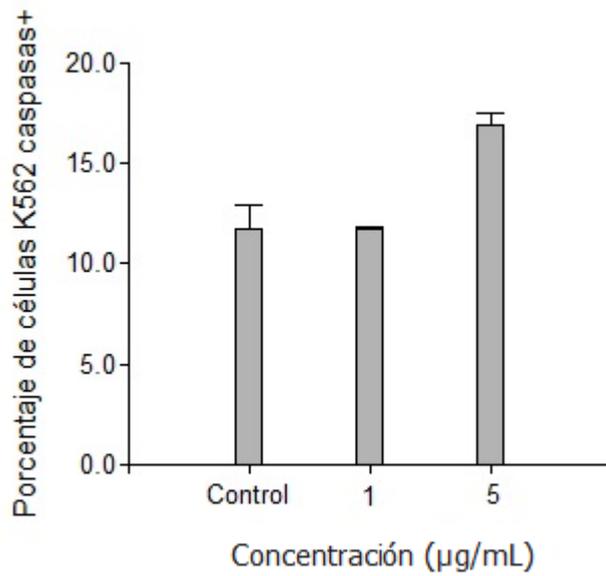


Figura 19. Porcentaje de células K562 apoptóticas identificadas mediante citometría de flujo usando el fluoróforo caspase-3/7. Las barras muestran el aumento de la apoptosis a mayor concentración de la fracción <10 kDa. La gráfica muestra la media de dos repeticiones  $\pm$  error estándar

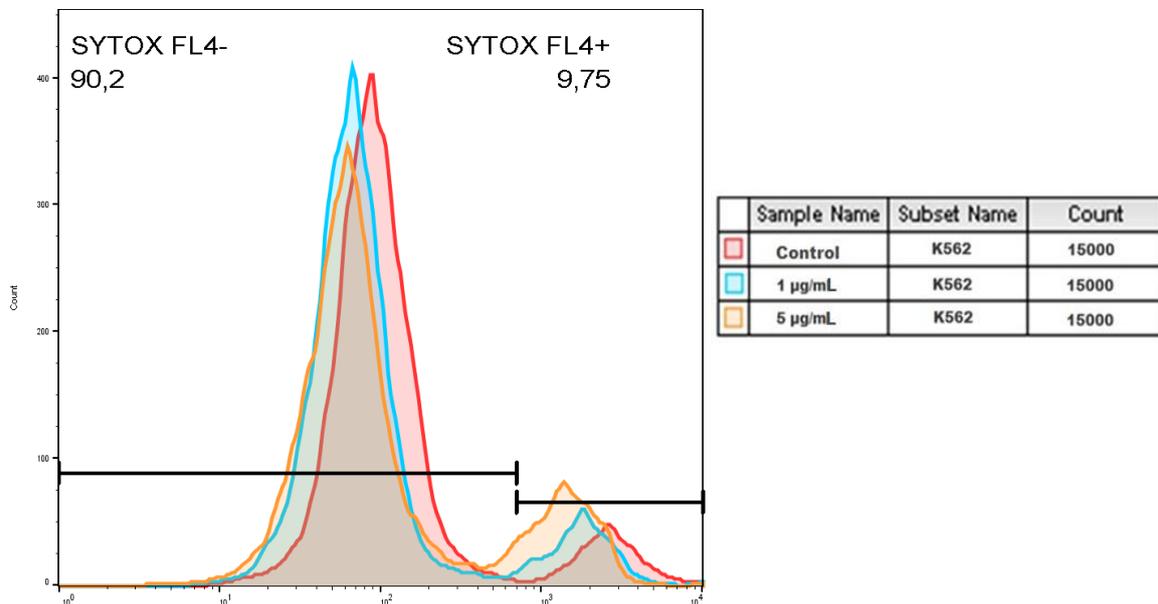


Figura 20. Detección por citometría de flujo de las células K562 muertas/no viables. Los picos de la derecha representan las células muertas y los de la izquierda, las células vivas. El histograma muestra el aumento de la cantidad de células muertas (pico más alto anaranjado) a mayor concentración de la fracción <10 kDa. Rojo: control, celeste: 1 µg/mL, anaranjado: 5 µg/mL.

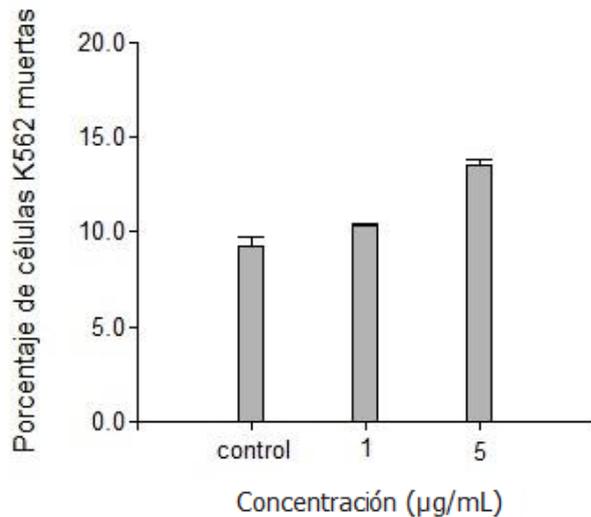


Figura 21. Porcentaje de células K562 muertas/no viables identificadas mediante citometría de flujo usando el fluoróforo SYTOX. La gráfica muestra la media de dos repeticiones  $\pm$  error estándar

#### 4.3.2. MT-2

Luego del tratamiento de las células MT-2 con las concentraciones de 1, 5, 10, 15 y 20  $\mu\text{g/mL}$  de la fracción  $<10$  kDa por 72h, se cosecharon las células y se trataron con los fluoróforos caspase-3/7 para la detección de las caspasas-3/7 y con SYTOX para la detección de las células muertas. La citometría se realizó con las células tratadas con 1, 5 y 10  $\mu\text{g/mL}$  al control y se realizaron 15000 adquisiciones.

En la Figura 22, se observa el histograma de la detección de las células caspasa-3/7+, a la izquierda se observan los picos de las células vivas y a la derecha, las células caspasa-3/7+. La línea verde, de 10  $\mu\text{g/mL}$ , se muestra más elevada, indicando una mayor cantidad de células con caspasas activadas.

En la Figura 23, se observa que a las concentraciones de 1 y 5 y 10  $\mu\text{g/mL}$  de la fracción  $<10$  kDa de la apitoxina hay un incremento del número de células apoptóticas con respecto al control. Pero, hay diferencias estadísticamente significativas entre el control y los tratamientos con concentraciones de 5 y 10  $\mu\text{g/mL}$  (ANEXO 12 y Figura 22),

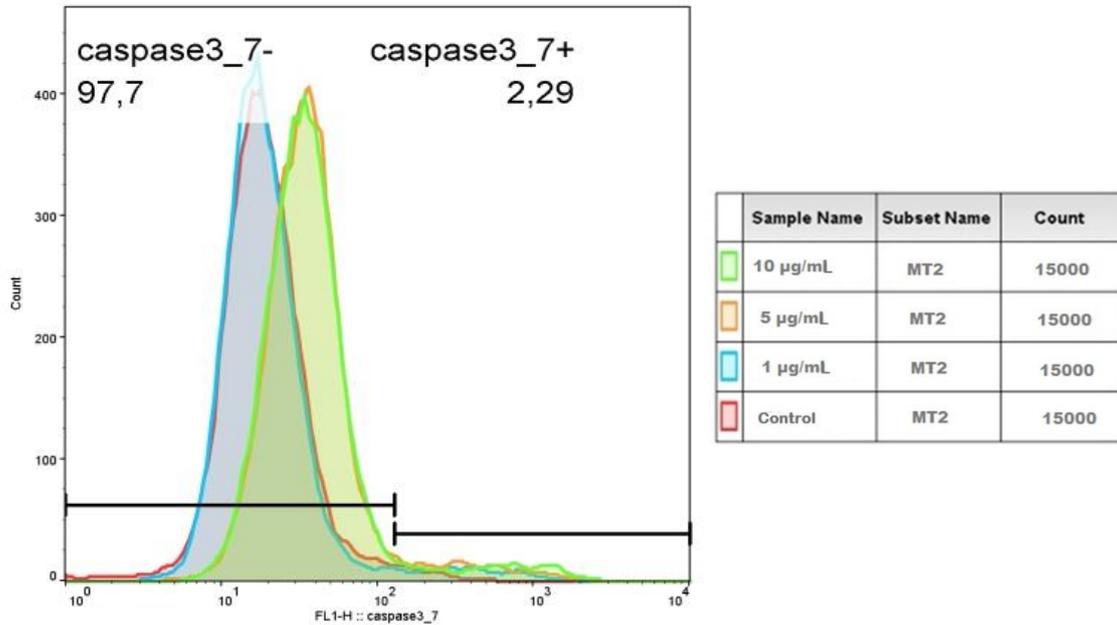


Figura 22. Detección por citometría de flujo de las células MT-2 apoptóticas. Los histogramas muestran un ligero aumento de la apoptosis a mayor concentración de la fracción <10 kDa empleada. Rojo: control, celeste: 1 µg/mL, anaranjado: 5 µg/mL y verde: 10 µg/mL.

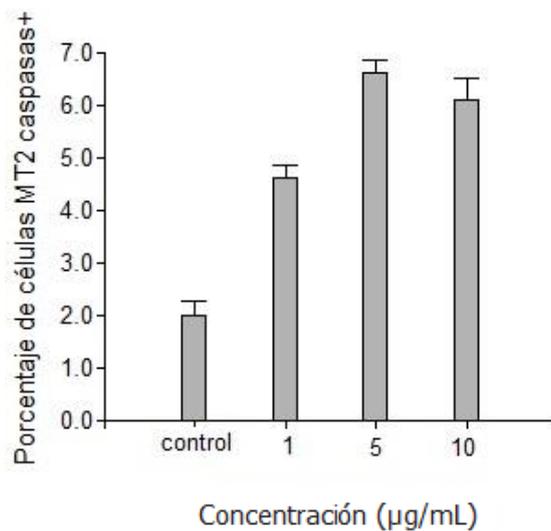


Figura 23. Porcentaje de células MT-2 apoptóticas. La gráfica muestra la media de dos repeticiones  $\pm$  error estándar

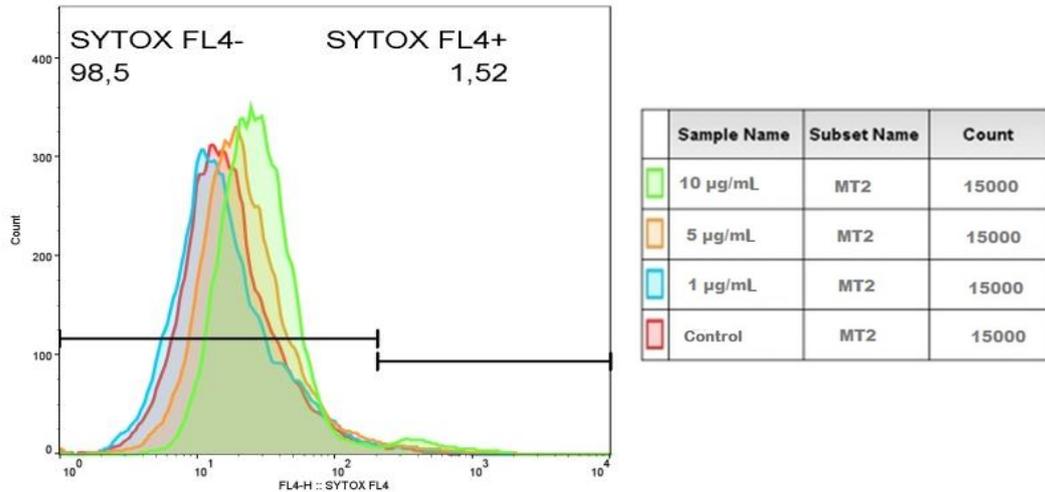


Figura 24. Detección por citometría de flujo de las células MT-2 muertas. Los histogramas muestran un aumento del número de células muertas a mayor concentración de la fracción. Rojo: control, celeste: 1 µg/mL, anaranjado: 5 µg/mL y verde: 10 µg/mL.

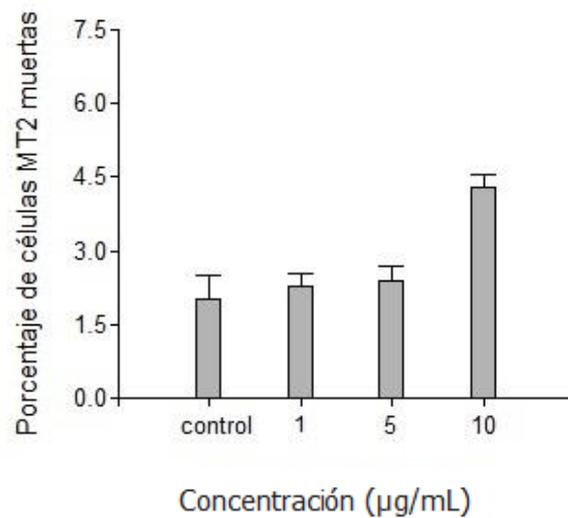


Figura 25. Porcentaje de células MT-2 muertas marcadas con el fluoróforo SYTOX. Las gráficas muestran los resultados de dos repeticiones  $\pm$  error estándar

Las Figuras 24 y 25 muestran los histogramas y la gráfica de barras, respectivamente, de las células MT-2 tratadas con SYTOX. Se observa que la cantidad de células muertas se incrementa a mayor concentración de la fracción <10 kDa de la apitoxina (pico verde de la derecha) con diferencias estadísticamente significativas entre el control y el tratamiento de 10 µg/mL.

La disminución del número de células con respecto al control podría deberse a la activación de la muerte celular apoptótica mediante la activación de la ruta de las caspasas, probablemente, a través de la supresión de la activación de la actividad del factor NF- $\kappa$ B que es una molécula de señalización importante involucrada en la regulación de la proliferación celular y la muerte celular apoptótica como habrían reportado Morotti *et al.* (2006), Son *et al.* (2006) y Park *et al.* (2011). Por otro lado, Xin Liu *et al.* (2002) reportaron que la disminución de la proliferación podría deberse a un efecto citostático por inducción del arresto celular en G1 causando la muerte celular apoptótica.

#### 4.4. CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA APITOXINA

Se realizó la cuantificación de la melitina presente en la fracción <10 kDa de la apitoxina de *Apis mellifera* por medio de la cromatografía líquida UHPLC. Para la cuantificación de la melitina y la fosfolipasa A2 se empleó una curva estándar de 5 puntos con concentraciones de 12.5 ppm, 25, 50, 100 y 200 ppm para la melitina y la fosfolipasa (ANEXO 13) de modo que se determinen sus respectivas absorbancias y las ecuaciones por regresión lineal.

Tabla 8. Resultado de la cuantificación de las muestras por UHPLC

Muestra	Melitina (ppm= $\mu$ g/mL)	PLA2 (ppm= $\mu$ g/mL)
Apitoxina completa	3073	3839
<10	17.4	nd

nd: no detectado

La muestra de la fracción <10 kDa empleada para la presente tesis tenía un contenido total de proteínas de 1200 ppm (1200  $\mu$ g/mL), cuantificado por fluorometría, empleando el fluorómetro Qubit. De este total, 17.4 ppm corresponden a la melitina (Tabla 8), cuantificada por UHPLC, con un tiempo de retención de 28.7 min (Figura 27). La melitina representa un 1.45 por ciento de las proteínas totales cuantificadas por fluorometría, aproximadamente. Por otro lado, no se encontró presencia de fosfolipasa como si se encontró en la apitoxina completa (Tabla 8 y Figura 28). Esto significaría que se ha filtrado correctamente la apitoxina para obtener una fracción <10 kDa, ya que la fosfolipasa del veneno de abeja de *Apis mellifera* tiene un peso molecular de 14.5 kDa (Sigma, EEUU).

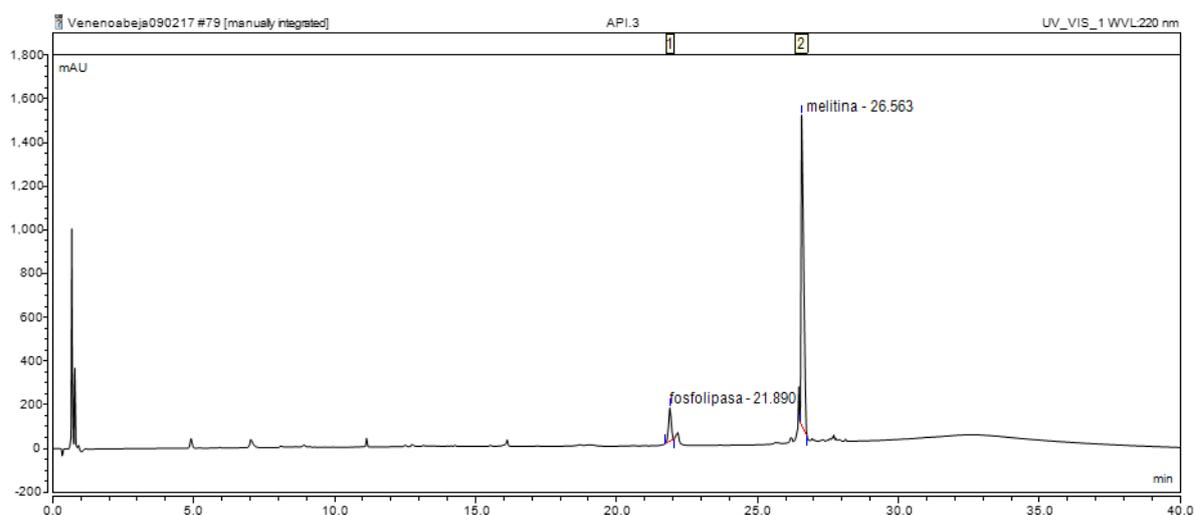


Figura 26. Cromatograma UHPLC de la apitoxina completa de *Apis mellifera*.

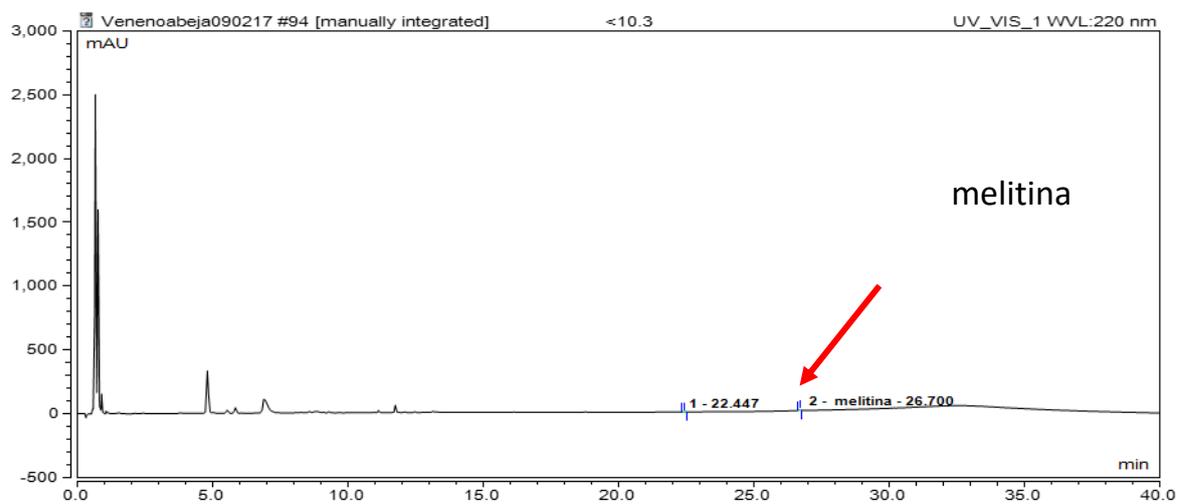


Figura 27. Cromatograma UHPLC de la fracción <10 kDa de la apitoxina de *Apis mellifera*.

Tabla 9. Concentración de melitina en cada tratamiento evaluado

<b>Concentración (µg/mL)</b>	
<b>Proteínas totales</b>	<b>Melitina</b>
0.25	0.003625
1	0.0145
5	0.0725
10	0.145
15	0.2175
20	0.29

El efecto de disminución que la fracción <10 kDa tiene sobre el total de células con respecto al control podría deberse a la presencia del péptido melitina lo cual coincide con estudios previos reportados por Marcos *et al.* (1995), González-Rodríguez *et al.* (2005), Son *et al.* (2006), Gajski y Garaj-Vrhovac, (2013). Es probable que exista sinergia con otros compuestos presentes en la fracción <10 kDa y que no han sido caracterizados en este trabajo, pero que han sido reportados por Pineda-Guerra *et al.*(2016) y Hider *et al.* (1988) ya que la concentración de la melitina en los tratamientos es baja (Tabla 9) con respecto a la concentración de 2.5 µg/mL empleada por Park *et al.* (2011) o de 0.8 µg/mL empleada por Son *et al.* (2006).

## V. CONCLUSIONES

Sobre la base de los resultados presentados en este estudio se concluye que:

1. La disminución del número de células vivas tuvo una relación directamente proporcional a la concentración de la fracción <10 kDa de la apitoxina de *Apis mellifera* en las líneas celulares MT-2 (con virus) y K562 (sin virus), Observándose que el número promedio de células vivas K562 tratadas con la concentración de 10 µg/mL representa el 63.6 por ciento del total de células vivas promedio del control. Del mismo modo, el número promedio de células vivas MT-2 tratadas con la concentración de 10 µg/mL representa el 60.2 por ciento del total de células vivas promedio del control. Determinándose que la citotoxicidad de la fracción <10 kDa es mayor para las células K562 que para las MT-2.
2. La fracción <10 kDa tiene un efecto más tóxico sobre las células MT-2, ya que al tercer y cuarto día de observación al microscopio había más células MT-2 deformadas.
3. La disminución del total de células vivasse debería a la muerte celular por activación de la ruta de las caspasas (activación de la apoptosis) y es directamente proporcional a la concentración empleada ya que a mayor concentración de la fracción <10 kDa se observó una mayor disminución del número de células e incremento de la apoptosis por detección del incremento de la concentración de las caspasas 3/7
4. En la fracción <10 kDa se encontró poca cantidad de melitina, posiblemente monómeros. Por lo que la disminución del conteo de células vivas podría deberse a los compuestos que están presentes en la fracción y no han sido caracterizados.

## **VI. RECOMENDACIONES**

A partir de los resultados obtenidos en el presente estudio se recomienda:

- Evaluar y comparar si la apitoxina completa procedente de los apiarios y la melitina comercial tienen el mismo efecto que la fracción <10 kDa sobre la disminución de las células vivas K562 y MT-2.
- Realizar los ensayos de citometría para la detección de la activación de caspasas todos los días de incubación con todas las concentraciones evaluadas para verificar si todos los días se presenta el mismo patrón de comportamiento (mayor presencia de caspasa-3/7+ en las células de los tratamientos de mayor concentración).

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbas, AK; Lichtman, AH; Pillai, Sh. 2012. Inmunología celular y molecular. Séptima edición. Barcelona, España, Elsevier Saunders.
2. Alfaro, ME; Cuéllar, CG y González, AD. 2000. Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones. Revista del Instituto Nacional de Cancerología (Mex): 46(4).
3. Atalla, KM; Owayss, AA; Mohanny, KM. 2007. Antibacterial activities of bee venom, propolis and royal jelly produce by three honey bee, *Apis mellifera* L., hybrids reared in the same environmental conditions. Annals Of Agricultural Science, Moshtohor Journal 45: 895-902.
4. Belrose, G; Gross, A; Olindo, S; Lézin, A; Dueymes, M; Komla-Soukha, I; *et al.* 2011. Effects of valproate on Tax and HBZ expression in HTLV-1 and HAM/TSPT lymphocytes. Blood 118(9): 2483–91.
5. Best, I; López, G; Verdonck, K; González, E; Tipismana, M; Gotuzzo, E, *et al.* 2009. IFN- $\beta$  production in response to Tax 161-233, and frequency of CD4 + Foxp3+ and Lin-HLA-DRhigh CD123+ cells, discriminate HAM/TSP patients from asymptomatic HTLV-1-carriers in a Peruvian population. Immunology 128(1 PART 2).
6. Boutrin, MC; Foster, HA; Pentreath, VW. 2008. The effects of bee (*Apis mellifera*) venom phospholipase A2 on *Trypanosoma brucei brucei* and enterobacteria. Experimental parasitology 119(2): 246-251.
7. Chawla, G; Ranjan, Ch. 2016. Principle, Instrumentation, and Applications of UPLC: A Novel Technique of Liquid Chromatography. Open Chemistry Journal 3: 1-16.
8. Chen, YN; Li, KC; Li, Z; Shang, GW; Liu, DN; Lu, ZM; *et al.* 2006. Effects of bee venom peptidergic components on rat pain-related behaviors and inflammation. Neuroscience, 138(2): 631-640.

9. Cherniack, EP. 2010. Bugs as drugs, Part 1: insects. The new alternative medicine for the 21st century? *Alternative Medicine Review* 15: 124–135
10. Cho, S. G; Choi, EJ. 2002. Apoptotic signaling pathways: caspases and stress-activated protein kinases. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 35(1): 24-27.
11. Coffin, JM. 2015. The discovery of HTLV-1, the first pathogenic human retrovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 112(51):15525–15529
12. Cohen, GM. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326: 1 – 16
13. Cullen, SP; Martin, SJ. 2009. Caspase activation pathways: some recent progress. *Cell Death and Differentiation* 16: 935 - 938.
14. Dai, H; Meng, XW; Kaufmann, SH. (2016). BCL-2 Family, mitochondrial apoptosis, and beyond. *Cancer Translational Medicine* 2(1): 7-20.
15. da Mata, ÉCG; Mourão, CBF; Rangel, M; Schwartz, EF. 2017. Antiviral activity of animal venom peptides and related compounds. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 23(1): 3.
16. Duprez, L; Wirawan, E; Berghe, TV; Vandenabeele, P. 2009. Major cell death pathways at a glance. *Microbes and infection*, 11(13): 1050-1062.
17. Educacyl (s.f.). Anatomía de la abeja. Capítulo 3. Portal de Educación. Junta de Castilla y León, España. Consultado 12 dic de 2017.
18. Disponible en: [http://revistas.educa.jcyl.es/divergaceta/images/stories/oct11/03-anatomia\\_abeja.pdf](http://revistas.educa.jcyl.es/divergaceta/images/stories/oct11/03-anatomia_abeja.pdf)
19. Franke, NE; Niewerth, D; Assaraf, YG; Van Meerloo, J; Vojtekova, K; Van Zantwijk, CH; Schimmer, AD. 2012. Impaired bortezomib binding to mutant  $\beta 5$  subunit of the proteasome is the underlying basis for bortezomib resistance in leukemia cells. Supplemental material. *Leukemia* 26(4): 757.
20. Garza Ocañas, L. (1990). Citotoxicidad in vitro: estudio del potencial de diversas líneas celulares en la evaluación de toxicidad de sustancias (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León)

21. Gajski, G; Garaj-Vrhovac, V. 2013. Melittin: A lytic peptide with anticancer properties. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 36(2): 697–705.
22. Gessain, A; Cassar, O. 2012. Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. *Frontiers in Microbiology*, 3:388.
23. Chawla, G; Ranjan, Ch. 2016. Principle, Instrumentation, and Applications of UPLC: A Novel Technique of Liquid Chromatography. *Open Chemistry Journal* (3):1-16.
24. González-Rodríguez, MÁ; Silva-Rojas, HV; Mascorro-Gallardo, JO. 2005. Ensayo *in vitro* del Péptido Antimicrobiano Melitina Contra Diferentes Bacterias Fitopatógenas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23(2).
25. Gotuzzo, E; González, E; Verdonck, K; Mayer, E; Ita, F; Clark, D. 2010. Veinte años de investigación sobre HTLV-1 y sus complicaciones médicas en el Perú: Perspectivas generales. *Acta Médica Peruana* 27(3): 196-203.
26. Green, DR. 1998. Apoptotic pathways: the roads to ruin (Minireview). *Cell* 94(6): 695-698.
27. Hider, R. C. (1988). Honeybee venom: a rich source of pharmacologically active peptides. *Endeavour*, 12(2), 60-65.
28. Hong, SJ; Rim, GS; Yang, HI; Yin, CS; Koh, HG; Jang, MH; et al. 2005. Bee venom induces apoptosis through caspase-3 activation in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis. *Toxicon* 46(1): 39-45.
29. Hood, JL; Jallouk, AP; Campbell, N; Ratner, L; Wickline, SA. 2013. Cytolytic nanoparticles attenuate HIV-1 infectivity. *Antiviral therapy* 18(1): 95-103.
30. Hulo, C; de Castro, E; Masson, P; Bougueleret, L; Bairoch, A; Xenarios, I; Le Mercier, P. 2011. *Nucleic Acids Res.* Jan;39(Database issue):D576-82.
31. Hwang, DS; Kim, SK; Bae, H. 2015. Therapeutic effects of bee venom on immunological and neurological diseases. *Toxins* 7(7): 2413-2421.

32. Jang, MH; Shin, MC; LimS;, Han, SM; Park, HJ; Shin, I; et al. (2003). Bee venom induces apoptosis and inhibits expression of cyclooxygenase-2 mRNA in human lung cancer cell line NCI-H1299. *Journal of pharmacological sciences* 91(2): 95-104.
33. Jordán, J. 2003. Apoptosis: muerte celular programada. *Offarm*, 22(6): 100-106.
34. Klein, E; Ben-Bassat H; Neumann, H; Ralph, P; Zeuthen, J; Polliack, A; Vánky, F. 1976. Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia. *International Journal of Cancer* 18(4): 421-31.
35. Korsmeyer, SJ. (1999). BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer research*, 59(7 Supplement): 1693-1700.
36. Koster, DA; Palle, K; Bot, ES; Bjornsti, MA; Dekker, NH. 2007. Antitumour drugs impede DNA uncoiling by topoisomerase I. *Nature* 448(7150): 213-217.
37. Krammer, PH; Arnold, R; Lavrik, IN. 2007. Life and death in peripheral T cells. *Nat Rev Immunol* 7: 532–542.
38. Hider, R. C. (1988). Honeybee venom: a rich source of pharmacologically active peptides. *Endeavour* 12(2): 60-65.
39. Pineda-Guerra, Y; Betancur-Echeverri, J; Pedroza-Díaz, J.; Delgado-Trejos, E.; Rothlisberger, S. (2016). Análisis proteómico del veneno de la abeja africanizada: comparación de métodos de extracción. *Acta Biológica Colombiana* 21(3): 619-626.
40. Lakhani, SA; Masud, A; Kuida, K; Porter, GA; Booth, CJ; Mehal, WZ; Flavell, RA. 2006. Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science* 311(5762): 847-851.
41. Lavrik, IN; Krammer, PH. 2012. Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC. *Cell Death and Differentiation*, 19(1): 36-41.
42. Lee, JD; Park, HJ; Chae, Y; Lim, S. 2005. An overview of bee venom acupuncture in the treatment of arthritis. *Evidence-based complementary and alternative medicine* 2(1): 79-84.

43. Liu, X; Chen, D; Xie, L; Zhang, R. 2002. Effect of honey bee venom on proliferation of K1735M2 mouse melanoma cells in-vitro and growth of murine B16 melanomas in-vivo. *Journal of pharmacy and pharmacology* 54(8): 1083-1089.
44. Marcos, JF; Beachy, RN; Houghten, RA; Blondelle, SE; Perez-Paya, E. 1995. Inhibition of a plant virus infection by analogs of melittin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92(26): 12466-12469.
45. Martínez Pavón, KDR. (2011). Estudio de factibilidad para la creación de una empresa productora de crema apitoxina (analgésico natural) y su comercialización en el mercado ecuatoriano. Tesis Ing. Quito, Ecuador. UPS. p.11.
46. Moon, DO; Park, SY; Heo, MS; Kim, KC; Park, C; Ko, WS; Choi, WY; Kim, GY. 2006. Key regulators in bee venom-induced apoptosis are Bcl-2 and caspase-3 in human leukemic U937 cells through downregulation of ERK and Akt. *International immunopharmacology* 6(12): 1796-1807.
47. Morotti, A; Cilloni, D; Pautasso, M; Messa, F; Arruga, F; Defilippi, I; Tauli, R. 2006. NF- $\kappa$ B inhibition as a strategy to enhance etoposide-induced apoptosis in K562 cell line. *American journal of hematology* 81(12): 938-945.
48. Naval, J; Marzo, I; Anel, A. 2004. Mecanismos celulares de muerte celular programada. Reunión Nacional de la AEHH (46). Congreso Nacional de la SETH (20, 2004, Valencia, España). Simposios. Valencia, Madrid. 89 (1): 127-132. Consultado 19 nov. 2017. Disponible en: <http://www.seth.es/index.php/congresos/congresos-seth/ponencias-y-simposios-seth/2004.html>
49. Nicot, C; Mahieux, R; Takemoto, S; Franchini, G. 2000. Bcl-XL is up-regulated by HTLV-I and HTLV-II in vitro and in ex vivo ATLL samples. *Blood* 96(1): 275-281.
50. Nováková, L.; Matysová, L.; Solich, P. (2006). Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. *Talanta* 68(3): 908-918.
51. Park, MH; Choi, MS; Kwak, DH; Oh, KW; Yoon, DY; Han, SB; *et al.* 2011. Anti-cancer effect of bee venom in prostate cancer cells through activation of caspase pathway via inactivation of NF- $\kappa$ B. *The Prostate* 71(8): 801-812.

52. Penaloza, CL; Lin, L; Lockshin, RA; Zakeri, Z. 2006. Cell death in development: shaping the embryo. *Histochemistry Cell Biology* 126(2): 149 - 158.
53. Preta, G; Fadeel, B. 2012. AIF and Scythe (Bat3) regulate phosphatidylserine exposure and macrophage clearance of cells undergoing Fas (APO-1)-mediated apoptosis. *PLoS one* 7(10): e47328.
54. Proietti, FA; Carneiro-Proietti, ABF; Catalan-Soares, BC; Murphy, EL. 2005. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene* 24(39): 6058.
55. Ramírez-García, M.; Márquez-González, H.; Barranco-Lampón, G.; López-Aguilar, J. (2014). Bcl-2: su papel en el ciclo celular, apoptosis y cáncer. *El Residente* 9(3): 84-94.
56. Rivera-Caldón, CC; López-Valencia, D; Zamora-Bastidas, TO; Dueñas-Cuéllar, RA; Mora-Obando, DL. 2017. Infección por el virus linfotrópico humano de células T tipo 1 (HTLV-1) y paraparesia espástica. Avances y diagnóstico 35 años después de su descubrimiento. *Iatreia* 30(2): 146.
57. Rello Varona, S. (2008). Mecanismos de muerte celular inducidos por nuevas terapias antitumorales. *Disertación doctoral. Repositorio UAM.*
58. Romano, P; Manniello, A; Aresu, O; Armento, M; Cesaro, M; Parodi, B. 2009. Cell Line Data Base: structure and recent improvements towards molecular authentication of human cell lines. *Nucleic Acids Research* 37 (Database issue): D925-D932. Consultado 20 nov 2017. Disponible en: DOI: doi:10.1093/nar/gkn730; PMID: 18927105
59. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA Disponible en: <http://www.rstudio.com/>.
60. Saucedo-de-la-Llata, E.; López-Reyes, J.; Moraga-Sánchez, M.; Romeu-Sarrió, A.; Carmona-Ruiz, I. (2017). Fragmentación del ADN espermático: situación actual. *Ginecología y obstetricia de México* 85(03): 164-189.
61. Sharif-Askari, E.; Alam, A.; Rhéaume, E.; Beresford, P.; Scotto, C.; Sharma, K.. (2001). Direct cleavage of the human DNA fragmentation factor-45 by granzyme B induces

- caspase-activated DNase release and DNA fragmentation. *The EMBO journal* 20 (12): 3101-3113.
62. Silva, J; Monge-Fuentes, V; Gomes, F; Lopes, K; Anjos, L; Campos, G; *et al.* 2015. Pharmacological Alternatives for the Treatment of Neurodegenerative Disorders: Wasp and Bee Venoms and Their Components as New Neuroactive Tools. *Toxins (Basel)* 7(8):3179–209.
63. Son, DJ; Ha, SJ; Song, HS; Lim, Y; Yun, YP; Lee, JW; *et al.* 2006. Melittin inhibits vascular smooth muscle cell proliferation through induction of apoptosis via suppression of nuclear factor- $\kappa$ B and Akt activation and enhancement of apoptotic protein expression. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 317(2): 627-634.
64. Staker, BL; Hjerrild, K; Feese, MD; Behnke, CA; Burgin, AB; Stewart, L. 2002. The mechanism of topoisomerase I poisoning by a camptothecin analog. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(24): 15387-15392.
65. Slee, EA; Adrain, C; Martin, SJ. 2001. Executioner caspase-3, -6, and-7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *Journal of biological Chemistry* 276(10): 7320-7326.
66. Strober, W. 2015. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current Protocols in Immunology* 111: A3.B.1-A3.B.3. doi: 10.1002/0471142735.ima03bs111
67. Susin, SA; Lorenzo, HK; Zamzami, N; Marzo, I; Snow, BE, Brothers, GM; Mangion, J; Jacotot, E; Constantini, P; Loeffler, M; Larochette, N; Goodlett, DR; Aebersold, R; Siderovski, DP; Penninger, JM; Kroemer, G. 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397: 441-446.
68. Swartz, ME. 2005. UPLC<sup>TM</sup>: An Introduction and Review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 28:1253-1263.
69. Taylor, JM; Nicot, C. 2008. HTLV-1 and apoptosis: role in cellular transformation and recent advances in therapeutic approaches. *Apoptosis* 13(6): 733.

70. Thompson, CB. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of diseases. *Science* 267:1456- 1462.
71. Vega-Manriquez, X.; López-Vidal, Y.; Gutiérrez-Pabello, J. (2008). Inducción de apoptosis por especies del género *Mycobacterium*. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 50(1-2): 48-58.
72. Villalonga, JM. (2008). *Fisiopatología de la isquemia cerebral* (Vol. 1). Marge Books.
73. Visscher, PK; Vetter, RS; Camazine, S. 1996. Removing bee stings. *The Lancet* 348(9023): 301-302.
74. Zurita, S; Costa, C; Watts, D; Indacochea, S; Campos, P; Sánchez, J; Gotuzzo, E. 1997. Prevalence of human retroviral infection in Quillabamba and Cuzco, Peru: a new endemic area for human T cell lymphotropic virus type 1. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* (56: 1): 561–5.

## **VIII. ANEXOS**

## ANEXO 1: Descriopreservación y aclimatación de una línea celular

Se prepara el medio Iscove completo empleando medio Iscove y suplementándolo con 10 por ciento de suero fetal bovino, 1 por ciento de glutamina y 0.1 por ciento de beta-mercaptoetanol. A los tubos con 6.3 millones de células, luego de sacarlos del tanque de nitrógeno líquido se les coloca en un recipiente con agua a 37°C y se tapa para luego, en la cabina de flujo laminar, agregar con una pipeta un poco de medio Iscove completo a las células para luego retirar todo el contenido y colocarlo en un tubo de 15 mL que contiene 9 mL de medio Iscove completo. Se centrifuga a 500 rcf por 15 minutos. Se desecha el sobrenadante y se suspende el *pellet* en 1 mL de medio Iscove completo para luego contar las células vivas y muertas y determinar el porcentaje de viabilidad empleando la cámara de Neubauer y el colorante azul de tripán.

$$\%viabilidad = \frac{N^{\circ} \text{ células vivas} \times 100}{(N^{\circ} \text{ células vivas} + N^{\circ} \text{ células muertas})}$$

Se siembran todas las células en un frasco de cultivo de 25 cm<sup>3</sup> (*flask*) que contiene 10 mL de medio Iscove completo y se incuban a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 por ciento de CO<sub>2</sub>. En los dos días subsiguientes se observan las células en el microscopio invertido para ver si hay incremento del número de células. A partir del tercer día se realiza el conteo celular diariamente y la determinación del porcentaje de viabilidad. Al cuarto día se retira 5 mL de medio con células de la parte superficial de la botella de cultivo que es donde se encuentran las células muertas y los detritos, y se agrega 5 mL de medio Iscove completo recién preparado.

## **ANEXO 2: Procedimiento de obtención de la fracción <10 kDa de la apitoxina**

- Se pesó 1g de apitoxina colectada de las colmenas y se agregó 50 mL de agua apirógena estéril y se disolvió bien.
- Se filtró los 50 mL con filtro pirinola (Merck Millipore) de 5.0  $\mu\text{m}$ /25-28 mm para remover restos (como polvo, cera, pelos sensoriales y polen).
- Se recogió la apitoxina en 50 mL de agua estéril. Seguidamente, se filtró con pirinola (Merck Millipore) de 0.45  $\mu\text{m}$  y 0.2  $\mu\text{m}$ /13-15mm para eliminar cualquier resto fino.
- Se recogió la apitoxina microfiltrada en un nuevo tubo de 50mL estéril.
- Se guardó cuantificó la concentración de proteínas por fluorometría Qubit (Invitrogen, EEUU).
- Se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$

### **Segregación con filtro para centrifuga con un valor de corte de 10 kDa**

- Se descongeló a temperatura ambiente.
- Se colocó 15 mL de la apitoxina sobre un dispositivo para el filtrado tipo Amicon Ultra-15 10K (Centrifugal filter Devices UFC901024).
- Se colocó el dispositivo en una centrífuga refrigerada Eppendorf (modelo 5810) a 3900 g por 30 min.
- Se recolectó la fracción menor de 10 kDa.
- Se guardó en alícuotas.
- Se realizó la electroforesis Mini-PROTEAN tris-Tricine Precast gels (BIORAD 456-3063), empleando un Ladder: Precision Plus Protein™ Dual Xtra Prestained Protein Standards BIORAD#1610377
- Se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**ANEXO 3: Datos promedio del conteo de células K562 tratadas con la fracción <10 kDa**

A continuación, se detallan los promedios de 3 repeticiones de los datos obtenidos:

Concentración (µg/mL)	Nº promedio de células vivas contadas			Promedio del total calculado de células vivas en el pozo			Nº promedio de células muertas contadas			Promedio del total calculado de células muertas en el pozo			Promedio del total calculado de células vivas y muertas contadas			Promedio del total calculado de células vivas y muertas en el pozo			Porcentaje de viabilidad promedio (%)		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
Control	26.3	79.3	121.0	28966.7	87266.7	133100.0	0.3	2.3	1.3	366.7	2566.7	1466.7	26.7	81.7	122.3	29333.3	89833.3	134566.7	98.9%	97.1%	98.9%
0.25	26.3	73.3	120.7	28966.7	80666.7	132733.3	0.3	1.0	2.7	366.7	1100.0	2933.3	26.7	74.3	123.3	29333.3	81766.7	135666.7	98.8%	98.7%	97.9%
1	22.3	81.7	107.3	24566.7	89833.3	118066.7	2.0	3.3	5.7	2200.0	3666.7	6233.3	24.3	85.0	113.0	26766.7	93500.0	124300.0	91.7%	96.1%	95.0%
5	28.3	56.7	79.7	31166.7	62333.3	87633.3	1.7	3.0	8.0	1833.3	3300.0	8800.0	30.0	59.7	87.7	33000.0	65633.3	96433.3	94.5%	95.2%	90.9%
10	19.7	57.7	77.0	21633.3	63433.3	84700.0	1.3	2.0	8.7	1466.7	2200.0	9533.3	21.0	59.7	85.7	23100.0	65633.3	94233.3	93.8%	96.8%	89.8%

#### **ANEXO 4: Coeficiente de variación y desviación estándar (K562)**

##### **Coeficiente de variación de los datos de cada tratamiento (programa Infostat)**

Concentración	Resumen	24h	48h	72h
Control	CV	11.60	8.58	1.43
0.25 µg/mL	CV	5.80	1.57	3.45
1 µg/mL	CV	15.72	3.74	6.34
5 µg/mL	CV	5.39	12.01	11.93
10 µg/mL	CV	10.58	16.11	5.66

##### **Desviación estándar de los datos de cada tratamiento (programa Infostat)**

Concentración	Resumen	24h	48h	72h
Control	D.E.	3360.56	7487.55	1905.26
0.25 µg/mL	D.E.	1680.28	1270.17	4579.67
1 µg/mL	D.E.	3863.07	3360.56	7487.55
5 µg/mL	D.E.	1680.28	7487.55	10454.82
10 µg/mL	D.E.	2289.83	10220.73	4794.79

**ANEXO 5: Datos promedio del conteo de células MT-2 tratadas con la fracción <10 kDa**

A continuación, se detallan los promedios de 3 repeticiones de los datos obtenidos:

Concentración (µg/mL)	N° promedio de células vivas contadas			Promedio del total calculado de células vivas en el pozo			N° promedio de células muertas contadas			Promedio del total calculado de células muertas en el pozo			Promedio del total calculado de células vivas y muertas contadas			Promedio del total calculado de células vivas y muertas en el pozo			%Viabilidad promedio		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
Control	16.0	33.7	82.0	17600.0	37033.3	90200.0	3.0	2.7	4.3	3300.0	2933.3	4766.7	19.0	36.3	83.7	20900.0	39966.7	94966.7	84.2	92.9	94.9
1	14.0	28.3	75.0	15400.0	31166.7	82500.0	1.0	2.3	1.0	1100.0	2566.7	1100.0	15.0	30.7	76.0	16500.0	33733.3	83600.0	93.7	92.4	98.6
5	16.0	30.3	66.0	17600.0	33366.7	72600.0	0.7	1.3	2.3	733.3	1466.7	2566.7	16.7	31.7	68.3	18333.3	34833.3	75166.7	96.7	95.8	96.6
10	13.3	23.3	59.7	14666.7	25666.7	65633.3	1.7	3.3	3.3	1833.3	3666.7	3666.7	15.0	26.7	63.0	16500.0	29333.3	69300.0	90.2	88.3	94.7
15	9.7	23.0	46.3	10633.3	25300.0	50966.7	1.0	2.7	3.7	1100.0	2933.3	4033.3	10.7	25.7	50.0	11733.3	28233.3	55000.0	91.2	90.0	93.1
20	9.7	17.3	49.3	10633.3	19066.7	54266.7	0.3	1.3	5.7	366.7	1466.7	6233.3	10.0	18.7	55.0	11000.0	20533.3	60500.0	96.7	93.2	90.0

## **ANEXO 6: Coeficiente de variación y desviación estándar (MT-2)**

### **Coeficiente de variación de los datos de cada tratamiento (programa Infostat)**

Concentración	Resumen	24h	48h	72h
Control	CV	18.75	4.54	13.74
1 µg/mL	CV	7.14	15.91	5.81
5 µg/mL	CV	10.83	5.04	1.52
10 µg/mL	CV	24.11	8.92	5.39
15 µg/mL	CV	15.80	7.53	3.30
20 µg/mL	CV	5.97	6.00	3.10

### **Desviación estándar de los datos de cada tratamiento (programa Infostat)**

Concentración	Resumen	24h	48h	72h
Control	D.E.	3300.00	1680.28	12396.37
1 µg/mL	D.E.	1100.00	4960.17	4794.79
5 µg/mL	D.E.	1905.26	1680.28	1100.00
10 µg/mL	D.E.	3536.01	2289.83	3536.01
15 µg/mL	D.E.	1680.28	1905.26	1680.28
20 µg/mL	D.E.	635.09	1144.92	1680.28

## ANEXO 7: Evaluación estadística de los datos de la línea celular K562

Primero se evaluó si cumple los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas

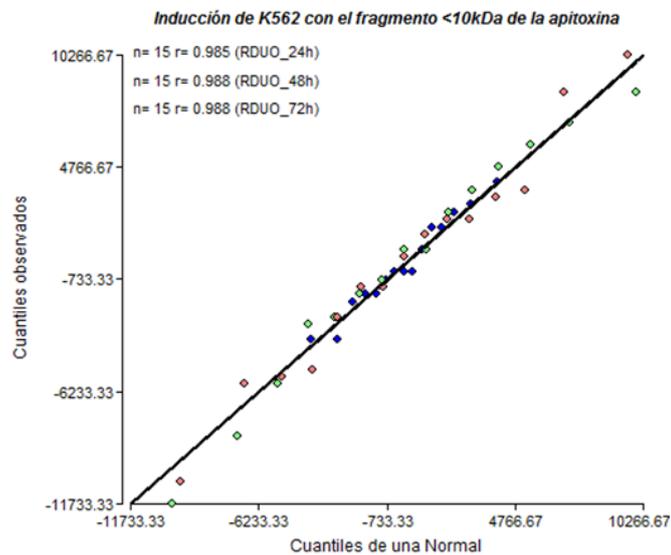
### EVALUACIÓN DE LA NORMALIDAD DE LOS DATOS

$H_0$ : Existe normalidad.

$H_1$ : No existe normalidad.

$\alpha=0.05$

### Q-Q plot (Infostat)



Como la dispersión de los valores residuales se aproximan a la recta de 45°, entonces podemos pensar en la existencia de normalidad.

### Prueba de normalidad de Shapiro Wilk (programa R Studio)

24h: p-valor = 0.6947

```
Shapiro-Wilk normality test
data: 24h
W = 0.96013, p-value = 0.6947
```

48h: p-valor = 0.8751

```
Shapiro-Wilk normality test
data: 48h
W = 0.97117, p-value = 0.8751
```

72h: p-valor = 0.9543

```
Shapiro-Wilk normality test
data: 72h
W = 0.97803, p-value = 0.9543
```

Como los p-valor son de 0.6947 (24h), 0.8751 (48h) y de 0.9543 (72h), valores mayores al alfa ( $\alpha=0.05$ ), entonces podemos decir que existe normalidad de los datos evaluados con la línea celular K562.

### Prueba Shapiro Wilks modificada (Infostat)

Shapiro-Wilks (modificado)					
Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO_24h	15	-1.4E-12	2302.38	0.94	0.5366
RDUO_48h	15	2.8E-12	5725.84	0.95	0.7477
RDUO_72h	15	5.3E-12	5515.69	0.97	0.9213

Como los p-valor son de 0.5366 (24h), 0.7477 (48h) y de 0.9213 (72h), valores mayores al alfa ( $\alpha=0.05$ ), entonces podemos decir que existe normalidad.

### EVALUACIÓN DE LA HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS

Se realizaron las dos pruebas siguientes:

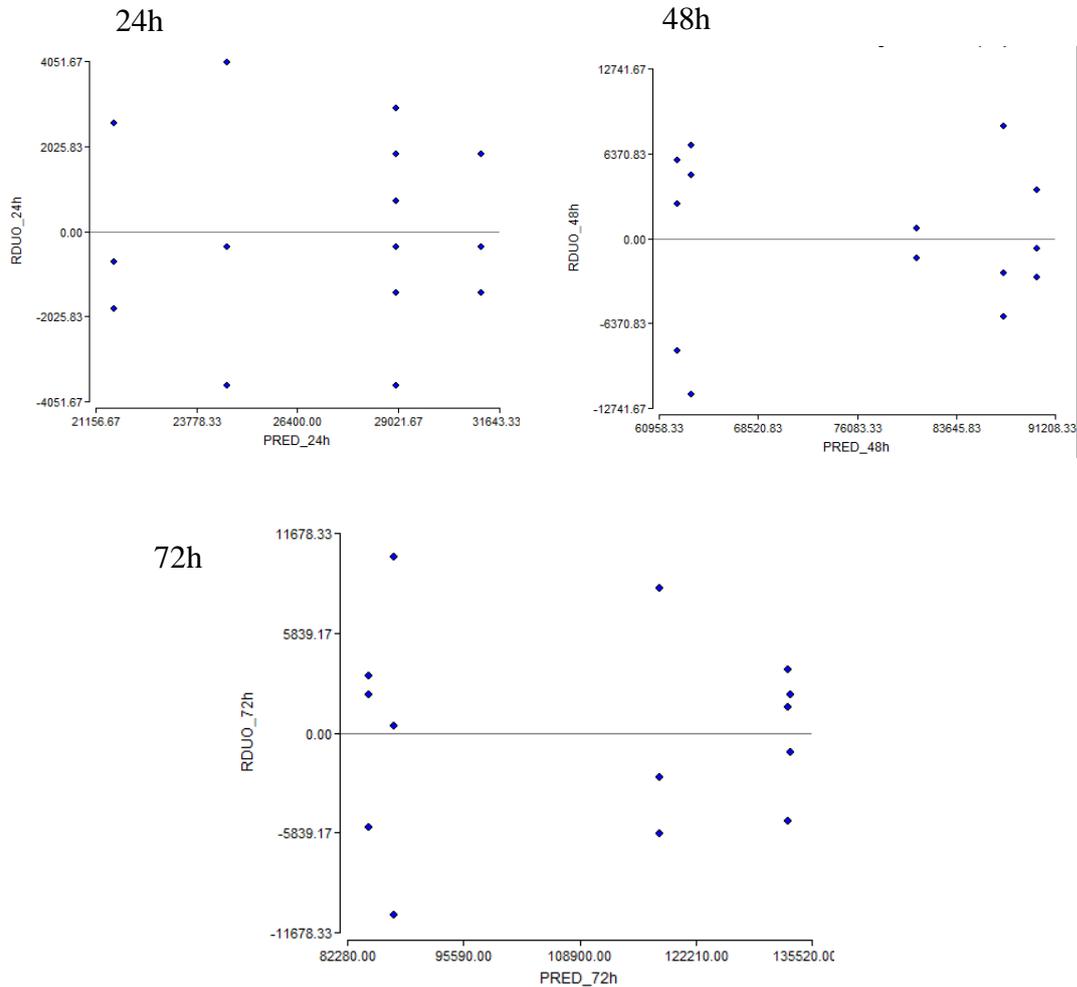
- Diagrama de Dispersión
- Prueba de Levene
- Prueba de Barlett

$H_0$ : existe homogeneidad de varianzas

$H_1$ : no existe homogeneidad de varianzas

$\alpha=0.05$

**Gráfico:** Se realizó un *Diagrama de dispersión*:



Se observa que respecto la línea de corte en «0» existe cierta simetría (espejo), con ello podemos decir que existe homogeneidad de varianzas de los datos evaluados con la línea celular K562.

**Prueba de Levene (homogeneidad de varianzas)**

RABS\_24h                      Levene

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	5592888.89	4	1398222.22	0.83	0.5358
concentracion	5592888.89	4	1398222.22	0.83	0.5358
Error	16850370.37	10	1685037.04		
Total	22443259.26	14			

RABS\_48h

Levene

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	90561777.78	4	22640444.44	3.48	0.0498
concentracion	90561777.78	4	22640444.44	3.48	0.0498
Error	64981481.48	10	6498148.15		
Total	155543259.26	14			

RABS\_72h

Levene

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	56144000.00	4	14036000.00	1.43	0.2948
concentracion	56144000.00	4	14036000.00	1.43	0.2948
Error	98413333.33	10	9841333.33		
Total	154557333.33	14			

### Prueba de Levene para la homogeneidad de varianzas (programa R Studio)

24h: p-valor = 0.7812

```
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
  Df F value Pr(>F)
group 4 0.4342 0.7812
      10
```

48h: p-valor = 0.7422

```
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
  Df F value Pr(>F)
group 4 0.492 0.7422
      10
```

72h: p-valor = 0.369

```
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
  Df F value Pr(>F)
group 4 0.734 0.5893
      10
```

Como el p-valor (24h= 0.7812; 48h=0.7422; 72h=0.369) es mayor que el alfa ( $\alpha=0.05$ ), entonces existe homogeneidad de varianzas de los datos obtenidos del tratamiento con la línea celular K562

## Prueba de homogeneidad de varianzas de Barlett (programa R Studio)

24h: p-valor = 0.7474

```
Bartlett test of homogeneity of variances
data: 24h by concentracion
Bartlett's K-squared = 1.9364, df = 4, p-value = 0.7474
```

48h: p-valor = 0.2083

```
Bartlett test of homogeneity of variances
data: 48h by concentracion
Bartlett's K-squared = 5.8799, df = 4, p-value = 0.2083
```

72h: p-valor = 0.369

```
Bartlett test of homogeneity of variances
data: X72h by concentracion
Bartlett's K-squared = 4.2836, df = 4, p-value = 0.369
```

Como el p-valor (24h= 0.7474; 48h=0.2083; 72h=0.369 es mayor que el alfa ( $\alpha=0.05$ ), entonces existe homogeneidad de varianzas de los datos obtenidos del tratamiento con la línea celular K562.

## ANEXO 7: Continuación

### ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)

Debido a que cumple con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas se realizó el análisis de varianza (ANOVA).

H<sub>0</sub>: Todas las concentraciones producen efectos similares sobre el número de células vivas de la línea células K562

H<sub>1</sub>: Al menos una concentración produce un efecto diferente sobre el número de células vivas de la línea células K562

### ANOVA (Programa Infostat)

24h

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
24h	15	0.71	0.59	10.07

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3345266666.67	4	836316666.67	6.04	0.0097
concentracion	3345266666.67	4	836316666.67	6.04	0.0097
Error	1383833333.33	10	138383333.33		
Total	4729100000.00	14			

72h

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
72h	15	0.94	0.92	5.87

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	125757358333.33	4	31439339583.33	39.59	<0.0001
concentracion	125757358333.33	4	31439339583.33	39.59	<0.0001
Error	7942000000.00	10	794200000.00		
Total	133699358333.33	14			

48h

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
48h	15	0.82	0.74	8.83

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	38166725000.00	4	9541681250.00	11.15	0.0010
concentracion	38166725000.00	4	9541681250.00	11.15	0.0010
Error	8558708333.33	10	855870833.33		
Total	46725433333.33	14			

Como los p-valor (24h: 0.0097, 48h: 0.0010; 72h: 0.0001) son menores que el alfa ( $\alpha=0.05$ ), entonces existe significancia para asegurar que al menos un tratamiento produce un efecto diferente sobre el número de células vivas K562. Por lo tanto, es posible hacer una comparación múltiple de medias (prueba de Tukey) entre los distintos tratamientos (concentraciones).

## ANEXO 7: Continuación

**ANOVA (Programa R Studio):** Se corroboró los resultados del ANOVA con el programa R

24h:  $\text{Pr}( > F ) = 0.00973 **$

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
concentracion	4	3.345e+09	836316667	6.043	0.00973 **
Residuals	10	1.384e+09	138383333		
---					
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					

48h:  $\text{Pr}( > F ) = 0.00105 **$

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
concentracion	4	3.817e+10	9.542e+09	11.15	0.00105 **
Residuals	10	8.559e+09	8.559e+08		
---					
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					

72h:  $\text{Pr}( > F ) = 4.22e-06 ***$

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
concentracion	4	1.258e+11	3.144e+10	39.59	4.22e-06 ***
Residuals	10	7.942e+09	7.942e+08		
---					
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					

Como los p-valor (24h: 0.00973, 48h: 0.00105, 72h: 4.22e-06) son menores que el alfa (0.05). Se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alterna. Al menos un tratamiento (concentración) produce un efecto diferente en el conteo de las células K562. Por lo tanto, es posible hacer una comparación múltiple de medias (Tukey) entre los distintos tratamientos (concentraciones).

## ANEXO 8: Comparación múltiple de medias (K562)

### PRUEBA TUKEY (PROGRAMA INFOSTAT)

24h

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=7320.38747

Error: 7421333.3333 gl: 10

Concentración	Medias	n	E.E.	
5 µg/mL	31166.67	3	1572.82	A
0.25 µg/mL	28966.67	3	1572.82	A
Control	28966.67	3	1572.82	A
1 µg/mL	24566.67	3	1572.82	A B
10 µg/mL	21633.33	3	1572.82	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

48h

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=18205.23496

Error: 45899333.3333 gl: 10

Concentración	Medias	n	E.E.	
1 µg/mL	89833.33	3	3911.49	A
Control	87266.67	3	3911.49	A
0.25 µg/mL	80666.67	3	3911.49	A B
10 µg/mL	63433.33	3	3911.49	B C
5 µg/mL	62333.33	3	3911.49	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

72h

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=17537.07327

Error: 42592000.0000 gl: 10

Concentración	Medias	n	E.E.	
Control	133100.00	3	3767.93	A
0.25 µg/mL	132733.33	3	3767.93	A
1 µg/mL	118066.67	3	3767.93	A
5 µg/mL	87633.33	3	3767.93	B
10 µg/mL	84700.00	3	3767.93	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

No hay diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento de 0.25 y 1 µg/mL y el control en ninguno de los tres puntos de tiempo evaluados (24h, 48h y 72h). A las 48h, existen diferencias significativas entre el control y los tratamientos de 5 y 10 µg/mL. A las 72h, existen diferencias significativas entre el control y los tratamientos de 5 µg/mL y 10 µg/mL con un nivel de significancia de 0.05. Estos resultados se contrastaron con los obtenidos en el programa R para determinar el p-valor de estas diferencias.

## ANEXO 8: Continuación

### COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE MEDIAS - PRUEBA TUKEY (PROGRAMA R STUDIO)

24h

```
Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: lm(formula = X24h ~ concentracion, data = x)

Linear Hypotheses:

            Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
0.25 µg/mL - Control == 0  1.296e-12  2.224e+03  0.000  1.0000
1 µg/mL - Control == 0    -4.400e+03  2.224e+03 -1.978  0.3410
5 µg/mL - Control == 0    2.200e+03  2.224e+03  0.989  0.8544
10 µg/mL - Control == 0   -7.333e+03  2.224e+03 -3.297  0.0495 *
1 µg/mL - 0.25 µg/mL == 0 -4.400e+03  2.224e+03 -1.978  0.3410
5 µg/mL - 0.25 µg/mL == 0  2.200e+03  2.224e+03  0.989  0.8544
10 µg/mL - 0.25 µg/mL == 0 -7.333e+03  2.224e+03 -3.297  0.0495 *
05 µg/mL - 1 µg/mL == 0    6.600e+03  2.224e+03  2.967  0.0825 .
10 µg/mL - 1 µg/mL == 0   -2.933e+03  2.224e+03 -1.319  0.6868
10 µg/mL - 5 µg/mL == 0   -9.533e+03  2.224e+03 -4.286  0.0109 *
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)
```

48h

```
Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: lm(formula = X48h ~ concentracion, data = x48)

Linear Hypotheses:

            Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
0.25 µg/mL - Control == 0   -6600     5532  -1.193  0.75535
1 µg/mL - Control == 0      2567     5532   0.464  0.98902
5 µg/mL - Control == 0    -24933     5532  -4.507  0.00777 **
10 µg/mL - Control == 0   -23833     5532  -4.309  0.01040 *
1 µg/mL - 0.25 µg/mL == 0   9167     5532   1.657  0.49781
5 µg/mL - 0.25 µg/mL == 0  -18333     5532  -3.314  0.04818 *
10 µg/mL - 0.25 µg/mL == 0 -17233     5532  -3.115  0.06555 .
05 µg/mL - 1 µg/mL == 0    -27500     5532  -4.971  0.00401 **
10 µg/mL - 1 µg/mL == 0    -26400     5532  -4.773  0.00530 **
10 µg/mL - 5 µg/mL == 0     1100     5532   0.199  0.99959
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)
```

72h

```
Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses
Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: lm(formula = X72h ~ concentracion, data = x72)

Linear Hypotheses:

```

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
0.25 µg/mL - Control == 0	-366.7	5328.7	-0.069	0.99999
1 µg/mL - Control == 0	-15033.3	5328.7	-2.821	0.10299
5 µg/mL - Control == 0	-45466.7	5328.7	-8.532	< 0.001 ***
10 µg/mL - Control == 0	-48400.0	5328.7	-9.083	< 0.001 ***
1 µg/mL - 0.25 µg/mL == 0	-14666.7	5328.7	-2.752	0.11444
5 µg/mL - 0.25 µg/mL == 0	-45100.0	5328.7	-8.464	< 0.001 ***
10 µg/mL - 0.25 µg/mL == 0	-48033.3	5328.7	-9.014	< 0.001 ***
5 µg/mL - 1 µg/mL == 0	-30433.3	5328.7	-5.711	0.00143 **
10 µg/mL - 1 µg/mL == 0	-33366.7	5328.7	-6.262	< 0.001 ***
10 µg/mL - 5 µg/mL == 0	-2933.3	5328.7	-0.550	0.97939

```
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)
```

No hay diferencias estadísticamente significativas entre el control y las concentraciones de 0.25 y 1 µg/mL de la fracción <10 kDa en ninguno de los tres puntos de tiempo evaluados. A las 24h existe una diferencia estadísticamente significativa entre el control y el tratamiento de 10 µg/mL ( $\alpha=0.05$ , p-valor=0.0495) sobre la el total de las células **K562** vivas.

A las 48h, existe una diferencia estadísticamente significativa entre el control y los tratamientos de 5 y 10 µg/mL ( $\alpha=0.05$ , p-valor=0.00777 y 0.01040, respectivamente.) sobre el total de células vivas **K562**.

A las 72h, existe una diferencia estadísticamente significativa entre el control y los tratamientos de 5 µg/mL (p-valor<0.001) y 10 µg/mL (p-valor<0.001) sobre el total de células vivas **K562**. Pero, no existe diferencia significativa entre los tratamientos 5 y 10 µg/mL (p-valor= 0.97939).

## ANEXO 9: Evaluación estadística de los datos de la línea celular MT-2

Primero se evaluó si cumplen los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas.

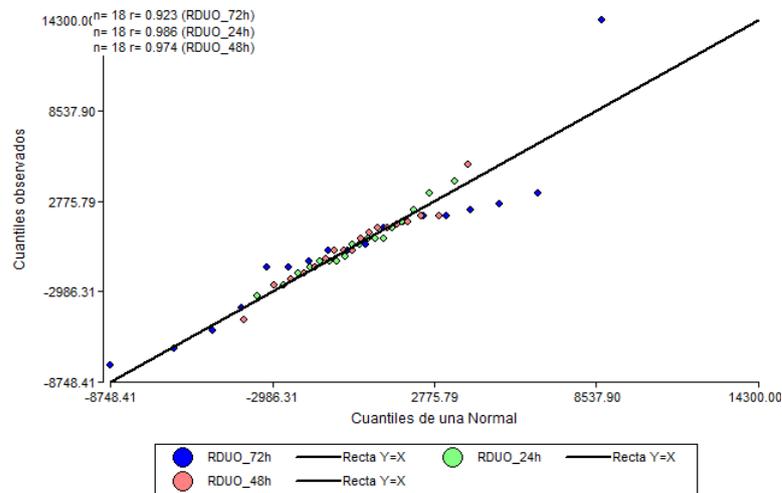
### EVALUACIÓN DE LA NORMALIDAD DE LOS DATOS

$H_0$ : Existe normalidad de los datos evaluados con la línea celular MT-2.

$H_1$ : No existe normalidad de los datos evaluados con la línea celular MT-2.

$\alpha=0.05$

#### Q-Q plot (programa Infostat)



Como la dispersión de los valores residuales a las 24h, 48h y 72h se aproximan a la recta de  $45^\circ$ , entonces podemos pensar en la existencia de normalidad.

#### Prueba Shapiro Wilks modificado (programa Infostat)

##### Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO_24h	18	0.00	1923.84	0.96	0.7882
RDUO_48h	18	0.00	2181.05	0.98	0.9715
RDUO_72h	18	1.4E-12	4802.21	0.90	0.1198

Como los p-valor son de 0.7882 (24h), 0.9715 (48h) y 0.1198 (72h) valores mayores al nivel de significancia alfa ( $\alpha=0.05$ ), entonces podemos decir que existe normalidad.

## ANEXO 9: Continuación

### EVALUACIÓN DE LA HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS – MT-2

Se realizaron las siguientes pruebas:

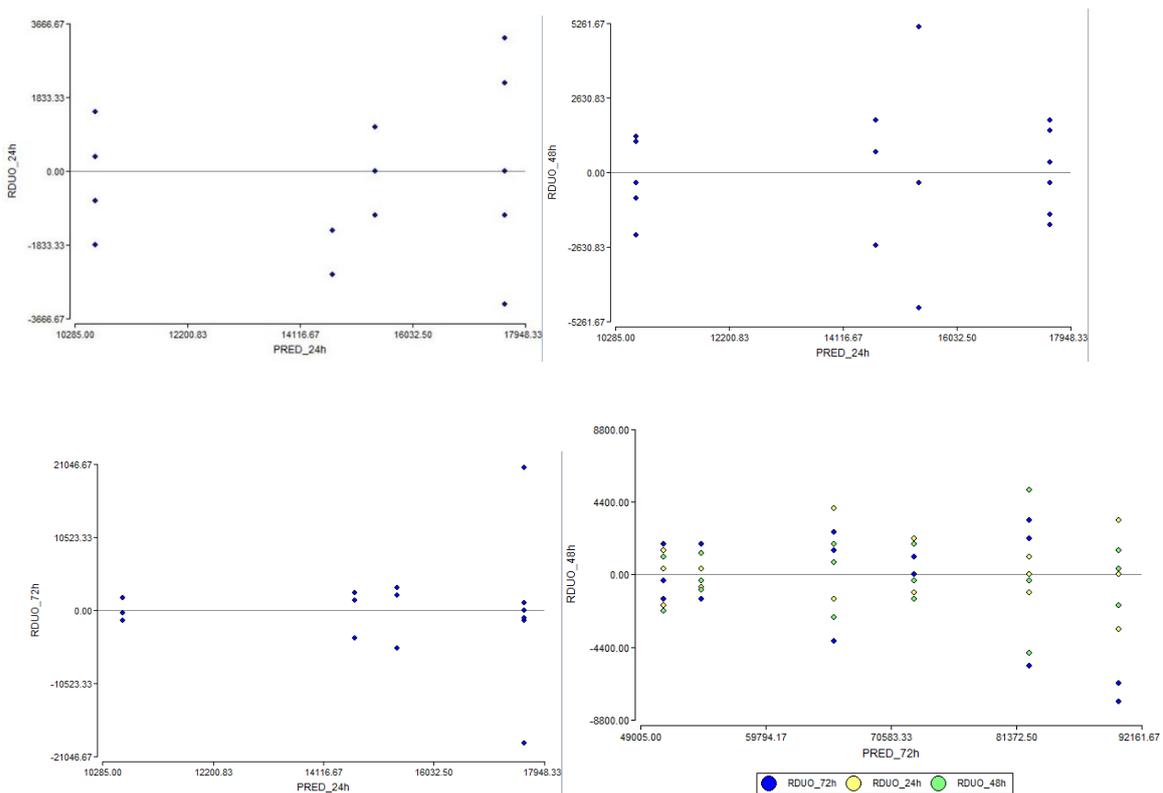
- Diagrama de Dispersión
- Prueba de Levene

H<sub>0</sub>: existe homogeneidad de varianzas

H<sub>1</sub>: no existe homogeneidad de varianzas

$\alpha=0.05$

**Gráfico:** Se realizó un *Diagrama de dispersión*:



Se observa que respecto la línea de corte en «0» existe cierta simetría (espejo), con ello podemos decir que existe homogeneidad de varianzas.

## ANEXO 9: Continuación

### Prueba de Levene para homogeneidad de varianzas (Infostat) - MT-2

RABS\_24h Levene

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	10755555.56	5	2151111.11	1.92	0.1645
Concentración	10755555.56	5	2151111.11	1.92	0.1645
Error	13444444.44	12	1120370.37		
Total	24200000.00	17			

RABS\_48h Levene

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	12525740.74	5	2505148.15	1.55	0.2457
Concentración	12525740.74	5	2505148.15	1.55	0.2457
Error	19337592.59	12	1611466.05		
Total	31863333.33	17			

RABS\_72h Levene

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	163484444.44	5	32696888.89	8.39	0.0013
Concentración	163484444.44	5	32696888.89	8.39	0.0013
Error	46786666.67	12	3898888.89		
Total	210271111.11	17			

### Prueba de Levene para homogeneidad de varianzas (R Studio) – MT-2

#### 24 h

```
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
  Df F value Pr(>F)
group 5 0.5864 0.7107
      12
```

#### 48h

```
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
  Df F value Pr(>F)
group 5 0.8581 0.5358
      12
```

#### 72h

```
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
  Df F value Pr(>F)
group 5 0.6609 0.6599
      12
```

Como el p-valor (24h= 0.7107; 48h=0.5358; 72h=0.6599) es mayor que el alfa ( $\alpha=0.05$ ), entonces se acepta la hipótesis nula, existe homogeneidad de varianzas.

## ANEXO 9: Continuación

### ANÁLISIS DE VARIANZA

H<sub>0</sub>: Todas las concentraciones producen efectos similares sobre el total de células vivas de la línea MT-2

H<sub>1</sub>: Al menos una concentración produce un efecto diferente sobre el total de células vivas de la línea célula MT-2

### ANOVA (Programa Infostat)

24h

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
24h	18	0.70	0.58	15.88

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	149771111.11	5	29954222.22	5.71	0.0063
Concentración	149771111.11	5	29954222.22	5.71	0.0063
Error	62920000.00	12	5243333.33		
Total	212691111.11	17			

48h

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
48h	18	0.89	0.84	9.08

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	632426666.67	5	126485333.33	18.77	<0.0001
Concentración	632426666.67	5	126485333.33	18.77	<0.0001
Error	80868333.33	12	6739027.78		
Total	713295000.00	17			

72h

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
72h	18	0.90	0.86	8.24

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3592422777.78	5	718484555.56	21.99	<0.0001
Concentración	3592422777.78	5	718484555.56	21.99	<0.0001
Error	392040000.00	12	32670000.00		
Total	3984462777.78	17			

Como los p-valor (24h: 0.0063, 48h: < 0.0001 y 72h: < 0.0001) son menores que el alfa ( $\alpha=0.05$ ), entonces existe significancia, y al menos un tratamiento produce un efecto diferente sobre el total de células vivas MT-2. Por lo tanto, es posible hacer una comparación múltiple de medias (Tukey) entre los distintos tratamientos (concentraciones).

## ANEXO 10: Comparación múltiple de medias (MT-2)

### Prueba Tukey (programa Infostat)

24h

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
24h	18	0.70	0.58	15.88

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	149771111.11	5	29954222.22	5.71	0.0063
Concentración	149771111.11	5	29954222.22	5.71	0.0063
Error	62920000.00	12	5243333.33		
Total	212691111.11	17			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=6279.97445

Error: 5243333.3333 gl: 12

Concentración	Medias	n	E.E.
Control	17600.00	3	1322.04 A
5 µg/mL	17600.00	3	1322.04 A
1 µg/mL	15400.00	3	1322.04 A B
10 µg/mL	14666.67	3	1322.04 A B
15 µg/mL	10633.33	3	1322.04 B
20 µg/mL	10633.33	3	1322.04 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

48h

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
48h	18	0.89	0.84	9.08

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	632426666.67	5	126485333.33	18.77	<0.0001
Concentración	632426666.67	5	126485333.33	18.77	<0.0001
Error	80868333.33	12	6739027.78		
Total	713295000.00	17			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=7119.55364

Error: 6739027.7778 gl: 12

Concentración	Medias	n	E.E.
Control	37033.33	3	1498.78 A
5 µg/mL	33366.67	3	1498.78 A
1 µg/mL	31166.67	3	1498.78 A B
10 µg/mL	25666.67	3	1498.78 B C
15 µg/mL	25300.00	3	1498.78 B C
20 µg/mL	19066.67	3	1498.78 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

72h

#### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
72h	17	0.90	0.86	8.62

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3574304411.76	5	714860882.35	20.15	<0.0001
Concentración	3574304411.76	5	714860882.35	20.15	<0.0001
Error	390225000.00	11	35475000.00		
Total	3964529411.76	16			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=17262.21047

Error: 35475000.0000 gl: 11

Concentración	Medias	n	E.E.
Control	90200.00	3	3438.75 A
1 µg/mL	82500.00	3	3438.75 A B
5 µg/mL	72050.00	2	4211.59 B
10 µg/mL	65633.33	3	3438.75 B C
20 µg/mL	54266.67	3	3438.75 C
15 µg/mL	50966.67	3	3438.75 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

## ANEXO 10: Continuación

### COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE MEDIAS - PRUEBA TUKEY (PROGRAMA R)

24h:

```

Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Linear Hypotheses:

              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
1 µg/mL - Control == 0 -2.200e+03  1.870e+03 -1.177  0.8395
5 µg/mL - Control == 0 -4.110e-12  1.870e+03  0.000  1.0000
10 µg/mL - Control == 0 -2.933e+03  1.870e+03 -1.569  0.6313
15 µg/mL - Control == 0 -6.967e+03  1.870e+03 -3.726  0.0268 *
20 µg/mL - Control == 0 -6.967e+03  1.870e+03 -3.726  0.0269 *
5 µg/mL - 1 µg/mL == 0  2.200e+03  1.870e+03  1.177  0.8395
10 µg/mL - 1 µg/mL == 0 -7.333e+02  1.870e+03 -0.392  0.9985
15 µg/mL - 1 µg/mL == 0 -4.767e+03  1.870e+03 -2.550  0.1842
20 µg/mL - 1 µg/mL == 0 -4.767e+03  1.870e+03 -2.550  0.1842
10 µg/mL - 5 µg/mL == 0 -2.933e+03  1.870e+03 -1.569  0.6313
15 µg/mL - 5 µg/mL == 0 -6.967e+03  1.870e+03 -3.726  0.0270 *
20 µg/mL - 5 µg/mL == 0 -6.967e+03  1.870e+03 -3.726  0.0269 *
15 µg/mL - 10 µg/mL == 0 -4.033e+03  1.870e+03 -2.157  0.3229
20 µg/mL - 10 µg/mL == 0 -4.033e+03  1.870e+03 -2.157  0.3229
20 µg/mL - 15 µg/mL == 0  0.000e+00  1.870e+03  0.000  1.0000
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)

```

48h:

```

Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Linear Hypotheses:

              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
01 µg/mL - Control == 0 -5866.7      2119.6 -2.768  0.13148
05 µg/mL - Control == 0 -3666.7      2119.6 -1.730  0.53925
10 µg/mL - Control == 0 -11366.7     2119.6 -5.363  0.00181 **
15 µg/mL - Control == 0 -11733.3     2119.6 -5.536  0.00142 **
20 µg/mL - Control == 0 -17966.7     2119.6 -8.476 < 0.001 ***
05 µg/mL - 1 µg/mL == 0  2200.0      2119.6  1.038  0.89604
10 µg/mL - 1 µg/mL == 0 -5500.0      2119.6 -2.595  0.17190
15 µg/mL - 1 µg/mL == 0 -5866.7      2119.6 -2.768  0.13130
20 µg/mL - 1 µg/mL == 0 -12100.0     2119.6 -5.709  0.00102 **
10 µg/mL - 5 µg/mL == 0 -7700.0      2119.6 -3.633  0.03141 *
15 µg/mL - 5 µg/mL == 0 -8066.7      2119.6 -3.806  0.02365 *
20 µg/mL - 5 µg/mL == 0 -14300.0     2119.6 -6.747 < 0.001 ***
15 µg/mL - 10 µg/mL == 0 -366.7      2119.6 -0.173  0.99997
20 µg/mL - 10 µg/mL == 0 -6600.0      2119.6 -3.114  0.07509 .
20 µg/mL - 15 µg/mL == 0 -6233.3      2119.6 -2.941  0.09946 .
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)

```

72h:

Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses					
Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts					
Linear Hypotheses:					
		Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
1	µg/mL - Control == 0	-7700	4667	-1.650	0.58479
5	µg/mL - Control == 0	-17600	4667	-3.771	0.02499 *
10	µg/mL - Control == 0	-24567	4667	-5.264	0.00207 **
15	µg/mL - Control == 0	-39233	4667	-8.407	< 0.001 ***
20	µg/mL - Control == 0	-35933	4667	-7.700	< 0.001 ***
5	µg/mL - 1 µg/mL == 0	-9900	4667	-2.121	0.33851
10	µg/mL - 1 µg/mL == 0	-16867	4667	-3.614	0.03264 *
15	µg/mL - 1 µg/mL == 0	-31533	4667	-6.757	< 0.001 ***
20	µg/mL - 1 µg/mL == 0	-28233	4667	-6.050	< 0.001 ***
10	µg/mL - 5 µg/mL == 0	-6967	4667	-1.493	0.67483
15	µg/mL - 5 µg/mL == 0	-21633	4667	-4.635	0.00589 **
20	µg/mL - 5 µg/mL == 0	-18333	4667	-3.928	0.01926 *
15	µg/mL - 10 µg/mL == 0	-14667	4667	-3.143	0.07167 .
20	µg/mL - 10 µg/mL == 0	-11367	4667	-2.436	0.21837
20	µg/mL - 15 µg/mL == 0	3300	4667	0.707	0.97743
---					
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					
(Adjusted p values reported -- single-step method)					

Los resultados indican que a las 24h las concentraciones 15 y 20 µg/mL son las que muestran diferencias estadísticamente significativas con respecto al control sobre el total de células vivas MT-2 con datos de p-valor de 0.0268 y 0.0269, respectivamente.

A las 48h, las concentraciones de 10, 15 y 20 µg/mL son las que muestran diferencias estadísticamente significativas con respecto al control sobre el total de células vivas con datos de p-valor de 0.00181, 0.00142 y < 0.001, respectivamente.

A las 72h, las concentraciones de 1 y 5 µg/mL no ofrecen diferencias estadísticamente significativas con respecto al control sobre el total de células vivas MT-2. Pero, las concentraciones 5, 10, 15 y 20 µg/mL muestran diferencias estadísticamente significativas con respecto al control sobre el total de células vivas MT-2 con p-valor de 0.02499, 0.00207, < 0.001 y < 0.001, respectivamente.

## ANEXO 11: Datos estadísticos de la citometría de las células K562

Porcentaje de células K562 contadas como Caspase-3/7+ y el número total de células marcadas de 15000 células adquiridas

Concentración	Fluoróforo	Porcentaje de células marcadas (%)	N° células Caspase-3/7+
Control	Caspase-3/7+	10.5	1578
Control	Caspase-3/7+	12.9	1929
1 µg/mL	Caspase-3/7+	11.8	1767
1 µg/mL	Caspase-3/7+	11.6	1734
5 µg/mL	Caspase-3/7+	17.5	2620
5 µg/mL	Caspase-3/7+	16.4	2460

Concentración	Variable	Media	D.E.
Control	Porcentaje	11.70	1.70
1 µg/mL	Porcentaje	11.70	0.14
5 µg/mL	Porcentaje	16.95	0.78

D.E.: desviación estándar

Porcentaje de células K562 contadas como SYTOX+ y el número total de células marcadas de 15000 células adquiridas

Concentración	Fluoróforo	Células marcadas (%)	N° células marcadas con Sytox
Control	SYTOX FL4+	8.75	1312
Control	SYTOX FL4+	9.75	1463
1 µg/mL	SYTOX FL4+	10.4	1560
1 µg/mL	SYTOX FL4+	10.3	1549
5 µg/mL	SYTOX FL4+	13.8	2076
5 µg/mL	SYTOX FL4+	13.2	1974

Concentración	Variable	Media	D.E.
Control	Porcentaje	9.25	0.71
1 µg/mL	Porcentaje	10.35	0.07
5 µg/mL	Porcentaje	13.50	0.42

## ANEXO 11: Continuación

### Análisis de Normalidad - datos de citometría (caspasas) de K562

H<sub>0</sub>: Existe normalidad.

H<sub>1</sub>: No existe normalidad.

$\alpha=0.05$

```
shapiro.test(ricasp72)
      Shapiro-Wilk normality test
data:  ricasp72
W = 0.99723, p-value = 0.9995
```

Como el p-valor es de 0.9995 (72h), valor mayor al alfa ( $\alpha=0.05$ ), entonces podemos decir que existe normalidad de los datos de citometría para los tratamientos evaluados con la línea celular K562.

### Análisis de Homogeneidad de varianzas - datos de citometría (caspasas) de K562

Se realizó la prueba de Barlett

H<sub>0</sub>: existe homogeneidad de varianzas

H<sub>1</sub>: no existe homogeneidad de varianzas

$\alpha=0.05$

```
Bartlett test of homogeneity of variances
data:  porcentaje by concentracion
Bartlett's K-squared = 2.647, df = 2, p-value = 0.2662
```

Como el p-valor es de 0.2662 (72h), valor mayor al alfa ( $\alpha=0.05$ ), entonces podemos decir que existe homogeneidad de varianzas en los datos de citometría para los tratamientos evaluados con la línea celular K562.

### Análisis de varianza (ANOVA)- datos de citometría (caspasas) de K562

#### Infostat

##### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Porcentaje	6	0.91	0.85	8.04

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	36.75	2	18.38	15.73	0.0257
Concentración	36.75	2	18.38	15.73	0.0257
Error	3.51	3	1.17		
Total	40.26	5			

## R Studio

```
              Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
concentracion  2  36.75  18.375  15.73 0.0257 *
Residuals     3   3.50   1.168
```

```
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Como el p-valor obtenido tanto con RStudio como con Infostat es de 0.0257, menor que el  $\alpha$  de 0.05, por lo tanto, al menos un tratamiento es diferente del control para la evaluación de activación de caspasas por citometría.

## Comparación múltiple de medias ( $\alpha=0.05$ ) por Tukey - datos de citometría (caspasas) de K562

### RStudio

```
Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts
Fit: lm(formula = porcentaje ~ concentracion, data = caspasas72h)

Linear Hypotheses:

              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
1 µg/mL - Control == 0 -3.350e-15  1.081e+00  0.000  1.0000
5 µg/mL - Control == 0  5.250e+00  1.081e+00  4.857  0.0335 *
5 µg/mL - 1 µg/mL == 0  5.250e+00  1.081e+00  4.857  0.0339 *
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)
```

### Infostat

**Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=4.51680**

Error: 1.1683 gl: 3

Concentración	Medias	n	E.E.
Control	11.70	2	0.76 A
1 µg/mL	11.70	2	0.76 A
5 µg/mL	16.95	2	0.76 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

Hay diferencias estadísticamente significativas entre el control y el tratamiento de 5 µg/mL (p-valor: 0.0335) para la evaluación de caspasas de las células K562 por citometría.

## ANEXO 11: Continuación

### Análisis de Normalidad - datos de citometría (sytox) de K562

H<sub>0</sub>: Existe normalidad.

H<sub>1</sub>: No existe normalidad.

$\alpha=0.05$

```
Shapiro-Wilk normality test
data:  risytox72
W = 0.98214, p-value = 0.9617
```

Como el p-valor es de 0.9617 (72h), valor mayor al alfa ( $\alpha=0.05$ ), entonces podemos decir que existe normalidad de los datos de citometría (muerte celular) para los tratamientos evaluados con la línea celular K562.

### Análisis de Homogeneidad de varianzas - datos de citometría (SYTOX) de K562

Se realizó la prueba de Barlett

H<sub>0</sub>: existe homogeneidad de varianzas

H<sub>1</sub>: no existe homogeneidad de varianzas

$\alpha=0.05$

```
Bartlett test of homogeneity of variances
data:  porcentaje by concentracion
Bartlett's K-squared = 2.2676, df = 2, p-value = 0.3218
```

Como el p-valor es de 0.3218 (72h), valor mayor al alfa ( $\alpha=0.05$ ), entonces podemos decir que existe homogeneidad de varianzas en los datos de citometría (de muerte celular) para los tratamientos evaluados con la línea celular K562.

### Análisis de varianza (ANOVA)- datos de citometría de SYTOX de K562

#### Infostat

##### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Cells	6	0.96	0.94	4.50

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	437110.33	2	218555.17	39.35	0.0070
Concentración	437110.33	2	218555.17	39.35	0.0070
Error	16663.00	3	5554.33		
Total	453773.33	5			

## RStudio

```
              Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
concentracion 2  19.463   9.732   42.62 0.00627 **
Residuals     3   0.685   0.228
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Como el p-valor de 0.007 (Infostat) o 0.00627 (RStudio) es menor que el  $\alpha$  de 0.05, al menos un tratamiento es diferente del control en la evaluación de muerte con el reactivo SYTOX por citometría.

## Comparación múltiple de medias por Tukey ( $\alpha=0.05$ )- datos de Citometría de SYTOX de K562

### Infostat

**Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=1.99679**

Error: 0.2283 gl: 3

Concentracion	Medias	n	E.E.	
Control	9.25	2	0.34	A
1 $\mu\text{g/mL}$	10.35	2	0.34	A
5 $\mu\text{g/mL}$	13.50	2	0.34	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

### RStudio

```
Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: lm(formula = porcentaje ~ concentracion, data = sytox72h)

Linear Hypotheses:

              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
1  $\mu\text{g/mL}$  - Control == 0    1.1000    0.4778   2.302 0.19897
5  $\mu\text{g/mL}$  - Control == 0    4.2500    0.4778   8.894 0.00609 **
5  $\mu\text{g/mL}$  - 1  $\mu\text{g/mL}$  == 0    3.1500    0.4778   6.592 0.01419 *
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)
```

Hay diferencias estadísticamente significativas entre el control y el tratamiento de 5  $\mu\text{g/mL}$  (p-valor: 0.00609) para la evaluación de muerte celular de la línea celular K562 con SYTOX por citometría.

## ANEXO 12: Datos estadísticos de la citometría de las células MT-2

Porcentaje de células MT-2 contadas como caspasas-3/7+ y el número total de células marcadas de 15000 células adquiridas

Concentración	Fluoróforo	Porcentaje de células marcadas (%)	N° células Caspase-3/7+
Control	Caspase-3/7+	2.29	343
Control	Caspase-3/7+	1.73	259
1 µg/mL	Caspase-3/7+	4.87	730
1 µg/mL	Caspase-3/7+	4.36	654
5 µg/mL	Caspase-3/7+	6.85	1027
5 µg/mL	Caspase-3/7+	6.4	960
10 µg/mL	Caspase-3/7+	5.71	856
10 µg/mL	Caspase-3/7+	6.53	979

Concentración	Variable	Media	D.E.
Control	Porcentaje	2.01	0.40
1 µg/mL	Porcentaje	4.62	0.36
5 µg/mL	Porcentaje	6.63	0.32
10 µg/mL	Porcentaje	6.12	0.58

D.E.: desviación estándar

Porcentaje de células MT-2 contadas como SYTOX+ y el número total de células marcadas de 15000 células adquiridas

Concentración	Fluoróforo	Porcentaje de células marcadas (%)	N° células marcadas con SYTOX+
Control	SYTOX FL4+	2.51	377
Control	SYTOX FL4+	1.52	228
1 µg/mL	SYTOX FL4+	2.55	383
1 µg/mL	SYTOX FL4+	2.03	304
5 µg/mL	SYTOX FL4+	2.1	315
5 µg/mL	SYTOX FL4+	2.69	403
10 µg/mL	SYTOX FL4+	4.54	681
10 µg/mL	SYTOX FL4+	4.01	601

Concentración	Variable	Media	D.E.
Control	Porcentaje	2.02	0.70
1 µg/mL	Porcentaje	2.29	0.37
5 µg/mL	Porcentaje	2.40	0.42
10 µg/mL	Porcentaje	4.28	0.37

## ANEXO 12: Continuación

### Análisis de Normalidad - datos de citometría (caspasas) de MT-2

H<sub>0</sub>: Existe normalidad.

H<sub>1</sub>: No existe normalidad.

$\alpha=0.05$

```
Shapiro-Wilk normality test
data:  ricasp96
W = 0.85731, p-value = 0.1129
```

Como el p-valor es de 0.1129 (96h), valor mayor al alfa ( $\alpha=0.05$ ), entonces podemos decir que existe normalidad de los datos de citometría para los tratamientos evaluados con la línea celular MT-2.

### Análisis de Homogeneidad de varianzas - datos de citometría (caspasas) de K562

Se realizó la prueba de Barlett

H<sub>0</sub>: existe homogeneidad de varianzas

H<sub>1</sub>: no existe homogeneidad de varianzas

$\alpha=0.05$

```
Bartlett test of homogeneity of variances
data:  porcentaje by concentracion
Bartlett's K-squared = 0.30879, df = 3, p-value = 0.9584
```

Como el p-valor es de 0.9584 (96h), valor mayor al alfa ( $\alpha=0.05$ ), entonces podemos decir que existe homogeneidad de varianzas en los datos de citometría para los tratamientos evaluados con la línea celular MT-2.

### Análisis de varianza (ANOVA) - datos de caspasas por citometría de MT-2

#### Infostat

##### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Porcentaje	8	0.97	0.95	8.79

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	25.77	3	8.59	47.44	0.0014
Concentración	25.77	3	8.59	47.44	0.0014
Error	0.72	4	0.18		
Total	26.49	7			

## RStudio

```

              Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
concentracion 2   36.75   18.375   15.73 0.0257 *
Residuals     3    3.50    1.168
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

Como el p-valor de 0.0014 con Infostat o de 0.0257 con RStudio son menores que el  $\alpha$  de 0.05, al menos un tratamiento es diferente del control para la evaluación de activación de caspasas de la línea celular MT-2 por citometría.

## Comparación múltiple de medias por Tukey ( $\alpha=0.05$ )- datos de Citometría de caspasas

**Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=1.73227**

Error: 0.1811 gl: 4

Concentracion	Medias	n	E.E.	
Control	2.01	2	0.30	A
1 µg/mL	4.62	2	0.30	B
10 µg/mL	6.12	2	0.30	B C
5 µg/mL	6.63	2	0.30	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

### Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: lm(formula = porcentaje ~ concentracion, data = caspasas96h)

Linear Hypotheses:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
1 µg/mL - Control == 0	2.6050	0.4255	6.122	0.01215 *
5 µg/mL - Control == 0	4.6150	0.4255	10.845	0.00138 **
10 µg/mL - Control == 0	4.1100	0.4255	9.659	0.00229 **
5 µg/mL - 1 µg/mL == 0	2.0100	0.4255	4.724	0.03080 *
10 µg/mL - 1 µg/mL == 0	1.5050	0.4255	3.537	0.07755 .
10 µg/mL - 5 µg/mL == 0	-0.5050	0.4255	-1.187	0.66486

---  
Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1  
(Adjusted p values reported -- single-step method)

Hay diferencias estadísticamente significativas entre el control y los tratamientos de 1, 5 y 10 µg/mL, con p-valor de 0.01215, 0.00138 y 0.00229, respectivamente, para la evaluación de los datos de activación de caspasas por citometría.

## ANEXO 12: Continuación

### Análisis de Normalidad - datos de citometría (SYTOX) de MT-2

H<sub>0</sub>: Existe normalidad.

H<sub>1</sub>: No existe normalidad.

$\alpha=0.05$

```
Shapiro-Wilk normality test
data:  risytox96
W = 0.87695, p-value = 0.1761
```

Como el p-valor es de 0.1761 (96h), valor mayor al alfa ( $\alpha=0.05$ ), entonces podemos decir que existe normalidad de los datos de citometría (muerte celular) para los tratamientos evaluados con la línea celular MT-2.

### Análisis de Homogeneidad de varianzas - datos de citometría (SYTOX) de MT-2

Se realizó la prueba de Barlett

H<sub>0</sub>: existe homogeneidad de varianzas

H<sub>1</sub>: no existe homogeneidad de varianzas

$\alpha=0.05$

```
Bartlett test of homogeneity of variances
data:  porcentaje by concentracion
Bartlett's K-squared = 0.44599, df = 3, p-value = 0.9306
```

Como el p-valor es de 0.9306 (96h), valor mayor al alfa ( $\alpha=0.05$ ), entonces podemos decir que existe homogeneidad de varianzas en los datos de citometría (de muerte celular) para los tratamientos evaluados con la línea celular MT-2.

### Análisis de varianza (ANOVA) - datos de SYTOX por citometría de MT-2

#### Infostat

##### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Porcentaje	8	0.87	0.78	17.67

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	6.41	3	2.14	9.09	0.0293
Concentracion	6.41	3	2.14	9.09	0.0293
Error	0.94	4	0.23		
Total	7.35	7			

## RStudio

```
              Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
concentracion  3  6.407  2.1355    9.09 0.0293 *
Residuals     4  0.940  0.2349
```

```
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Como el p-valor de 0.0293 con Infostat y con RStudio es menor que el  $\alpha$  de 0.05, al menos un tratamiento es diferente del control en la evaluación de muerte con el reactivo SYTOX por citometría, de la línea celular MT-2.

## Comparación múltiple de medias por Tukey ( $\alpha=0.05$ )- datos de Citometría de SYTOX de MT-2

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=1.97316

Error: 0.2349 gl: 4

Concentracion	Medias	n	E.E.	
Control	2.02	2	0.34	A
1 $\mu\text{g/mL}$	2.29	2	0.34	A
5 $\mu\text{g/mL}$	2.40	2	0.34	A B
10 $\mu\text{g/mL}$	4.28	2	0.34	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

## RStudio

Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: lm(formula = porcentaje ~ concentracion, data = sytox96h)

Linear Hypotheses:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
1 $\mu\text{g/mL}$ - Control == 0	0.2750	0.4847	0.567	0.9369
5 $\mu\text{g/mL}$ - Control == 0	0.3800	0.4847	0.784	0.8586
10 $\mu\text{g/mL}$ - Control == 0	2.2600	0.4847	4.663	0.0322 *
5 $\mu\text{g/mL}$ - 1 $\mu\text{g/mL}$ == 0	0.1050	0.4847	0.217	0.9958
10 $\mu\text{g/mL}$ - 1 $\mu\text{g/mL}$ == 0	1.9850	0.4847	4.095	0.0491 *
10 $\mu\text{g/mL}$ - 5 $\mu\text{g/mL}$ == 0	1.8800	0.4847	3.879	0.0583 .

```
---
Signif. codes:  0 '****' 0.001 '***' 0.01 '**' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)
```

Hay diferencias estadísticamente significativas entre el control y el tratamiento de 10  $\mu\text{g/mL}$ , con un p-valor de 0.0322 para la evaluación de muerte celular con SYTOX por citometría.

### ANEXO 13: Curva estándar de melitina y fosfolipasa

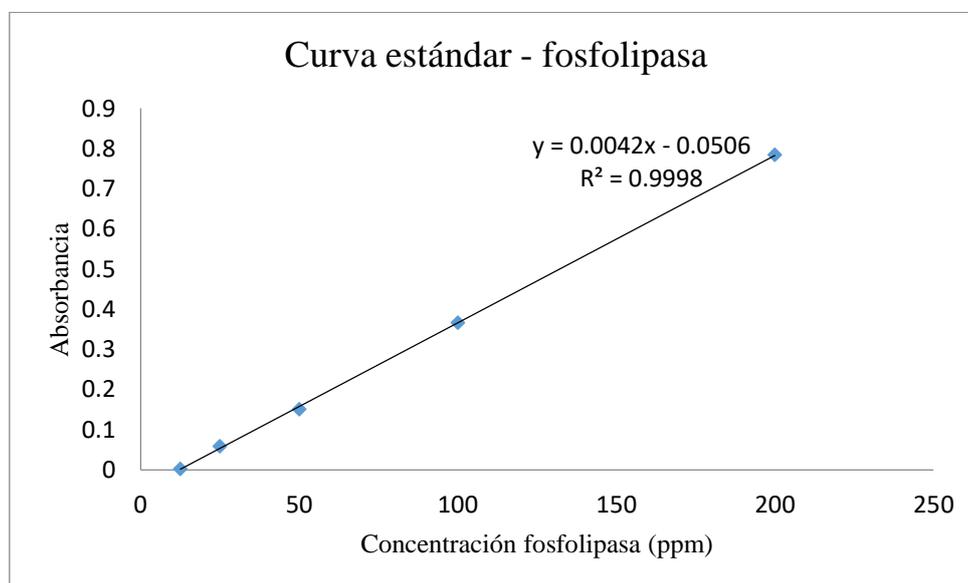
#### Curva estándar de melitina

Concentración inicial (L)	St	Volumen inicial (μL)	Volumen final (μL)	
2000		100	1000	Solución stock
200	St5	500	1000	Diluciones sucesivas
100	St4	500	1000	
50	St3	500	1000	
25	St2	500	1000	
12.5	St1	500	1000	

St: estándar

#### Datos de curva estándar de PLA2

Concentración estándar (ppm)	Absorbancia
12.5	0.002
25	0.059
50	0.151
100	0.366
200	0.784

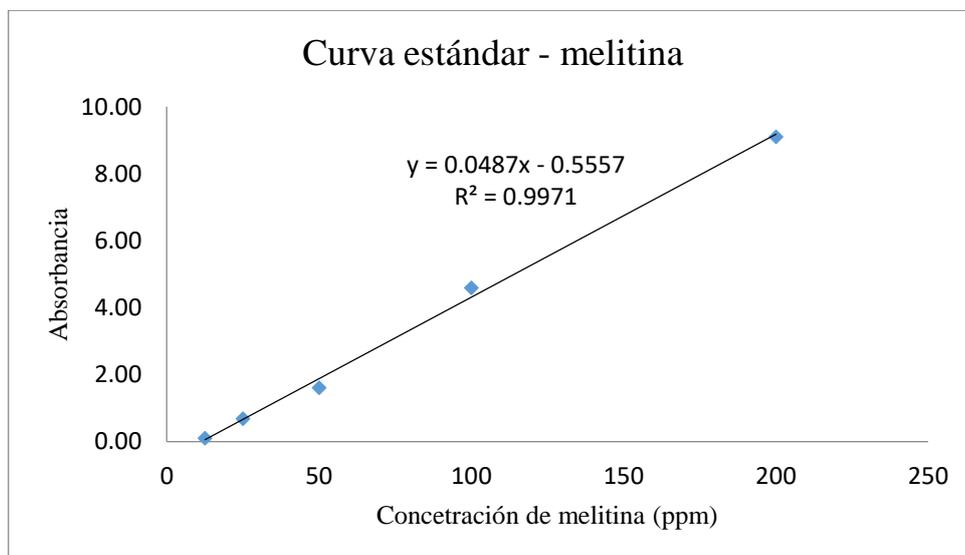


Curva estándar de fosfolipasa A2

### ANEXO 13: Continuación

Datos de la curva estándar de melitina

Concentración estándar ( ppm)	Absorbancia
12.5	0.10
25	0.68
50	1.61
100	4.60
200	9.10



Curva estándar de melitina

## ANEXO 14: Cálculo de la regresión lineal Probit para los datos de K562

Información sobre los datos		
		Nº de casos
Válidos		4
Rechazados	Perdidos	0
	La transformación log no se puede realizar	0
	Número de respuestas > Número de sujetos	0
Grupo control		1
Información sobre la convergencia		
	Número de iteraciones	Solución óptima encontrada
PROBIT	15	Sí

### Estimaciones de los parámetros

Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
PROBIT <sup>a</sup> concentracion	.528	.001	399.715	0.000	.525	.530
Intersección	-1.365	.001	-1443.303	0.000	-1.366	-1.364

a. Modelo PROBIT:  $PROBIT(p) = \text{Intersección} + BX$  (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10,000.)

Contrastes de chi-cuadrado

		Chi-cuadrado	gl <sup>b</sup>	Sig.
PROBIT	Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	623267.621	2	,000 <sup>a</sup>

a. Como el nivel de significación es menor que ,150, se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

b. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

### Residuos y frecuencias de casillas

Número	concentracion	Número de sujetos	Respuestas observadas	Respuestas esperadas	Residuos	Probabilidad
PROBIT 1	-.602	1331000	3667	61493.462	-57826.462	.046
2	0.000	1331000	150333	114581.575	35751.425	.086
3	.699	1331000	454667	212292.851	242374.149	.159
4	1.000	1331000	48400	267657.745	-219257.745	.201

## ANEXO 14: Continuación

Límites de confianza

Probabilidad		Límites de confianza al 95% para concentración	Límites de confianza al 95% para log(concentración) <sup>b</sup>	Probabilidad		Límites de confianza al 95% para concentración	Límites de confianza al 95% para log(concentración) <sup>b</sup>
		Estimación	Estimación			Estimación	Estimación
PROBIT <sup>a</sup>	,010	.015	-1.822	PROBIT <sup>a</sup>	<b>,500</b>	<b>387.235</b>	2.588
	,020	.050	-1.305		,550	670.161	2.826
	,030	.105	-.977		,600	1170.092	3.068
	,040	.186	-.731		,650	2081.561	3.318
	,050	.295	-.530		,700	3819.702	3.582
	,060	.437	-.359		,750	7354.257	3.867
	,070	.617	-.210		,800	15252.939	4.183
	,080	.840	-.075		,850	35697.661	4.553
	,090	1.113	.046		,900	104060.560	5.017
	,100	1.441	.159		,910	134744.903	5.130
	,150	4.201	.623		,920	178414.791	5.251
	,200	9.831	.993		,930	242933.155	5.385
	,250	20.390	1.309		,940	342930.622	5.535
	,300	39.257	1.594		,950	508115.119	5.706
	,350	72.038	1.858		,960	806451.521	5.907
	,400	128.153	2.108		,970	1423017.746	6.153
	,450	223.754	2.350		,980	3027364.115	6.481
,500	387.235	2.588	,990	9949555.555	6.998		

a. Se utiliza un factor de heterogeneidad.

b. Base del logaritmo = 10.

## ANEXO 15: Cálculo de la regresión lineal Probit para los datos de MT-2

### Información sobre los datos

		Nº de casos
Válidos		5
	Perdidos	0
Rechazados	La transformación log no se puede realizar	0
	Número de respuestas > Número de sujetos	0
Grupo control		1

### Información sobre la convergencia

	Número de iteraciones	Solución óptima encontrada
PROBIT	11	Sí

### Estimaciones de los parámetros

Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
PROBIT <sup>a</sup> concentración	.944	.002	572.164	0.000	.941	.947
Intersección	-1.441	.002	-854.462	0.000	-1.443	-1.440

a. Modelo PROBIT:  $PROBIT(p) = \text{Intersección} + BX$  (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10,000.)

### Contrastes de chi-cuadrado

		Chi-cuadrado	gl <sup>b</sup>	Sig.
PROBIT	Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	27171.728	3	,000 <sup>a</sup>

a. Como el nivel de significación es menor que ,150, se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

b. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

### Residuos y frecuencias de casillas

Número	concentracion	Número de sujetos	Respuestas observadas	Respuestas esperadas	Residuos	Probabilidad
1	0.000	902000	77000	67411.041	9588.959	.075
2	.699	902000	176000	195903.106	-19903.106	.217
PROBIT 3	1.000	902000	245667	279057.391	-33390.391	.309
4	1.176	902000	392333	333885.353	58447.647	.370
5	1.301	902000	359333	374748.677	-15415.677	.415

## ANEXO 15: Continuación

### Límites de confianza

Probabilidad		Límites de confianza al 95% para concentración	Límites de confianza al 95% para log(concentración) <sup>b</sup>	Probabilidad		Límites de confianza al 95% para concentración	Límites de confianza al 95% para log(concentración) <sup>b</sup>
		Estimación	Estimación			Estimación	Estimación
PROBIT <sup>a</sup>	,010	.115	-.938	PROBIT <sup>a</sup>	<b>,500</b>	<b>33.671</b>	1.527
	,020	.224	-.649		,550	45.751	1.660
	,030	.342	-.466		,600	62.473	1.796
	,040	.470	-.328		,650	86.204	1.936
	,050	.609	-.216		,700	121.030	2.083
	,060	.758	-.120		,750	174.551	2.242
	,070	.920	-.036		,800	262.427	2.419
	,080	1.093	.038		,850	422.108	2.625
	,090	1.278	.107		,900	767.611	2.885
	,100	1.477	.169		,910	886.893	2.948
	,150	2.686	.429		,920	1037.572	3.016
	,200	4.320	.636		,930	1232.963	3.091
	,250	6.495	.813		,940	1494.985	3.175
	,300	9.367	.972		,950	1862.440	3.270
	,350	13.152	1.119		,960	2411.117	3.382
	,400	18.148	1.259		,970	3311.885	3.520
	,450	24.781	1.394		,980	5050.473	3.703
,500	33.671	1.527	,990	9821.268	3.992		

a. Se utiliza un factor de heterogeneidad.

b. Base del logaritmo = 10.