

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y EFECTOS
ANTIINFLAMATORIO Y APOPTÓTICO DE *Flourensia microphylla* EN UN
MODELO *in vitro* DE CELULAS DE CANCER DE COLON HT-29.

Tesis

Que presenta DENNISE ANAHÍ CARRILLO LOMELÍ

como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA DE SISTEMAS DE PRODUCCIÓN

Saltillo, Coahuila

Diciembre 2016

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y EFECTOS
ANTIINFLAMATORIO Y APOPTOTICO DE *Flourensia microphylla* EN UN
MODELO *in vitro* DE CELULAS DE CÁNCER DE COLON HT-29.

Tesis

Elaborada por DENNISE ANAHÍ CARRILLO LOMELÍ como requisito parcial para
obtener el grado de Maestro en Ciencias en Ingeniería de Sistemas de Producción
con la supervisión y aprobación del Comité de Asesoría



Dra. Diana Jasso Cantú
Asesor Principal



Dr. Raúl Rodríguez García
Asesor



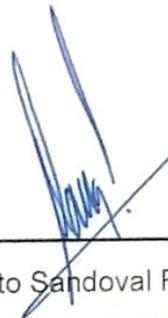
Dr. José Ángel Villarreal Quintanilla
Asesor



Dra. Nuria Elizabeth Rocha Guzmán
Asesor



Dra. María De Lourdes Virginia Díaz
Jimenez
Asesor



Dr. Alberto Sandoval Rangel
Subdirector de Postgrado
UAAAN

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de este camino he encontrado grandes personas que me han brindado parte de su luz, apoyo y asesoría para la realización de este proyecto de investigación; pero principalmente quiero dar las Gracias Infinitas a la Madre Tierra, Tonantzin Tlalli, porque sin los frutos que nos brinda día con día no hubiera sido posible empezar con este proyecto. Gracias infinitas Madre Tierra por permitirme estar en conexión, compartiendo la vida.

Agradezco a mis asesores, en especial y principalmente a **Dra. Diana Jasso Cantú** gracias por la oportunidad y la confianza otorgada para poder trabajar dentro de uno de sus proyectos de investigación, el cual me ha ayudado a desarrollar habilidades y nuevos conocimientos con los que estoy complementando mi etapa profesional y científica, gracias Doctora por todos sus consejos; y **Dra. Nuria Elizabeth Rocha Guzmán**, gracias por la confianza para realizar la estancia dentro de su laboratorio y permitirme trabajar en conjunto a su equipo académico, gracias por compartir sus conocimientos conmigo, los cuales me han ayudado en la formación científica que hoy estoy emprendiendo. Gracias Doctoras, hoy son un modelo a seguir.

Al **Dr. Raúl Rodríguez García** por sus aportaciones y contribución durante el trayecto de esta investigación y su apoyo durante la colecta de la planta.

Al **Dr. José Ángel Villarreal**, por sus consejos para la estructura y presentación del presente proyecto de investigación y su apoyo en la identificación y colecta de la planta *Flourensia microphylla*.

A la **Dra. María de Lourdes Virginia Díaz Jiménez**, por su contribución y asesoría en la identificación de los compuestos bioactivos de la planta por medio del sistema GC-MS.

Agradezco al equipo de laboratorio de Fitoquímica de la UAAAN, en especial a **T.A. María Leticia Rodríguez González** por el apoyo brindado para la preparación de la materia utilizada en este estudio y **C. Juan José Valenzuela Cabrera** por su contribución y ayuda en la colecta de *Flourensia microphylla*.

Con aprecio para todo el equipo del Laboratorio de Alimentos Funcionales y Nutracéuticos y Laboratorio de Productos Naturales de la UPIDET, en el Instituto Tecnológico de Durango: en especial a la **Dra. Martha Rocío Moreno Jiménez**, muchas gracias por compartir sus conocimientos y por todo el apoyo y la asesoría brindada para realizar los ensayos de inflamación y apoptosis. A **Jesús Omar Díaz Rivas, Rosalía López Barraza, Jessica Barragán Zúñiga, Giovanni Pérez, Irving Ojeda** gracias infinitas por todo el apoyo y asistencia que me brindaron en la parte experimental de esta investigación, además de su confianza y consejos.

A la **Dra. María Liliana Flores López**, por su ayuda en la revisión de redacción y discusión del manuscrito para el artículo científico. Gracias Lili.

Agradezco al **Dr. Jorge Méndez González** por todas sus enseñanzas y conocimiento transmitido, sobre todo por la oportunidad que se me dio para realizar mis estudios de maestría. Gracias Doctor.

Y por último, pero no menos importante, agradezco al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por la beca otorgada para la realización de mis estudios de postgrado en la Maestría en Ciencias en Ingeniería de Sistemas de Producción.

DEDICATORIA

A mis padres Francisco Javier Carrillo Solís y Martha Estela Lomelí Ventura y a mi hermana Martha Alejandra Estrada Lomelí

ÍNDICE GENERAL

| | |
|-------------------------------------------------------------------------|-----|
| Contenido | |
| AGRADECIMIENTOS..... | iii |
| DEDICATORIA | v |
| ÍNDICE GENERAL..... | vi |
| LISTA DE CUADROS | ix |
| LISTA DE FIGURAS | x |
| RESUMEN..... | xii |
| ABSTRACT | xiv |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| Justificación | 3 |
| Objetivo general | 3 |
| Objetivos específicos..... | 3 |
| REVISIÓN DE LITERATURA..... | 4 |
| Estrés oxidativo | 4 |
| La inflamación | 6 |
| El cáncer..... | 7 |
| El cáncer de colon | 9 |
| La inflamación y el cáncer de colon..... | 11 |
| Apoptosis..... | 13 |
| Productos medicinales naturales..... | 15 |
| Las plantas medicinales del semidesierto Mexicano y sus extractos. | 16 |
| El género <i>Flourensia</i> y su distribución | 18 |
| <i>Flourensia microphylla</i> | 21 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 22 |
| Colecta de plantas | 22 |
| Reactivos químicos y material biológico | 22 |
| Obtención de extractos | 23 |
| Análisis de composición química | 24 |
| Caracterización química por cromatografía de líquidos acoplada a masas (LC-MS/MS) | 24 |
| Caracterización química por cromatografía de gases (GC-MS) | 25 |
| Cuantificación de Fenoles totales | 25 |
| Ensayos de Capacidad Antioxidante | 26 |
| Actividad de barrido por radical DPPH* (Diphenylpicryl-hidrazyl) | 26 |
| Ensayo de Capacidad de Absorbancia del Radical Oxígeno (ORAC)..... | 26 |
| Ensayo de actividad de barrido de Óxido Nítrico (NO)..... | 27 |
| Cultivo celular | 28 |
| Descongelamiento celular | 28 |
| Activación de línea celular | 29 |
| Conteo celular | 30 |
| Cinética de crecimiento celular..... | 30 |
| Bioensayos | 32 |
| Preparación de extracto | 32 |
| Viabilidad celular por MTT | 32 |
| Obtención de proteína celular | 34 |
| Ensayo Western Blot para proteínas pro y antiinflamatorias | 34 |
| Ensayo de Apoptosis..... | 36 |
| Análisis estadísticos | 39 |
| Resultados y Discusión..... | 40 |
| Rendimiento de los extractos de <i>F. microphylla</i> | 40 |
| Caracterización química de los extractos de <i>F. microphylla</i> | 40 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Compuestos bioactivos por LC-MS/MS..... | 40 |
| Compuestos bioactivos por GC-MS | 43 |
| Contenido de Fenoles Totales..... | 47 |
| Capacidad antioxidante de <i>F. microphylla</i> | 47 |
| Cinética de crecimiento celular..... | 49 |
| Efecto de los extractos de <i>F. microphylla</i> en la citotoxicidad celular. | 50 |
| Obtención de proteína celular..... | 52 |
| Efecto antiinflamatorio de los extractos de <i>F. microphylla</i> | 53 |
| Efecto apoptótico de los extractos de <i>F. microphylla</i> | 55 |
| Conclusiones | 61 |
| Bibliografía..... | 62 |

LISTA DE CUADROS

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Cuadro 1. Principales especies oxidantes | 5 |
| Cuadro 2. Acitivades biológicas reportadas para especies de <i>Flourensia</i> | 19 |
| Cuadro 3. Concentración de geles de acrilamida para electroforesis | 34 |
| Cuadro 4. Perfil fenólico de extractos de <i>F. microphylla</i> por LC-MS/MS..... | 42 |
| Cuadro 5. Perfil de compuestos identificados en el extracto de etanol por GC-MS..... | 44 |
| Cuadro 6. Perfil de compuestos identificados en el extracto de acetona por GC-MS..... | 46 |
| Cuadro 7. Contenido de Fenoles Totales (TPC) y actividad antioxidante de extractos de <i>F. microphylla</i> | 47 |
| Cuadro 8. Proteína total y proteína a cargar en membranas de bioensayos ... | 52 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Estrés oxidativo | 4 |
| Figura 2. Proceso de inflamación..... | 6 |
| Figura 3. Progresión del cáncer | 8 |
| Figura 4. Características del cáncer | 9 |
| Figura 5. Incidencia de cáncer en México..... | 10 |
| Figura 6. Porciones del colon y tumor de cáncer de colon | 11 |
| Figura 7. Etapas del cáncer de colon..... | 11 |
| Figura 8. Cancer asociado a colitis | 12 |
| Figura 9. Vías de la inflamación relacionada al cáncer..... | 13 |
| Figura 10. Apoptosis | 14 |
| Figura 11. Vías de la apoptosis..... | 15 |
| Figura 12. Semidesierto mexicano..... | 17 |
| Figura 13. Distribución de plantas de <i>Flourensia</i> | 18 |
| Figura 14. <i>Flourensia cernua</i> , <i>in situ</i> | 20 |
| Figura 15. <i>Flourensia microphylla</i> | 21 |
| Figura 16. Localización de colecta..... | 22 |
| Figura 17. Células de cáncer de colon..... | 28 |
| Figura 18. Conteo celular | 30 |
| Figura 19. Placa de 24 pozos. | 31 |
| Figura 20. Cuadrantes de cámara | 31 |
| Figura 21. Cámara de Neubauer | 31 |
| Figura 22. Células sembradas en placa de 96 pozos | 33 |
| Figura 23. Células con reactivo MTT | 33 |
| Figura 24. Separación de proteínas por electroforesis | 35 |
| Figura 25. Protocolo del kit de microarreglos para apoptosis | 39 |
| Figura 26. Cromatogramas de los extractos de <i>F. microphylla</i> | 43 |
| Figura 27. Cinética celular. | 49 |
| Figura 28. Células tratadas con extractos de <i>F. microphylla</i> | 50 |
| Figura 29. Efecto de los extracto en la Actividad Enzimática Mitocondrial de HT-29 por MTT. | 51 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 30. Expresión de proteínas pro y anti-inflamatorias en membranas de nitrocelulosa..... | 53 |
| Figura 31. Efecto de los extractos de <i>F. microphylla</i> en la expresión de proteínas pro-inflamatorias y anti-inflamatoria | 54 |
| Figura 32. Expresión en membranas de marcadores de las vías de apoptosis | 55 |
| Figura 33. Efecto de los extractos en la expresión de las proteínas de la vía intrínseca de la apoptosis | 56 |
| Figura 34. Efecto de los extractos en la expresión de las proteínas de la vía extrínseca de la apoptosis | 57 |
| Figura 35. Expresión de las proteínas del ciclo celular en membranas de microarreglos | 58 |
| Figura 36. Efecto de los extractos de <i>F. microphylla</i> en la activación del arresto al ciclo celular por la expresión de p53, p21 y p27 | 58 |
| Figura 37. Expresión de Caspasas en membranas | 59 |
| Figura 38. Activación de las Caspasas 8 y 3 en células HT-29 tratadas con extractos de <i>F. microphylla</i> | 60 |

RESUMEN

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, ANTIINFLAMATORIA Y APOPTOTICA DE
Flourensia microphylla SOBRE CELULAS DE CÁNCER DE COLON HT-29 *in vitro*.

POR

DENNISE ANAHÍ CARRILLO LOMELÍ
MAESTRÍA EN INGENIERÍA DE SISTEMAS DE PRODUCCIÓN

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRAGRARIA ANTONIO NARRO
DRA. DIANA JASSO CANTÚ– ASESOR

Saltillo, Coahuila

Diciembre 2016

El cáncer de colon es uno de los tipos de cáncer más comunes, causando uno de los mayores problemas de salud mundialmente. En México, el cáncer de colon ocupa el tercer lugar de incidencia. Las especies de *Flourensia* han sido usadas en la medicina tradicional, y recientemente, han sido estudiadas debido a sus propiedades biológicas como antibacterial y antifúngica. Por lo tanto, los objetivos de este trabajo fueron estudiar la actividad antioxidante y los efectos anti-inflamatorios y apoptóticos de dos extractos (etanol y acetona) de *Flourensia microphylla*. Las hojas de *F. microphylla* se colectaron en un sitio silvestre al sureste del estado de Coahuila, México. Los extractos de etanol y acetona fueron preparados y se determinaron el contenido fenólico y actividad antioxidante. Además, la composición química se llevó a cabo por los sistemas LC-ESI-MS/MS y GC-MS. La viabilidad celular se realizó por el ensayo de MTT, evaluándose en células HT-29. Se realizó en ensayo de Western Blot para medir la expresión de los marcadores de inflamación y el ensayo de apoptosis se realizó con micro arreglos de anticuerpos para apoptosis en humanos. Los resultados mostraron que los extractos de *F. microphylla* son una gran fuente de compuestos fenólicos y antioxidantes con efectos anti-inflamatorios y apoptóticos.

Palabras clave.- *Flourensia microphylla*, actividad antioxidante, apoptosis, antiinflamatorio, cáncer de colon.

ABSTRACT

ANTIOXIDANT, ANTIINFLAMMATORY AND APOPTOTIC ACTIVITY OF
Flourensia microphylla ON COLON CANCER CELLS HT-29 *in vitro*.

BY

DENNISE ANAHÍ CARRILLO LOMELÍ
MASTER OF SCIENCE IN PRODUCTION OF SYSTEMS ENGINEERING

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRAGRARIA ANTONIO NARRO
DRA. DIANA JASSO CANTÚ– ASESOR

Saltillo, Coahuila

Diciembre 2016

Colon cancer is one of the most common cancer types, causing one of the major health problems worldwide. In Mexico, colon cancer occupies third place on incidence. *Flourensia* species have been used in the traditional medicine, and recently, these have been studied due to their biological properties such as antibacterial and antifungal. Therefore, the aims of this work were to study the antioxidant, anti-inflammatory and apoptotic effects from two extracts (ethanol and acetone) from *Flourensia microphylla*. The leaves of *F. microphylla* were collected in a wild site at Southeast of Coahuila, Mexico. The ethanol and acetone extracts were prepared and the phenolic content and antioxidant activity were determined. Also, the chemical composition was carried out by LC-ESI-MS/MS and GC-MS. Cellular viability was performed by MTT method and evaluated on HT-29 cells. Western analysis was carried out to measure the inflammatory markers expression and apoptotic assay was conducted with a Human apoptosis antibody array. Results showed that *F. microphylla* extracts are a great source of phenolic and antioxidant compounds with anti-inflammatory and apoptotic effects.

Keywords.- *Flourensia microphylla*, antioxidant activity, apoptosis, anti-inflammation, colon cancer.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad genética que resulta de una serie de cambios dinámicos, donde una célula normal es transformada a una maligna, que empieza a crecer descontroladamente hasta invadir un órgano (Hanahan and Weinberg, 2000). Hoy en día, el cáncer es uno de los principales casos de mortalidad en el mundo (Bayala et al., 2014), siendo el cáncer de colon uno de los tipos más comunes. En México, el cáncer de colon ocupa el tercer lugar de incidencia (World Health Organization, 2014) y mundialmente es reconocido como uno de los principales problemas de salud pública (Altobelli et al., 2014).

Existe información sobre la importancia que tiene la inflamación en el desarrollo y la progresión del cáncer (Grivennikov et al., 2010). La inflamación es un proceso biológico de defensa y reparación del sistema inmunológico para proteger un organismo en contra de agentes nocivos, como patógenos, químicos tóxicos e irritantes y células dañadas (Jungbauer and Medjakovic, 2012), pero la desregulación de este componente del sistema inmune (ej. inflamación crónica) predispone al organismo a diversos tipos de cáncer (Colotta et al., 2009) siendo la inflamación crónica del intestino, conocida como colitis ulcerativa, un factor de riesgo para el desarrollo del cáncer de colon (Grivennikov, 2013).

Existen diversos procesos biológicos inducidos para combatir el cáncer, siendo la apoptosis uno de los principales y definiéndose como un tipo muerte celular programada (Watson, 2004). La muerte celular apoptótica se caracteriza por controlar la auto digestión de la célula (Tormo et al., 2009) hasta provocar la muerte de células malignas.

La investigación en productos herbales ha sido de gran interés, debido a los beneficios terapéuticos de las plantas (Sánchez-Burgos et al., 2013). Dentro de estos productos se encuentran los extractos vegetales, que han sido ampliamente analizados por sus propiedades biológicas (Amirghofran et al., 2009) y como una fuente efectiva de agentes antiinflamatorios (Conforti et al., 2008) y anticancerígenos (Moreno-Jimenez et al., 2015), lo cual se puede atribuir a sus compuestos fenólicos y flavonoides. Los polifenoles son metabolitos

secundarios de las plantas conocidos por su actividad antioxidante y por limitar el riesgo de diversas enfermedades degenerativas asociadas con el estrés oxidativo (Rocha-Guzmán et al., 2009). Además, este grupo de compuestos han mostrado, entre sus funciones, estar relacionadas a la modulación de la carcinogénesis (Dai and Mumper, 2010).

México ocupa el 4 lugar entre los países más ricos en el mundo en relación a variedad de plantas (Jasso De Rodríguez et al., 2011). Entre esta variedad se encuentran las plantas de las regiones semiáridas de México, las cuales forman parte de una gran fuente de compuestos antioxidantes (Salazar et al., 2008). Una de las especies de plantas más estudiada en la región semiárida de México es la del género *Flourensia*. Las plantas pertenecientes a éste género han mostrado importante actividad biológica como: insecticida (Diaz Napal et al., 2009; García et al., 2007), antibacterial (Joray et al., 2011), anti-fúngica (De León et al., 2013) y herbicida (Silva et al., 2012). En México, crecen silvestres en el estado de Coahuila 3 especies de *Flourensia*, entre ellas la *Flourensia microphylla* (Gray) S.F. Blake [Encelia m. Gray], planta de la cual existen escasos reportes sobre su actividad biológica. Jasso de Rodríguez et al. (2007), reportaron actividad anti-fúngica del extracto etanólico de *F. microphylla*, *in vitro*, sin embargo no existe ningún reporte en la literatura sobre la composición química de la planta ni estudios sobre los efectos anticancerígenos y antiinflamatorios de *F. microphylla* sobre líneas celulares humanas.

Justificación

El presente trabajo de investigación surge de la necesidad de buscar alternativas terapéuticas en las plantas medicinales del semidesierto mexicano para tratamientos anti-inflamatorios y anticancerígenos naturales, realizando evaluación en la bioactividad de los compuestos de la planta *F. microphylla*.

Con base en los antecedentes mencionados, se establece lo siguiente:

Objetivo general

Caracterizar e identificar los compuestos químicos de *F. microphylla* y evaluar su actividad antioxidante y efectos antiinflamatorio y apoptótico *in vitro* sobre células de cáncer de colon HT-29.

Objetivos específicos

- Identificación de compuestos bioactivos de *F. microphylla*
- Determinar la composición fenólica de extractos de *F. microphylla*
- Determinar la actividad antioxidante de los extractos de *F. microphylla*
- Evaluar el efecto de los extractos de *F. microphylla* sobre la funcionalidad mitocondrial.
- Evaluar el efecto antiinflamatorio de los extractos de *F. microphylla* en células de cáncer de colon HT-29.
- Evaluar la función inhibitoria de los extractos de *F. microphylla* sobre la proliferación de la línea celular HT-29 (cáncer de colon) en un modelo *in vitro*.

REVISIÓN DE LITERATURA

Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se puede definir como el desequilibrio en la producción o degradación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Mishra and Samanta, 2012), las cuales son parte del sistema de defensa de un organismo, pero su producción excesiva puede provocar daño celular al interactuar con biomoléculas (Cachofeiro et al., 2008), provocando el desarrollo de diversas enfermedades. Lushchak (2011) define al estrés oxidativo como “Una situación en la que el estado de equilibrio de concentración de ROS es transitoria o crónicamente mejorada, alterando al metabolismo, dañando o regulando los constituyentes celulares” (Figura. 1). Gran parte del estrés oxidativo se genera como un subproducto de los procesos metabólicos esenciales producidos constantemente (Garrett et al., 2010).

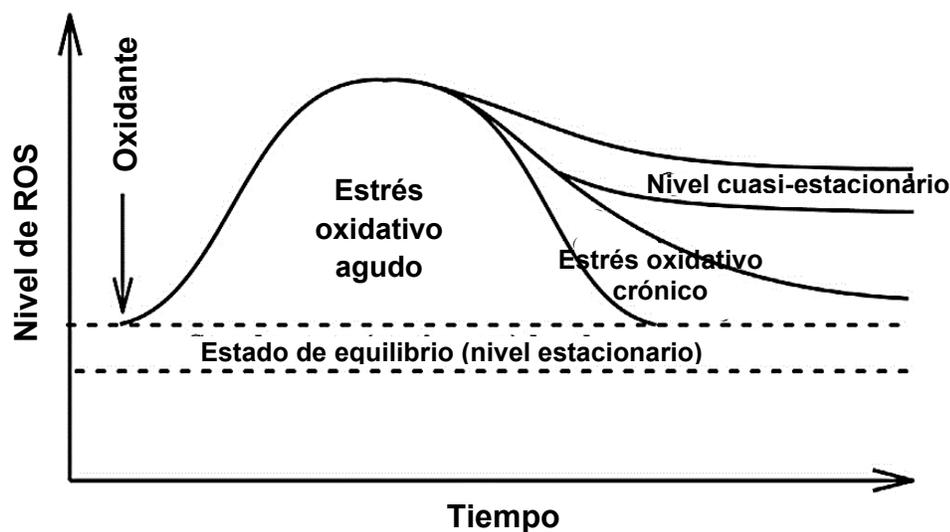


Figura 1. Estrés oxidativo

Las ROS son producidas en sitios celulares por medios de transferencias de electrones a través de procesos enzimáticos y no enzimáticos (Valavanidis et al., 2013), y en el estado del estrés oxidativo, la producción enzimática excesiva de ROS excede la disponibilidad de la defensa de sistemas antioxidantes (Li et al.,

2013). La capacidad antioxidante está relacionada con la presencia de compuestos capaces de proteger un organismo en contra del daño oxidativo (Figueroa Pérez et al., 2014). Los polifenoles son capaces de expulsar ROS como OH y NO a través de mecanismos de donación de electrones (Rosales-Castro et al., 2012). Las ROS y otros radicales generados por reacciones oxidativas se producen durante una función normal celular (Kathiria et al., 2012) y están involucrados en la carcinogénesis e inflamación (Kohen and Nyska, 2002). Birben et al. (2012) reportaron que las ROS pueden ser divididas en dos grupos: radicales libres y no radicales y resume las 3 ROS principales en el Cuadro 1. Schieber and Chandel (2014) reportan que el estrés oxidativo está más asociado con la acumulación de aniones superóxidos que con especies redox.

Cuadro 1. Principales especies oxidantes

| Oxidante | Fórmula | Ecuación de reacción |
|-----------------------|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Anión superóxido | O_2^- | $NADPH + 2O_2 \leftrightarrow NADP^+ + 2O_2^- + H^+$ $2O_2^- + H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$ |
| Peróxido de hidrógeno | H_2O_2 | Hipoxantina + H_2O + $O_2 \leftrightarrow$ xantina + H_2O_2 Xantina + H_2O + $O_2 \leftrightarrow$ ácido úrico + H_2O_2 |
| Radical hidroxil | $\bullet OH$ | $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + \bullet OH$ |
| Ácido hipocloroso | HOCL | $H_2O_2 + Cl^- \rightarrow HOCl + H_2O$ |
| Radicales peroxil | $ROO\bullet$ | $R\bullet + O_2 \rightarrow ROO\bullet$ |
| Radical hidroperoxil | $HOO\cdot$ | $O_2^- + H_2O \leftrightarrow HOO\cdot + OH^-$ |

El campo de investigación del estrés oxidativo abarca diversas ramas como la bioquímica y biología celular, sin embargo todas van encaminadas hacia la investigación de enfermedades (Sies, 2015).

La inflamación

La inflamación (Figura 2) es un proceso biológico de defensa y reparación del sistema inmunológico. En este proceso se activa una red de señales químicas que inician la respuesta de protección en un organismo para sanarlo (Coussens and Werb, 2002), controlando el daño provocado por agentes nocivos. Los componentes del proceso inflamatorio están involucradas en un sistema biológico complejo, en el cual, además de reparar cambios, interactúan con sistemas fisiológicos anti-inflamatorios (Vodovotz et al., 2009) dificultando el proceso de defensa inmunológica, promoviendo, o incluso iniciando enfermedades malignas (Balkwill et al., 2005).

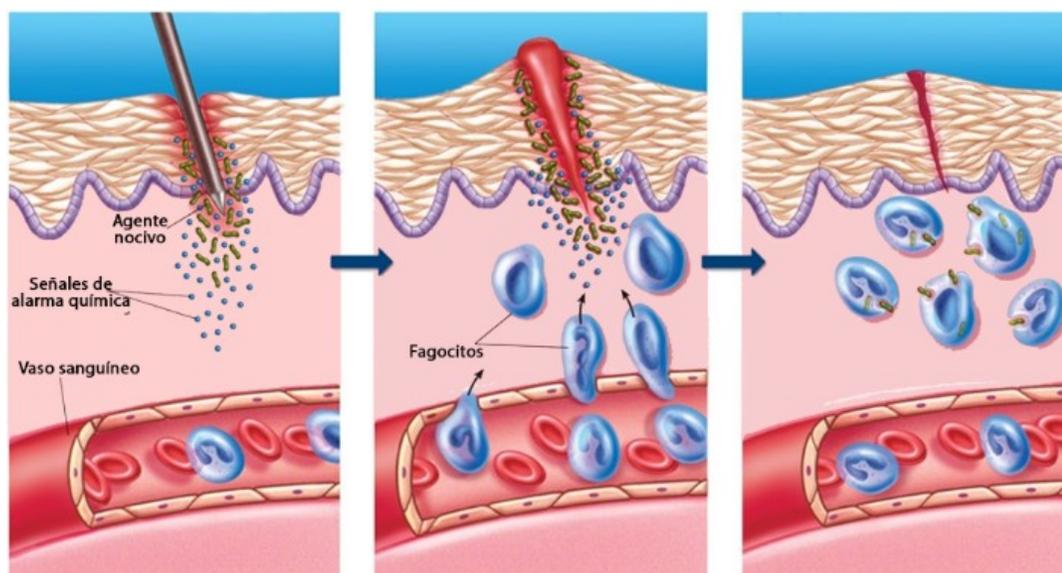


Figura 2. Proceso de inflamación

Existen diversos mediadores en el proceso de inflamación como lo son las citoquinas, factores nucleares como NF- κ B, el óxido nítrico (ON) y prostaglandinas (Wen et al., 2012). Durante el proceso anti-inflamatorio, se liberan citoquinas pro-inflamatorias como TNF e IL-18, y citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 al mismo tiempo para controlar y balancear el estado de inflamación en un organismo (Mueller et al., 2010; Turner et al., 2010). Las citoquinas inflamatorias

son inductoras de las quimosinas, las cuales tienen un papel importante en la inflamación (Balkwill and Mantovani, 2001). Los factores de transcripción también son de gran importancia en la regulación de la inflamación (Moreno-Jiménez et al., 2015a). En particular, NF- κ B es un factor de transcripción importante induciendo y regulando la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, inhibiendo quimosinas como COX, mejorando la inflamación (Jungbauer and Medjakovic, 2012). COX-1 es una proteína importante responsable de la protección de la mucosa del tracto gastrointestinal, mientras que COX-2 es un mediador de su inflamación (Díaz-Rivas et al., 2015). Por otro lado, IL-8 y TNF- α son consideradas proteínas importantes debido a que pueden iniciar el proceso inflamatorio, además de mediar la respuesta de la inflamación temprana, generando señales que inducen la liberación de NF- κ B (Cooks et al., 2013; Maniati et al., 2011).

La desregulación de la inflamación se transforma en inflamación crónica, predisponiendo al organismo a diversos tipos de enfermedades (Aparna et al., 2012; Colotta et al., 2009; Mantovani et al., 2008), siendo un factor de riesgo para el desarrollo de diversos tipos de cáncer.

El cáncer

El cáncer es una enfermedad genética que puede aparecer en cualquier lugar del cuerpo, resultando de una sucesión de cambios genéticos irreversibles en los que una célula normal es transformada en una célula maligna (Hanahan and Weinberg, 2000; van Kempen et al., 2006), la cual comienza a multiplicarse rápidamente, extendiéndose más allá de sus límites habituales hasta invadir partes del cuerpo y propagarse a otros órganos. El proceso que dirige la progresión del cáncer es evolucionario (Figura 3), en dicho proceso la selección natural actúa sobre la diversidad inherente o adquirida de células somáticas, favoreciendo la derivación y progresión en aquellos tipos de cáncer que cuentan con ventajas de propagación (Evan and Vousden, 2001).

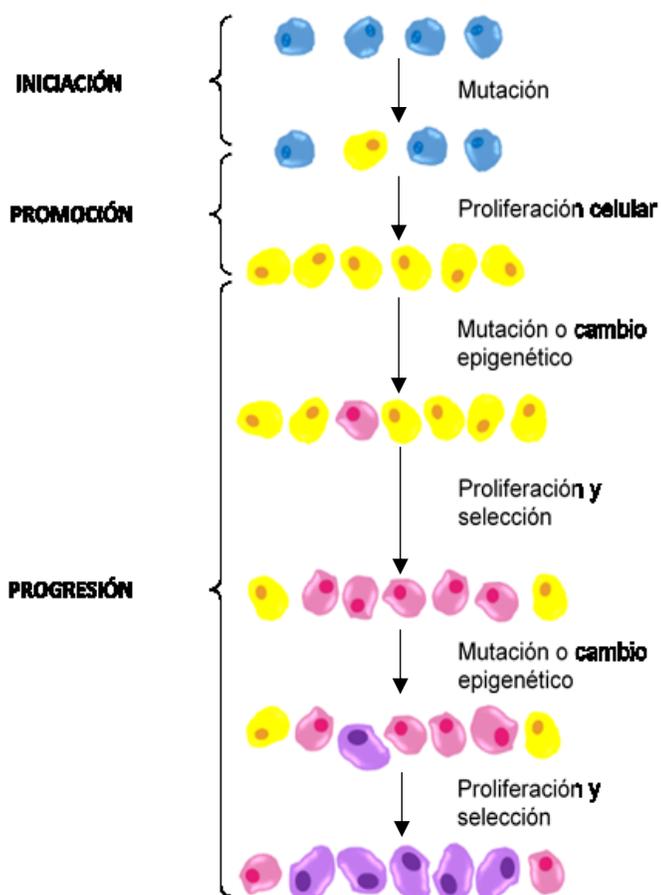


Figura 3. Progresión del cáncer

Hanahan and Weinberg (2011) ilustran las características del cáncer (Figura 4), ampliando las características que reportaron en el año 2000. Es importante conocer las ideas e investigaciones acerca de cómo se desarrollan los tipos de cáncer en humanos y que genotipos se adquieren para que una célula normal se convierta en maligna (Watson, 2004), de este modo se puede profundizar más en estudios sobre la prevención en un tipo de cáncer en particular.

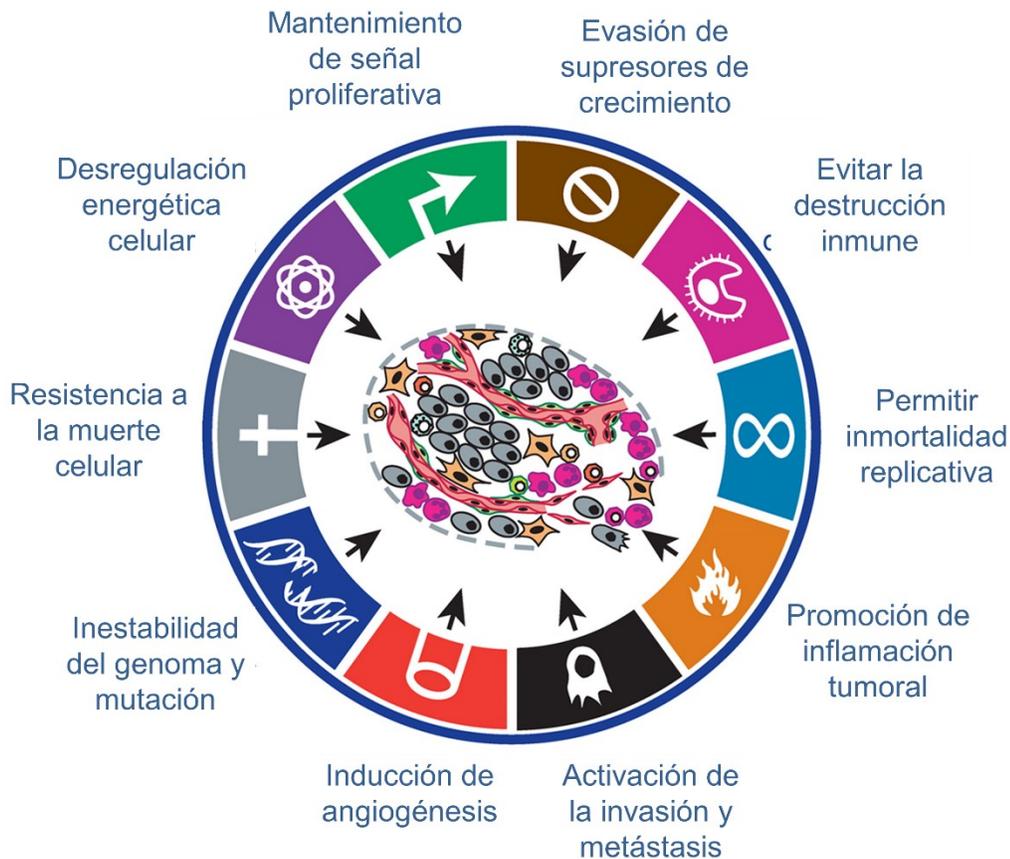


Figura 4. Características del cáncer

El cáncer de colon

Hoy en día, el cáncer es uno de los principales casos de mortalidad en el mundo (Bayala et al., 2014), siendo el cáncer de colon uno de los tipos más comunes, colocándose en los principales problemas de salud pública (Altobelli et al., 2014). En México, el cáncer de colon ocupa el tercer lugar de incidencia con un número de casos de 4,656 en hombres y 3,995 en mujeres (Figura 5); sin embargo, para el año 2014 no se registraron muertes por cáncer de colon en el género femenino, solamente para el género masculino con una cantidad de 2,407 muertes (World Health Organization, 2014).

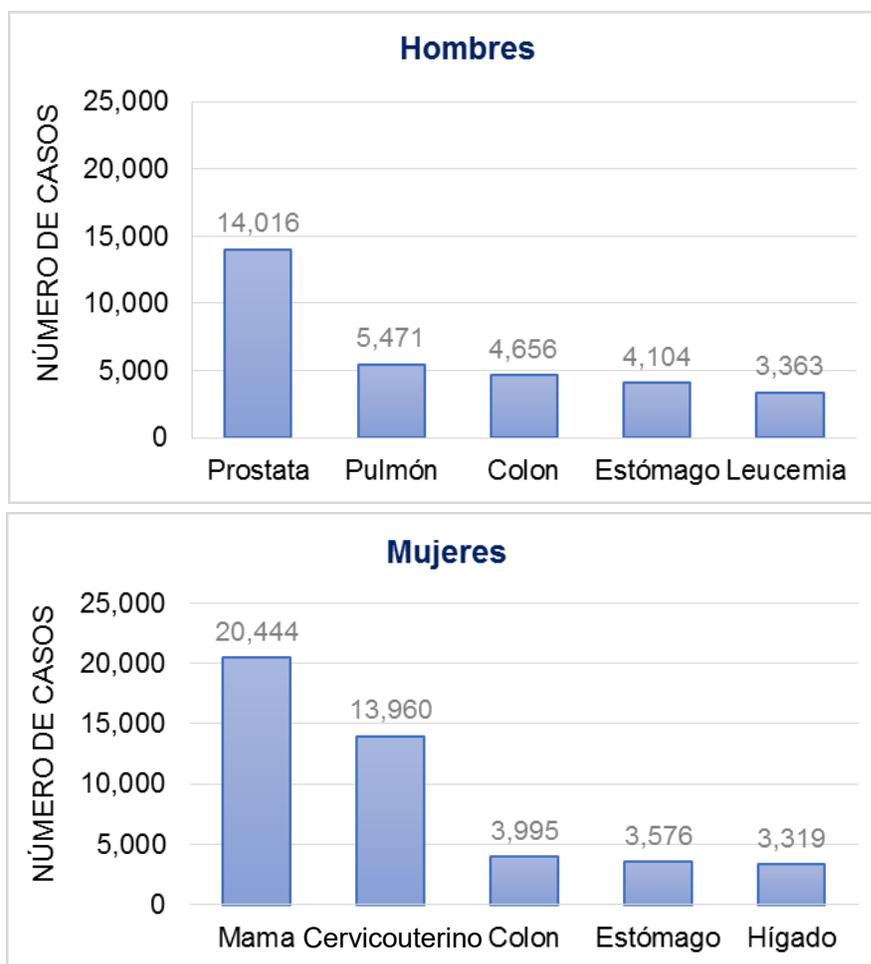


Figura 5. Incidencia de cáncer en México

El cáncer de colon se puede originar en cualquiera de las cuatro porciones del colon (Figura 6). Este tipo de cáncer se desarrolla a través de un proceso en el cual la mucosa normal del colon se transforma en un pólipo adenomatoso (Aggarwal et al., 2013) hasta llegar a convertirse en un tumor canceroso (Figura 7).

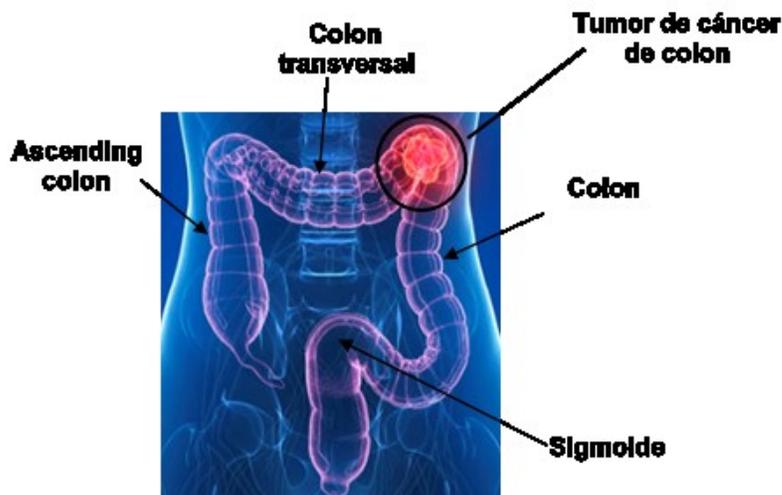


Figura 6. Porciones del colon y tumor de cáncer de colon

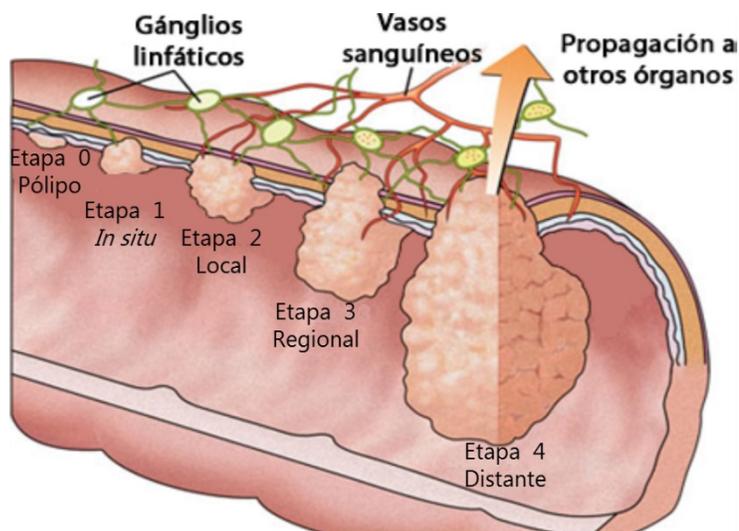


Figura 7. Etapas del cáncer de colon

La inflamación y el cáncer de colon

Existe información acerca del papel que juega la inflamación crónica en el desarrollo y la progresión del cáncer (Balkwill et al., 2005; Candido and Hagemann, 2013; Elinav et al., 2013). Es evidente que las células inflamatorias y las citoquinas que producen tienen efectos en el desarrollo de tumores, regulando el crecimiento y la migración de las células (Coussens and Werb, 2002). Las células inflamatorias que se infiltran en los tumores pre-malignos

pueden estar diferencialmente compuestas de diversas poblaciones de leucocitos, lo cual depende de la etapa del desarrollo del tumor (van Kempen et al., 2006).

El cáncer asociado con inflamación crónica, al igual que otros tipos, es caracterizado por la alteración de la regulación del crecimiento normal celular, resultando en una alteración epigenética, formando tumores (Rubin et al., 2012). Entre los factores de la inflamación crónica que incrementan la progresión del cáncer se encuentran infecciones, condiciones inflamatorias de un origen incierto (ej. Prostatitis para cáncer de próstata) y enfermedades autoinmunes, como la inflamación del intestino (Colotta et al., 2009). La inflamación crónica del intestino (ICI), conocida como colitis ulcerativa, es asociada con la formación y desarrollo del cáncer de colon (Figura 8) (Grivennikov, 2013).

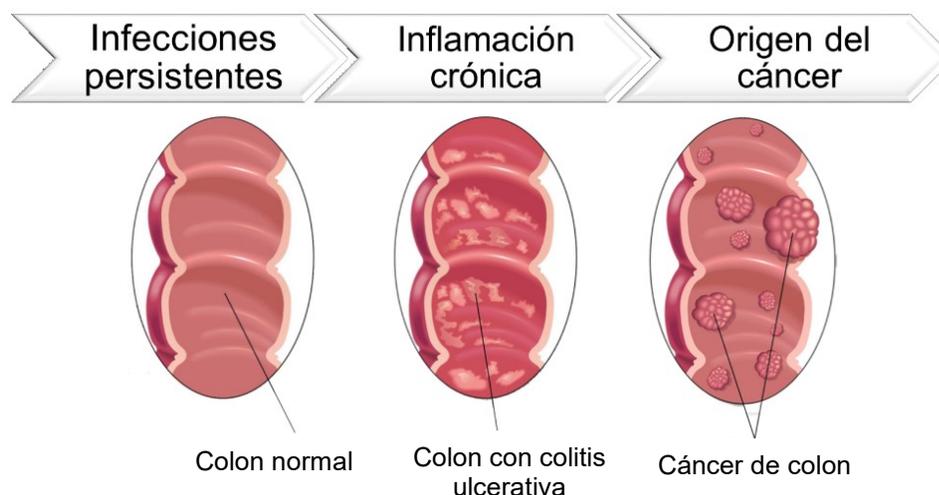


Figura 8. Cáncer asociado a colitis

El cáncer y la inflamación están conectados por dos tipos de vías (Figura 9): la vía intrínseca, activada por eventos genéticos causantes de neoplasia y la extrínseca, activada por condiciones inflamatorias o de infección; ambas vías resultan en la activación de los factores de transcripción (Mantovani et al., 2008). Diversos estudios sugieren que las células inflamatorias y su asociación con mediadores como las interleucinas (IL), TNF- α y ROS favorecen el desarrollo del

cáncer de colon, aumentando el daño en el ADN de las células epiteliales (Danese and Mantovani, 2010).

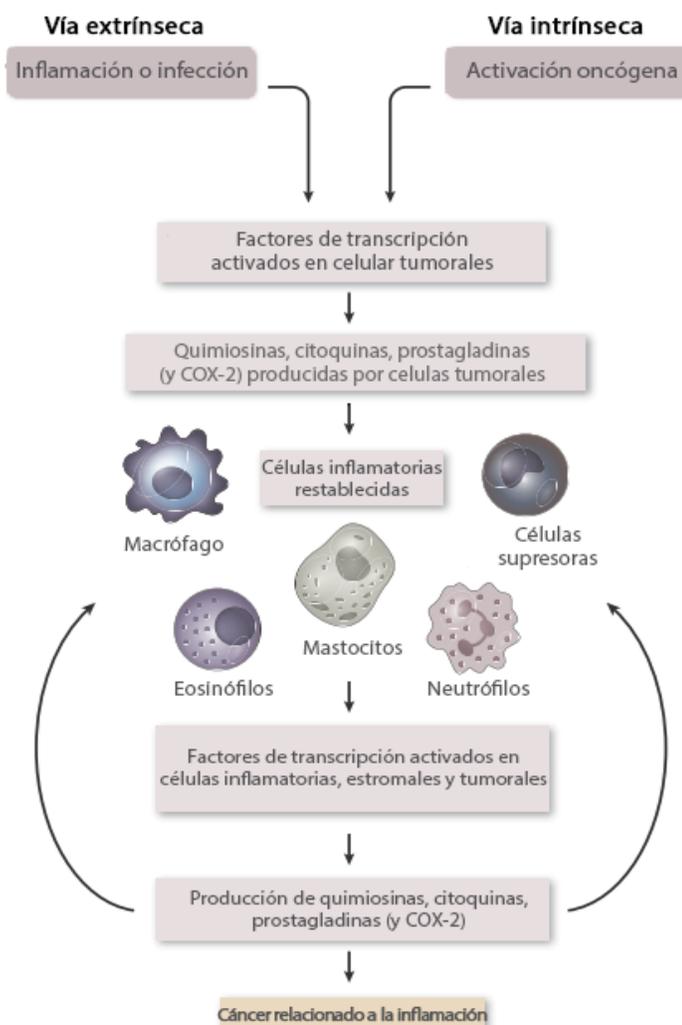


Figura 9. Vías de la inflamación relacionada al cáncer

Apoptosis

Existen diversos procesos inducidos para combatir el cáncer, siendo la apoptosis uno de los principales. Apoptosis es un tipo de muerte celular programada y ha sido uno de los procesos más estudiados debido a que juega un papel muy importante en el tratamiento del cáncer de colon (Watson, 2004). Una característica notable de la muerte celular apoptótica es el control de la

autodigestión celular (Tormo et al., 2009). Este proceso es regulado por mecanismos moleculares que activan un programa estereotipado (Manosroi et al., 2012) cuyo objetivo es causar la muerte de células malignas (Figura 10).

El proceso de apoptosis está dividido en 3 fases, en donde en la primera y segunda fase la función de la membrana celular se conserva intacta, hasta llegar a la tercera fase, donde las membranas celulares se degeneran progresivamente (Ishikawa and Kitamura, 2000).

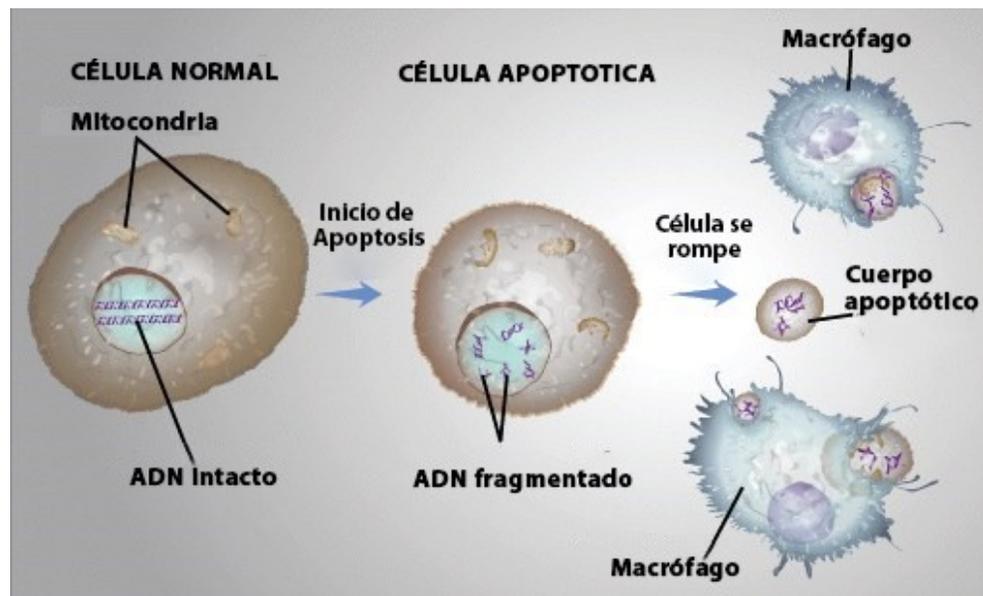


Figura 10. Apoptosis

En la apoptosis, existen dos procesos comúnmente descritos que activan las caspasas (Figura 11): vía intrínseca (o mitocondrial) y vía extrínseca (o receptor de muerte); ambas vías conducen a la fase de ejecución apoptótica (Wong, 2011). La vía extrínseca es activada por receptores de muerte, uniéndose a lazos específicos para transmitir las señales apoptóticas, los lazos incluyen moléculas de la familia TNF, las cuales se secretan como homotrinas y se unen a miembros de la familia TNF-R (receptores), incluyendo TNFR-1, Fas and TRAIL (Mukhopadhyay et al., 2014).

La vía intrínseca apoptótica es conducida por diversos estímulos (ej. daño al ADN, estrés oxidativo) coincidiendo en la mitocondria, la cual se controla por diversos miembros de la familia Bcl-2; siguiendo una cadena hasta regularse en dos sitios: liberación del citocromo c de la mitocondria y la activación de las caspasas (Giansanti et al., 2011).

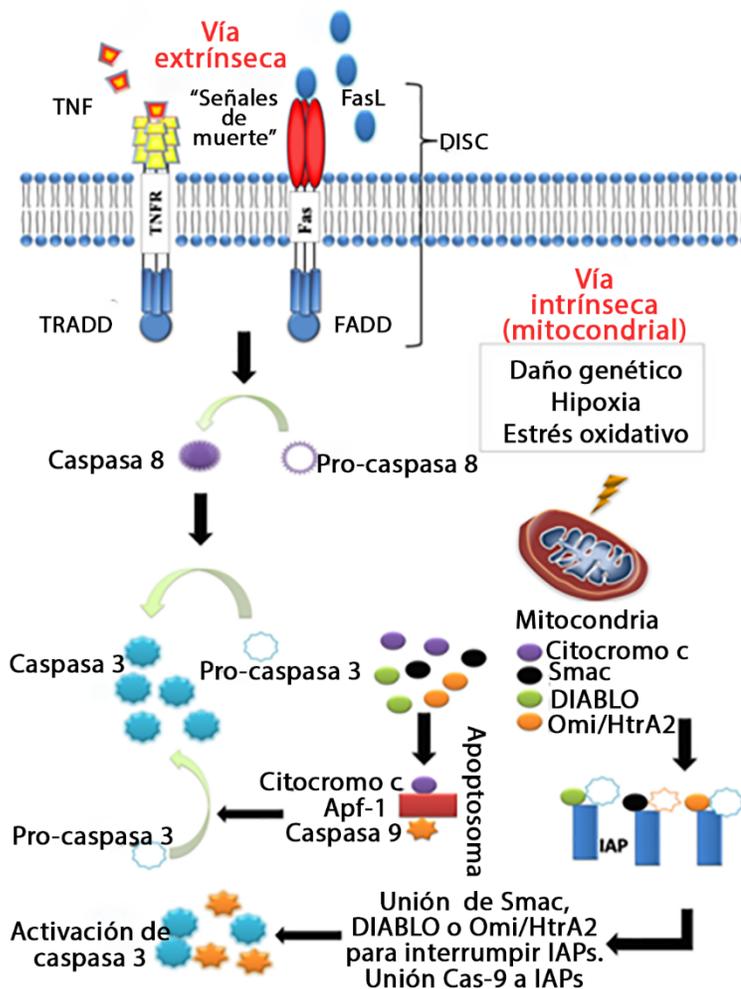


Figura 11. Vías de la apoptosis

Productos medicinales naturales

Actualmente en los tratamientos para el control del cáncer se utilizan medicamentos químicos sintéticos que resultan agresivos para el organismo humano y ocasionan efectos secundarios que se manifiestan con trastornos

humanos. Por lo anterior, existe un interés renovado por la búsqueda de metabolitos secundarios de las plantas, que pueden utilizarse como una fuente de agentes naturales quimio protectores.

Por miles de años, las plantas han sido usadas como remedio natural en el tratamiento de diversas enfermedades. Recientemente ha habido un incremento de interés en la investigación de propiedades biológicas del reino vegetal debido a los compuestos fitoquímicos que se han encontrado, estas propiedades han estado ligadas en el control de enfermedades tanto en humanos como en cultivos vegetales. El estudio sobre productos naturales herbales ha sido de gran interés en muchas investigaciones debido a sus beneficios terapéuticos (Sánchez-Burgos et al., 2013). Considerando que los extractos de las plantas contienen una matriz de compuestos que pueden beneficiar al organismo humano fortaleciendo el sistema inmunológico a través de compuestos antioxidantes que regeneran las células, se han realizado numerosos estudios sobre estos productos herbales, analizando ampliamente sus actividades y propiedades biológicas (Amirghofran et al., 2009), principalmente por ser una fuente efectiva de agentes anti-inflamatorios (Conforti et al., 2008; Mueller et al., 2010) y anticancerígenos (Moreno-Jimenez et al., 2015).

Las plantas medicinales del semidesierto Mexicano y sus extractos.

En México, al menos el 37% de la población utiliza plantas medicinales, en las cuales se han realizado estudios científicos, demostrando que muchas de estas plantas poseen propiedades antioxidante y anti-inflamatorias (Díaz-Rivas et al., 2015). Más de la mitad del territorio Mexicano tiene un clima árido o semiárido (Aguirre-Garrido et al., 2012) y es en estas regiones donde existen miles de especies de plantas identificadas, muchas de ellas endémicas de México (Figura 12). Estas plantas contienen una gran fuente de compuestos antioxidantes (Wong Paz et al., 2015), los cuales desarrollan principalmente debido a su habilidad para crecer bajo condiciones climáticas extremas (Adame and Adame, 2000).

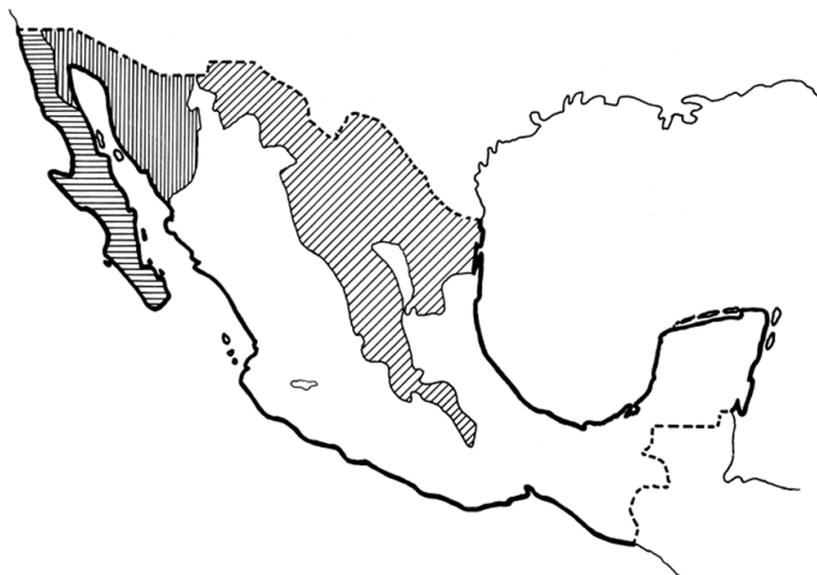


Figura 12. Semidesierto mexicano

Las plantas del semidesierto mexicano son saludables debido a su densidad y especialización biológica (Castillo et al., 2010). A lo largo del tiempo, se han realizado diversos estudios en donde este tipo de plantas han mostrado tener la capacidad de ser una alternativa a la medicina que se consume hoy en día, esto lográndose gracias a la obtención de extractos herbales que tienen una actividad antioxidante alta y una de las mayores fuentes de polifenoles naturales. Estos extractos pueden ser mejorados a través de un proceso de fermentación para incrementar la actividad biológica de las sustancias con alto potencial bioactivo (De León et al., 2013). Recientemente, los compuestos químicos de las plantas de la región semiárida de México han sido ampliamente estudiados ya que han logrado desarrollar agentes contra diversos microorganismos fitopatógenos y actividad anti-fúngica en relación a hongos de post-cosecha (Jasso De Rodríguez et al., 2011), así como actividad antitumoral en modelos de células de cáncer de colon (Keller et al., 2015). Entre las plantas del semidesierto mexicano que han sido estudiadas se encuentran las del género *Flourensia*.

El género *Flourensia* y su distribución

El género *Flourensia* (Asteraceae) incluye cerca de 40 especies de plantas que se encuentran distribuidas en el continente Americano (Figura 13), habitando en zonas áridas y semiáridas. En México, se encuentran distribuidas 9 especies de *Flourensia* en el centro y norte del país, de las cuales 3 son endémicas del estado de Coahuila: *Flourensia cernua*, *Flourensia microphylla* y *Flourensia retinophylla* (Jasso de Rodríguez et al., 2007). Las plantas de *Flourensia* son arbustos resinosos caracterizados por la superficie de sus hojas, las cuales están cubiertas con una película cerosa. Otra característica notoria de este género de arbustos es la abundancia de flores amarillas con las que cuentan (Delbón et al., 2012).



Figura 13. Distribución de plantas de *Flourensia*

El género *Flourensia* ha cobrado importancia en el mundo de la investigación debido a la gran cantidad de metabolitos secundarios que posee y por lo cual se han realizado estudios a diferentes especies de plantas pertenecientes a éste género, reportando diversas actividades biológicas (Cuadro 2).

Cuadro 2. Actividades biológicas reportadas para especies de *Flourensia*.

| Especie | Actividad | Autores |
|-----------------------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| <i>F. cernua</i> , | Antifúngica, antitermitas, antialgas | (De León et al., 2013; Jasso de Rodríguez et al., 2007; Tellez et al., 2001) |
| <i>F. retinophylla</i> , <i>F. microphylla</i> . | antifúngica | (Jasso de Rodríguez et al., 2007) |
| <i>F. oolepis</i> | Insecticida, herbicida, antibacterial | (Diaz Napal et al., 2009; García et al., 2007; Joray et al., 2011) |
| <i>F. campestris</i> | Inhibidor de germinación | (Silva et al., 2012) |
| <i>F. riparia</i> <i>F. fiebrigii</i> | Anti-larva | (Reyes et al., 2013) |



Figura 14. *Flourensia cernua*, in situ

Las especies de *Flourensia*, como la *F. cernua* (Figura 14), conocida como hojaseén, son reconocidas en la medicina tradicional mexicana debido a sus propiedades curativas como purgante, expectorante, antirreumática y para aliviar enfermedades gastrointestinales (Mata et al., 2003).

Flourensia microphylla

Flourensia microphylla (Gray) S.F. Blake [Encelia m. Gray] es una planta endémica del noreste mexicano. La planta de *F. microphylla* (Figura 15) es un arbusto ramificado, de entre 0.5 y 1 m de altura con tallos cafés y corteza estriada (Dillon, 1984). Existen escasos reportes sobre la actividad biológica de *F. microphylla*, Jasso de Rodríguez et al. (2007), reportaron actividad anti-fúngica del extracto etanólico de *F. microphylla*, *in vitro* contra *Alternaria* sp., *Rhizoctonia solani* y *Fusarium Oxysporum*, sin embargo no existe ningún reporte en la literatura sobre la composición química de la planta ni estudios sobre los efectos anticancerígenos y antiinflamatorios de la planta sobre líneas celulares humanas.



Figura 15. *Flourensia microphylla*

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de plantas

Los tallos con hojas de *F. microphylla* fueron obtenidos en la Sierra de Carneros, Coahuila (Figura 16) el día 23 de Julio del 2015. Las muestras se depositaron en bolsas de polietileno negras de 90 x 200 cm y se transportaron al laboratorio de Fitoquímica de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN). Inmediatamente se separaron las hojas de los tallos y se secaron en un horno (Mapsa, México) a 40°C por 24 h. Posteriormente se molieron las hojas en un molino (Thomas Wiley, USA) con un tamiz de 2 mm, se mezclaron las hojas molidas y se guardaron en bolsas de papel estraza las cuales a su vez se colocaron en un lugar seco.

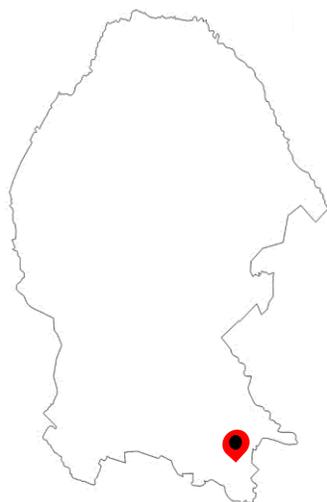


Figura 16. Localización de colecta

Reactivos químicos y material biológico

Metanol, etanol, acetonitrilo y ácido fórmico (grado HPLC) se obtuvieron de J.T. Baker (Toluca, México). Etanol, acetona, catequina, rutina, 2,2-diphenyl 1-picrylhydrazyl (DPPH), reactivo de Griess (1% sulfanilamide, 0.1% naftiletilediamina dicloro y 3% ácido fosfórico), nitropósido de sodio (SNP), 2,2-azobis(2-amidino-propanol) (AAPH) Dubelccós Modified Eagles Medium

(DMEM), 3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2 tetrazolium bromide (MTT), dimetil sulfóxido (DMSO), reactivo Folin-Ciocalteu, tripsina, penicilina, estreptomycin, flavan-3-ol, flavanoles, ácido elágico y derivados de ácido cafeoilquínico fueron obtenidas de Sigma Chemical (MO, USA). Suero fetal bovino (SFB) fue obtenido de Bio-West (Kansas City, MO, USA). Anticuerpos para cyclooxygenasa 1 (COX-1, sc-1752), cyclooxygenasa 2 (COX-2, sc-1745), tumor necrosis factor alfa (TNF α , sc-1350), nuclear factor kappa B (NF- κ B p65, sc-372), interleucina 8 (IL-8, sc-7922), human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, sc-25778), anticuerpo secundario mouse anti-goat IgG-Aps (c-2355) fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology (CA, USA). Reactivos para electroforesis y el kit de Fosfatasa Alcalina Conjugada con Substrato, de Bio-Rad Laboratories (CA, USA).

La línea celular de cáncer de colon HT-29 (ATCC® HTB-38™) se obtuvo del banco del Laboratorio de Alimentos Funcionales y Nutraceuticos del Instituto Tecnológico de Durango, adquirida de la American Type Culture Collection (ATCC).

Obtención de extractos

Para obtener el extracto etanólico, se trataron 115 g de hojas molidas fueron mezcladas por agitación (72 h, 150 rpm) en una parrilla de agitación (Cimarec, Barnstead Thermolyne, Iowa, USA) con 1250 mL de etanol en un frasco ámbar a temperatura ambiente. El extracto fue centrifugado (Damon/IEC, MA, USA) a 4000 rpm durante 30 min y posteriormente fue filtrado (Whatman no. 1). Posteriormente el solvente se removió bajo vacío usando un rota evaporador (Büchi Laboratoriums-Technik. Schweiz), el solvente remanente se eliminó colocando el matraz en un horno de secado por 24 h. El extracto de acetona se obtuvo mezclando 500 mg de hoja molida con una solución de acetona:agua (70:30) durante 1 min usando un Ultra-Turrax (IKA T18 basic, Staufen, Germany) y posteriormente se sonicó (Branson Ultrasonic cleaner, 5510 R-MT, USA) por 15 min. Después, el extracto fue centrifugado por 15 min a 4,000 rpm para recuperar el sobrenadante y repetir el proceso dos veces más. Finalmente se

recuperaron los líquidos en un solo matraz y se eliminó el solvente en un rotaevaporador. Ambos extractos se liofilizaron (Labonco, Kansas City, MO, USA). Los extractos fueron preservados en recipientes ámbar y en un lugar seco hasta su uso.

Análisis de composición química

La identificación de compuestos bioactivos de los extractos de *F. microphylla* se realizó por cromatografía de líquidos y cromatografía de gases, ambos sistemas acoplados a masas.

Caracterización química por cromatografía de líquidos acoplada a masas (LC-MS/MS)

Los extractos liofilizados de *F. microphylla* (5 mg) fueron solubilizados en 1 mL de metanol. Posteriormente, se inyectó 1 µL de la muestra en un sistema LC-MS/MS. El análisis de las muestras se llevó a cabo con un sistema de Acquity UPLC (Waters Corp., Milford, MA, EE.UU.) acoplado a un espectrómetro de masas con un tándem de detector MS triple cuadrupolo Xevo TQ-S (Waters Corp). El sistema LC consistió en un gestor de muestra (20° C) y un gestor de disolvente binario. La columna utilizada para la determinación de flavan-3-ol, flavanoles, ácido elágico y derivados del ácido cafeoilquínico fue una Acquity UPLC BEH C8 150 mm X 2.1 X 1.7µm (Waters Corp., MA, USA) operada a 20-40 ° C. El perfil de elución utilizado para la determinación incluyó dos disolventes: agua acidificada con ácido fórmico 1% (v/v) (A) y acetonitrilo (B); al inicio 98% de A en B; 0-2 min, 68% de A en B; 2 - 3.8min, 55% de A en B; 3.8 - 4.5 min 45% A en B, 4,5 - 6.0min 5% en B (gradiente lineal) el lavado de la columna y posteriormente, 6.0 -9.5 min, 98% de A en B y la estabilización de la columna. Los datos de MRM se tomaron desde 0 a 9.5 min. Se empleó el modo de ionización negativo para los ensayos de MS. Las condiciones ESI fueron las siguientes: Voltaje de capilar 2.85 kV; temperatura de desolvatación 500 ° C; temperatura de la fuente, 150 ° C; flujos de gas de desolvatación y de cono, 794L / h y 151L / h, respectivamente, y gas de colisión, 0.14 mL / min. La rutina (20 ng

/ L) se utilizó para controlar la estabilidad de la eficiencia de ionización del espectrómetro de masas y una mezcla de diferentes compuestos fenólicos (20 ng / L) se utilizó para monitorear en tiempo de retención y los valores de m / z. Para la cuantificación de la curva de los flavonoides se empleó un estándar de rutina. El procesamiento de control y datos del espectrómetro UPLC y del tándem Xevo TQ-S de triple cuadrupolo de masas se realizaron con el software MassLinx (Waters Corp.).

Caracterización química por cromatografía de gases (GC-MS)

Los extractos (2mg) fueron solubilizados con 5 mL de etanol y filtrados. Después, se inyectaron 2 μ L de muestra en un sistema GC-MS. El sistema consistió en un cromatógrafo Agilent Technologies 5850 acoplado a un espectrómetro de masas Agilent Technologies MSD G3170A. La separación cromatográfica se realizó usando una columna HP-5MS (30m x 0.25 mm 1D X 0.25 μ). Para la detección, se usó un sistema de ionización con energía a 70 eV. Como gas acarreador se usó Helio a un flujo constante a 1.10 mL/min y un volumen de inyección de muestra de 1 μ L, la temperatura del inyector fue de 250° C. El programa de calentamiento en el horno fue isotérmico por 5 min a 60°C, seguido por un calentamiento a 5°C /min hasta 100°C/min (2 min), y 10°C/ min hasta 250°C /min (5 min). La interpretación de los espectros de masa y la identificación de compuestos se obtuvieron por comparación con espectros de compuestos puros usando la biblioteca del National Institute of Standar Technology (NIST).

Cuantificación de Fenoles totales

Los fenoles totales fueron determinados en los extractos de *F. microphylla* por el método de Folin-Ciocalteu como lo describe Ainsworth and Gillespie (2007), adaptado a microplaca. Las muestras fueron previamente diluídas en agua (1:10) para el ensayo. Se preparó una curva de catequina a 0, 20, 40, 60, 80 and 100 ppm, y se usó agua deionizada como blanco. Se colocaron 25 μ L de blanco, soluciones de calibración de (+) catequina y diluciones del extracto por triplicado en una microplaca de 96 pozos. Posteriormente, se mezclaron con 80 μ L de agua

destilada y 5 μL de reactivo Folin-Ciocalteu, y se reposó durante 5 min. Finalmente se agregaron 80 μL de Na_2CO_3 (15% w/v) y se dejó reposar cubierta con aluminio durante 30 min. La absorbancia fue medida a 750 nm en un lector de microplaca (Synergy HT, Biotek, USA) controlado con el software Gen 5 Data Analysis.

Ensayos de Capacidad Antioxidante

La actividad antioxidante de los extractos de *F. microphylla* se realizó por tres métodos adaptados a microplaca: DPPH, ORAC y NO. Se utilizó un lector de microplaca (Synergy HT, Biotek, USA) controlado con el software Gen5 Data Analysis para medir la absorbancia cada uno de los ensayos.

Actividad de barrido por radical DPPH[•] (Diphenylpicryl-hidrazyl)

La capacidad de atrapamiento del radical OH y actividad de rompimiento de cadena por DPPH se midió siguiendo el método reportado por Wong-Paz et al. (2014). Se colocaron 7 μL de cada extracto (etanol y acetona) por duplicado en una microplaca de 96 pozos. 193 μL de una solución metanólica de DPPH[•] (60 μM en metanol) fueron agregados y se realizó la lectura de absorbancia por 1 minuto, durante una cinética de 10 min a 517 nm. El porcentaje máximo de inhibición de DPPH fue calculado con la siguiente ecuación:

$$\%DPPH = \frac{(A_{control} - A_{muestra})}{A_{control}} \times 100$$

donde $A_{control}$ representa el valor de la absorbancia del control (agua) y $A_{muestra}$ representa el valor de absorbancia de la muestra de extracto a los 10 min. Todos los experimentos fueron realizados por duplicado.

Ensayo de Capacidad de Absorbancia del Radical Oxígeno (ORAC)

El ensayo ORAC fue determinado de acuerdo al método descrito por Garrett et al. (2010), con algunas modificaciones. AAPH fue usado como un generador de

radical peroxil, una serie de diluciones de Trolox como estándar (5, 10, 25, 35, 50 μM), buffer de fosfatos (PBS) como blanco y fluoresceína como una prueba de fluorescencia. 20 μL de muestra, blanco y diluciones de calibración de Trolox fueron mezcladas con 200 μL de fluoresceína. La microplaca fue incubada a 35 $^{\circ}\text{C}$ durante 15 min en el lector de microplaca. La reacción fue iniciada con la adición de 75 μL del reactivo AAPH. Se seleccionaron filtros para una onda de excitación de 485 nm y una onda de emisión de 520 nm. La fluoresceína fue medida cada 3.5 min, durante 35 ciclos. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado y los valores se usaron para calcular las áreas bajo la curva con la siguiente ecuación:

$$AUC_n = AUC_s - AUC_c$$

En donde AUC_n es el área bajo la curva total, AUC_s el área bajo la curva de la muestra y AUC_c el área bajo la curva del blanco. Finalmente se obtuvieron los equivalentes de Trolox usando la curva estándar obtenida y usada para comparar los resultados de cada muestra. Los resultados fueron expresados como miliequivalentes de Trolox por 100 mg de extracto (mEq Trolox/100 mg muestra)

Ensayo de actividad de barrido de Óxido Nítrico (NO)

El barrido de NO se determinó como lo describen Figueroa Pérez et al. (2014) con algunas modificaciones, usando (+) catequina como estándar 200 μL de la solución de SNP (11.3 mM). Se agregaron a 1 mL de las muestras de extractos de *F. microphylla* a diferentes concentraciones diluidas con PBS y se incubaron con 100 μL del reactivo de Griess (1% sulfanilamida, 0.1% naphthylethylenediamine dichlore y 3% ácido fosfórico) en una microplaca de 96 pozos. La absorbancia se midió inmediatamente a 546 nm. Los resultados fueron expresados como IC_{50} y comparados con (+) catequina como estándar.

Cultivo celular

Actualmente se entiende por cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células “*in vitro*”, manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Se utilizaron células de cáncer de colon humano HT-29 (Figura 17) para realizar los bioensayos, estableciendo un modelo *in vitro*.

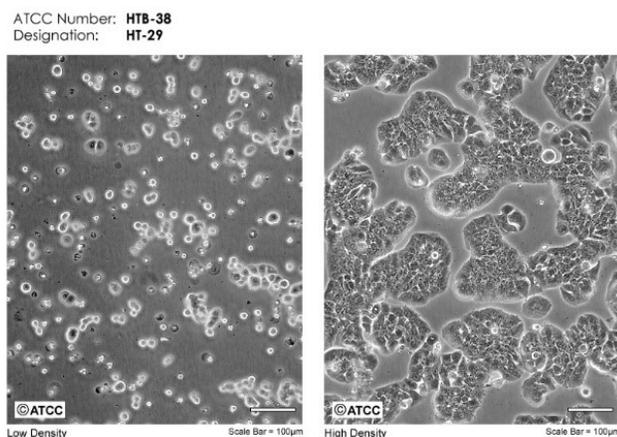


Figura 17 Células de cáncer de colon

Todos los medios utilizados para cultivo celular se preparaban colocándolos en baño María para que alcanzaran una temperatura de 37 °C. Las células se crecieron en DMEM y el medio se cambió cada tercer día. Se utilizaron cultivos celulares con un 90% de confluencia y entre las transferencias 9 y 13 en todos los ensayos. Las células fueron sembradas en placas y densidades apropiadas para cada uno de los experimentos, manteniendo el medio DMEM con 10% de SFB.

Descongelamiento celular

Con el fin de mantener un banco celular para los bioensayos, las células se mantenían “inactivas” bajo una temperatura de -84 °C (Revco CxF ultra-low-temperature freezer, Asheville, NC) y debido a que los cristales del medio en el

que se encuentran son muy pequeños no se permite un descongelamiento a temperatura ambiente, debido al agrandamiento que dichos cristales llega a tener, teniendo como consecuencia una disminución de la viabilidad celular.

Se prepararon agua estéril y DMEM a $T=37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se colocó un criovial con células inactivas, proveniente de la transferencia 9, a modo de baño maría en un vaso de precipitado con agua estéril, esperando el descongelamiento de 1 a 2 min. Las células se recuperaron con una pipeta de 2 mL, resuspendiendo de 2-3 veces y se colocaron en un tubo Corning. El medio de cultivo en el que se encontraban congeladas se aspiró cuidadosamente y finalmente se agregó DMEM suplementado con SFB (10%), penicilina (100 unidades/mL) y estreptomycin (0.1 mg/mL). El medio (10 ML) con las células se colocó en una caja Petri estéril, de 100 mL. La incubación se realizó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una atmósfera húmeda de 5% CO_2 y 95% aire durante 24 h. Después de la incubación se realizó un cambio de medio, retirándolo con pipeta Pasteur (sistema de vacío) y realizando un lavado a las células con 20 mL de PBS, finalmente se realizó una segunda incubación de 72 h para proceder con la activación de la línea celular.

Activación de línea celular

Después de la segunda incubación de las células, se preparó medio para expandir la placa de células descongeladas. Se realizó un lavado con PBS a las células y después se despegaron con verseno y tripsina, colocando primero 10 mL de verseno estéril al 0.02%. Inmediatamente se agregaron 5 mL de tripsina estéril al 0.15%, posteriormente la placa se colocó en la incubadora durante 5 min. Una vez favorecido el desprendimiento celular se agregaron 10 mL de DMEM y se resuspendió 2 veces para finalmente recuperar las células en un tubo Corning de 50 mL, estéril. Se realizó un conteo celular para observar la viabilidad celular y poder expandir el cultivo celular, transfiriéndolo a placas Petri. Los cálculos de la transferencia se realizaron para que cada placa tuviera una densidad de 1×10^6 cel/mL.

Conteo celular

Se tomó una alícuota de 10 μL de la suspensión celular y se colocó en un tubo eppendorf. Se agregaron 10 μL de azul tripano y se homogenizó la suspensión por pipeteo. Se tomaron 10 μL de la suspensión homogenizada y se colocaron en una cámara de conteo. Finalmente, el conteo se realizó en un contador de células automatizado TC10 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) (Figura 18).

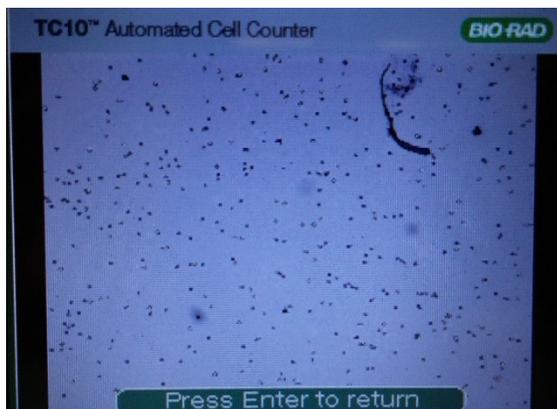


Figura 18. Conteo celular. Células de cáncer de colon vistas bajo contador de células automatizado

Cinética de crecimiento celular

La tasa de crecimiento celular se determinó después de realizar el descongelamiento y la activación de las células HT-29. Se despegaron las células con una mezcla de tripsina 0.15 % y verseno 0.02%, relación 1:3 mL y se procedió al sembrado de la cinética en placas de 24 pozos (Figura 19) con una densidad celular de 20,000 células por pozo.



Figura 19. Placa de 24 pozos.

Se realizaron conteos en una cámara de Neubauer (Figura 20) cada 24 h durante seis días. Las células se tiñeron con azul tripano para facilitar el contado células vivas y muertas en los cuadrantes A, B, C, D (Figura 21) para así obtener el total de células viables. El número de células/mL se obtuvo con la siguiente fórmula

$$\text{Concentración} = \frac{\text{número de células} \times 10,000}{\text{número de cuadros}}$$

El número de duplicaciones celular se obtuvo restando al promedio de células viables obtenido por día de conteo, la densidad inicial de células entre esta misma. Para obtener las duplicaciones acumuladas del día dos se realizó entre el promedio del día pasado y así sucesivamente, las duplicaciones acumuladas se graficaron en el eje de las “y” y en el eje de las “x” el tiempo que duro el conteo.



Figura 20. Cámara de Neubauer

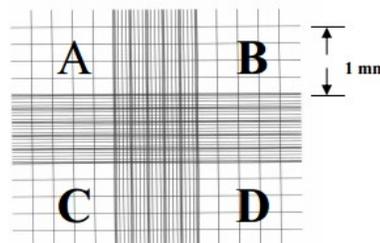


Figura 21. Cuadrantes de cámara

Bioensayos

Los datos obtenidos en los bioensayos se analizaron en una hoja de cálculo Excel 2013 y se graficaron en el programa SigmaPlot V. 12 (Systat Software Inc., Germany).

Preparación de extracto

Para los ensayos celulares, los extractos crudos de *F. microphylla* se disolvieron en DMSO (300 mg/1000 μ L) para obtener una solución stock de cada extracto. Para el extracto etanólico, se prepararon concentraciones de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mg/mL, para el extracto de acetona las concentraciones preparadas fueron de 0.05, 0.1, 0.15 y 0.2 mg/mL; disolviendo el stock de cada extracto en medio DMEM libre de SFB. Los stocks de las concentraciones se colocaron en refrigeración hasta su uso.

Viabilidad celular por MTT

Para evaluar la proliferación y supervivencia de las células, se realizó un ensayo de actividad enzimática mitocondrial (AEM) por ensayo de bromuro de 3-(4-5 dimetiliazol-z-do)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Se sembraron las células de cáncer de colon en una placa de 96 pozos (Figura 22) a una densidad de 9.6×10^3 cel/pozo empleando 14 mL de medio DMEM con 10% de SFB, 1% de penicilina/estreptomina y 3.7% de bicarbonato de sodio. Después de incubar las células durante 72 h, se probaron las 5 concentraciones del extracto etanólico y las 4 concentraciones del extracto acetona, disueltos en medio DMEM libre de SFB. Se utilizó DMSO como control. Las células tratadas con los extractos se incubaron durante 24 h, después se retiró el medio de cultivo realizando un lavado con PBS (1X) para remover residuos del extracto, posteriormente se agregaron 100 μ L del reactivo MTT (1mg/mL) con 100 μ L de medio RPMI sin rojo fenol a cada pocillo y se incubó durante 4 h a 37° C. Al final de la incubación se retiraron los medios y se disolvieron los cristales de formazán intracelular con 200 μ L de DMSO (Figura23). Finalmente se realizó la lectura de

absorbancia a 570 nm y 690 nm usando un lector de microplacas (ELISA, Daigger).

Cada concentración de los extractos se llevó a cabo por sextuplicado para analizar la cinética de citotoxicidad de cada extracto y determinar las concentraciones efectivas que inhiben el 50% del crecimiento celular (CE_{50}) calculando la media aritmética de absorbancia para cada concentración y el porcentaje de crecimiento, determinándolo por el cociente entre la absorbancia media para cada tratamiento y la obtenida para el control.

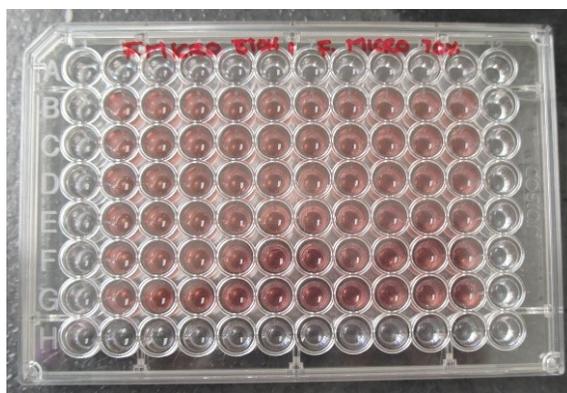


Figura 20. Células sembradas en placa de 96 pozos



Figura 21. Células con reactivo MTT

Obtención de proteína celular

Para la obtención de proteína celular se seleccionaron los tratamientos de los extractos de etanol y acetona de *F. microphylla* a concentraciones no tóxicas para el ensayo Western Blot y las concentraciones efectivas para el ensayo de apoptosis, utilizando cultivos prefluentes a los cuales se les realizaron dos lavados con PBS. Brevemente, las células fueron removidas con tripsina y verseno disueltos en buffer de fosfatos (pH 7.8) y después centrifugadas a 4500 rpm. Se recuperó la pastilla y se agregó inhibidor de proteasa y después las células fueron lisadas en hielo utilizando un Ultra-Turrax (IKA T20 basic). La suspensión se centrifugó a 12 000 rpm y el sobrenadante se recuperó para determinar la concentración de la proteína y los análisis Western Blot. La concentración de proteína se determinó por medio de un espectrofotómetro NanoDrop 2000 UV/Vis (Thermo Scientific, Waltham, MA USA).

Ensayo Western Blot para proteínas pro y antiinflamatorias.

Para realizar la técnica de Western blot, se prepararon geles de acrilamida al 12.5% para, NF-Kb, COX-1 y COX-2, y 15%, para IL-8 y TNF- α , para realizar la separación de proteínas por electroforesis (Cuadro 3).

Cuadro 3. Concentración de geles de acrilamida para electroforesis

| Reactivo | 12.5% (μ L) | 15% (μ L) |
|----------------------|---------------------|-------------------|
| Acrilamida | 4.2 | 5 |
| Buffer de corrida 4X | 2.5 | 2.5 |
| SDS 10% | 0.1 | 0.1 |
| ddH ₂ O | 3.2 | 2.4 |
| APS | 50 | 50 |
| TEMED | 3.3 | 3.3 |

Se midió la expresión de marcadores pro-inflamatorios (NF- κ B , COX-2, TNF α , e IL-8) y anti-inflamatorios (COX-1 e IL-10) por la técnica Western blot (Díaz-Rivas

et al., 2015) como sigue: las proteínas celulares (60 µg) se separaron por electroforesis SDS-PAGE (Figura 24) en geles de acrilamida y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon durante la noche con una solución de leche descremada al 5% w/v en TBS-T [20mM Tris/HCl, 100mM NaCl, 0.2% (v/v), pH 7.6], después se lavaron 3 veces con TBS-T [20mM Tris/HCl, 100mM NaCl, 0.2% (v/v) Tween-20, pH 7.6], a continuación se incubaron con el primer anticuerpo preparado a la dilución apropiada en 15 mL de TBS-T: para COX-1, COX-2 (1:1000), para NF-κB, IL-8 (1.200) y para TNFα 1:800) durante 2 h. Se lavaron las membranas 3 veces con TBS-T y se incubaron con el segundo anticuerpo, mouse anti-goat IgG, conjugado con fosfatasa alcalina (AP). Se utilizó GADPH como control de carga. Las proteínas se visualizaron por el método de colorimetría con el Kit AP Conjugated Substrate (Amersan, Biosciences). Una vez que aparecieron las primeras bandas la reacción se detuvo con agua tipo II. La densidad de las bandas se cuantificó por escaneo densitométrico con el software TotalLab TL120 (NonLinear dynamics, New Castle on Tyne, UK).



Figura 22. Separación de proteínas por electroforesis

Ensayo de Apoptosis

El ensayo se llevó a cabo utilizando las concentraciones efectivas de *F. microphylla* obtenidas en del ensayo de MTT, para la obtención de la proteína celular a usar en el ensayo de apoptosis. Se siguió el protocolo para los microarreglos de anticuerpos para apoptosis en humanos (Figura 25), con las instrucciones que se obtuvieron del fabricante del kit (Human Apoptosis Antibody Array-Membrane, Abcam Inc, USA), descrito a continuación:

A. Preparación y almacenamiento de reactivos.

1. Cocktail inhibidor de proteasa:
 - a) Centrifugar brevemente el tubo del inhibidor antes de su uso.
 - b) Agregar 60 μ L de Buffer de Lysis 1X a un vial para preparar una concentración de 100X de Buffer de Lysis.
2. El Buffer celular Lysis es suministrado a una concentración de 2X
 - a) Diluir 1 mL de Buffer celular de Lysis con 980 μ L de agua des ionizada.
 - b) Agregar 20 μ L del Cocktail Inhibidor de Proteasa 100X.
3. Suministrar el Buffer de Bloqueo a una concentración de 1X, no se requieren diluciones.
4. Suplementar los Buffer de lavado I y II a una concentración 20X
 - a) Para cada membrana usada en el experimento, diluir 1 mL de Buffer de lavado I a un volumen final de 20 mL con agua des ionizada.
 - b) Para cada membrana usada en el experimento, diluir 1 mL de Buffer de lavado II a un volumen final de 20 mL con agua des ionizada.
 - c) Los reactivos del Buffer de Lavado pueden almacenarse a 4 °C durante un 1 mes. Las soluciones Stock durante 3 meses.
5. Suplementar Biotin-conjugated Anti-Cytokines a 2000X.
 - a) Preparar el reactivo stock agregando 150 μ L del Buffer de Bloqueo 1X al tubo con Biotin-Conjugated.

- b) Mezclar bien y transferir el reactivo stock cuantitativamente a un tubo con 1800 μ L de Buffer de Bloque 1X.
6. Suplementar Streptavidin-HRP a una concentración de 1000X
 - a) Agitar el tubo antes de su uso.
 - b) Agregar 2 μ L de Streptavidin-HRP a 1998 μ L del Buffer de Bloqueo.
7. Suplementar Buffers de detección C & D como soluciones 1X.

B. Bloqueo e incubación

Preparar los reactivos al momento de usarlos.

1. Colocar la membrana con el lado impreso hacia arriba en la placa de 8 bandejas.
2. Agregar 2 mL del Buffer de Bloqueo 1X a cada membrana. Asegurarse de remover todas las burbujas. Incubar a temperatura ambiente durante 30 min con agitación suave.
3. Decantar el Buffer de Bloqueo e incubar las membranas a 4 °C durante toda la noche con 1.2 mL de la muestra, con agitación suave.
4. Aspirar las muestras de las membranas, dar 3 lavados de 5 min con 2 mL del Buffer de Lavado I, a temperatura ambiente. Usar buffer fresco para cada lavado.
5. Dar 3 lavados de 5 min con 2 mL del Buffer de Lavado II, a temperatura ambiente.
6. Remover cuidadosamente el buffer. Agregar 1 mL de Biotin-conjugated Anti-Cytokine 1X a cada membrana. Incubar durante toda la noche a 4 °C con agitación suave.
7. Aspirar el reactivo y repetir los lavados de los pasos 4 y 5.
8. Incubar a temperatura ambiente durante 2 hr con 1.5 mL de 1X Streptavidin-HRP.
9. Lavar las membranas.
10. Proceder a la detección con un Detector de quimioluminiscencia, siguiendo el protocolo:

C. Detección por quimioluminiscencia.

No permitir el secado de las membranas durante la detección. La detección de quimioluminiscencia debe empezar dentro de los 5 min después de remover los buffers de detección y debe completarse dentro de 20 min.

11. Colocar dos membranas en un acetato, eliminar el exceso de líquido.
12. Mezclar los Buffer de detección C y D en un tubo limpio, en cantidades iguales, segundos antes de la detección.
13. Agregar 250 μ L de la mezcla de los Buffer C y D a cada membrana.
14. Pipetear los buffer de detección en cada membrana. Colocar otro acetato encima de las membranas, empezando por una y desenrollando el acetato alrededor de la superficie hasta el lado opuesto. Asegurarse que la mezcla de detección cubra completamente cada membrana, y suavemente eliminar las burbujas de aire. Evitar el deslizamiento de la lámina de plástico a lo largo de las superficies impresas de las membranas.
15. Incubar a temperatura ambiente durante 2 min.
16. Retirar el acetato que cubre las membranas y eliminar el exceso de líquido con un pañuelo de papel.
17. Colocar las membranas Suavemente (lado de la proteína hacia arriba) en equipo de Detección por Quimioluminiscencia.
18. Detectar las señales usando un sistema de revelado por quimioluminiscencia.
19. Para cada arreglo, intentar múltiples exposiciones para obtener una imagen con fuertes señales de Control Positivo que no manchen o se traspase hacia otro punto. Los tiempos típicos de exposición son de 10 segundos a 2 minutos.

Se utilizaron cuatro membranas: para DMSO (control negativo), Etoposido (control positivo) y los extractos de etanol y acetona. Las membranas se revelaron en una fotodocumentador Chemidoc (BioRad, Ca, USA).

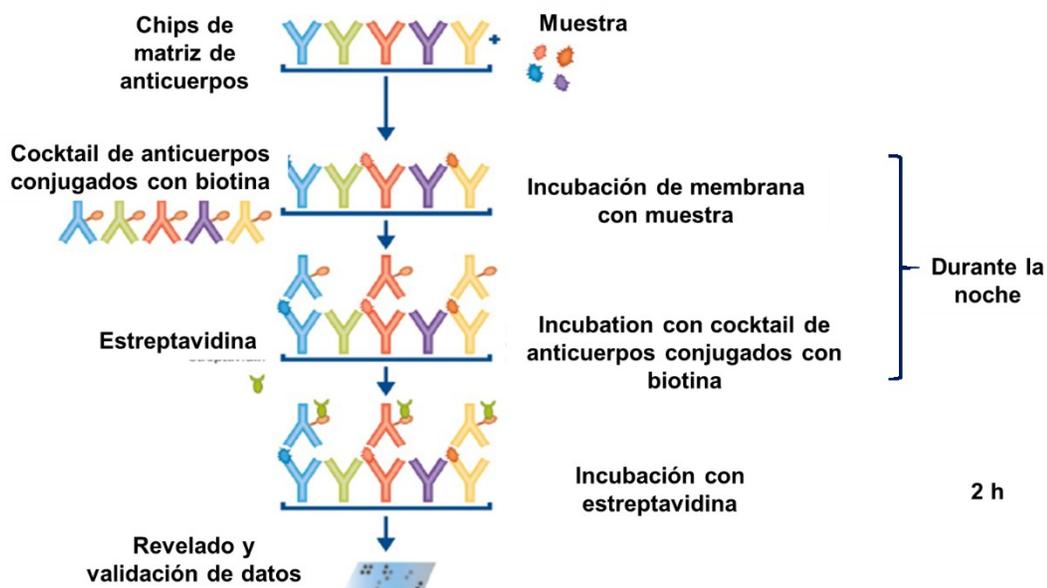


Figura 23. Protocolo del kit de microarreglos para apoptosis

Análisis estadísticos

Los datos fueron analizados aplicando una comparación de análisis de varianza (ANOVA) usando el software FAUANL (Olivares, 2015). El test Tukey ($p < 0.05$) fue usado para detectar diferencias significativas entre las muestras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Rendimiento de los extractos de *F. microphylla*

El rendimiento de los extractos de *F. microphylla* fue mayor al usar el solvente de acetona (25.44%) que el obtenido con el etanol (10.58%). Sin embargo, no hay reportes acerca de los rendimientos de extractos de *F. microphylla*. Por lo tanto, los resultados obtenidos fueron comparados con los reportados para otras especies de *Flourensia*. Rios et al. (2013) reportaron para partes aéreas de *F. resinosa* extraídas con acetona, rendimientos de 7.40%; valor más bajo que los reportados en este estudio. Esto puede ser atribuido a que *F. microphylla* tiene un mayor contenido de polifenoles que *F. resinosa*. Mientras tanto, Wong-Paz et al. (2015) reportaron para extracto de etanol acuoso de *F. cernua* (hojas y tallos) rendimientos de 11.03% y (Guerrero-Rodríguez et al., 2007) reportaron un rendimiento de 8.20% para extracto de etanol en hojas, también para *F. cernua*. Ambos resultados concuerdan con los rendimientos obtenidos en este estudio para *F. microphylla*.

Caracterización química de los extractos de *F. microphylla*

Compuestos bioactivos por LC-MS/MS

El perfil fenólico obtenido por LC-MS/MS para ambos extractos de *F. microphylla* se muestra en el Cuadro 4. En el extracto de etanol se identificaron 23 compuestos, de los cuales dos grupos constituyen la mayor proporción, y son (en orden de concentración): ácido cafeoilquínico y sus derivados (ácido caftárico), y flavonoides (quercetina y glucósidos de quercetina, rutina y miricetina y glucósidos de miricetina). Por otro lado, en el extracto de acetona se identificaron 30 compuestos, siendo el ácido 4-O cafeoilquínico el componente mayor. Los derivados del ácido cafeoilquínico han mostrado actividad anti-inflamatoria y analgésica (Han et al., 2007; Santos et al., 2010). Algunos estudios han mostrado la actividad anticancerígena de los derivados de ácidos cafeoilquínicos y flavonoles en diferentes líneas celulares (Kurata et al., 2007). Además, los ácidos

cafeoilquínicos que se encontraron en las hojas de *F. microphylla*, también se han identificado y cuantificado en alcachofa (Schütz et al., 2004) y yerba mate (Puangpraphant et al., 2011), además de ser aislados de extractos metanólicos de hojas de *Vallis glabra* y *Lonicera japónica* (Wong et al., 2014).

Los glucósidos de la quercetina y el kaempferol han mostrado suprimir células de cáncer de colon (Noratto et al., 2011). Además, quercetina, rutina y miricetina son protectores contra el estrés oxidativo, mostrando efecto en enfermedades como cáncer, enfermedad coronaria del corazón y aterosclerosis (Barba de la Rosa et al., 2010; Alía et al., 2006; Lu et al., 2006). Además, la catequina y epicatequina han mostrado efecto antimicrobiano (Ortega-Ramirez et al., 2014). Otros compuestos encontrados en menor cantidad también han sido considerados como potentes antioxidantes y anti-inflamatorios como lo son luteolina y naringenina (Dou et al., 2013; Lin et al., 2008). Se ha reportado que todas las especies de *Flourensia* sintetizan flavonoides siendo las flavonas, flavanonas y flavanoles los compuestos más distintivos de este género de planta (Ríos et al., 2013). Es notable que el extracto de etanol cuenta con la mayor cantidad de compuestos fenólicos detectados por LC-MS/MS, relacionándose con el contenido de fenoles totales, en donde este extracto mostró la mayor cantidad.

Cuadro 4. Perfil fenólico de extractos de *F. microphylla* por LC-MS/MS

| Compuesto | RT (min) | m/z | Etanol (µg/mg muestra) | Acetona (µg/mg muestra) |
|------------------------------------|-------------|--------|---------------------------|----------------------------|
| Ácido salicílico | 7.93 | 137.03 | 138.22 | - |
| Ácido 3,4 dihidroxibenzoico | 3.2 | 153.02 | 175.98 | - |
| Ácido gálico | 1.69 | 169.03 | - | 0.11 |
| Ácido ascórbico | | 174.97 | 207.41 | - |
| Ácido siríngico | 5.19 | 197.1 | 80.25 | - |
| Ácido Trans-cinámico | 4.83 | 147.03 | - | 0.08 |
| Ácido cafeico | 5.09 | 179.1 | - | 0.75 |
| Ácido caftárico | | 311.13 | 1230.00 | - |
| Ácido 4-O cafeoilquínico | 4.65 | 353 | 5013.22 | 1088.62 |
| Ácido 3,4 di-O cafeoilquínico | 7.28 | 515 | 4656.80 | 9.44 |
| Naringenina | | 271 | 483.90 | - |
| Luteolina | | 285 | 51.83 | - |
| Phloridzinum dihidratado | 8.17 | 471.22 | 7.69 | - |
| Naringina | 7.65 | 579 | - | 2.34 |
| Hesperidina | 7.99 | 609.35 | 74.83 | - |
| Quercetina | 8.72 | 301 | 1502.78 | 0.61 |
| Quercetina 3-o rhamnosida | | 447 | 965.95 | - |
| Kaempferol 3-o glucosido | 7.34 | 447 | - | 0.22 |
| Miricetina rhamnosida | | 463 | 854.43 | - |
| Quercetina o- glucuronida | 6.61 | 477 | 57.53 | - |
| Miricetina 3 glucosida | | 479 | 85.74 | - |
| Kaempferol 3-o coumaroil glucosida | 9.34 | 593 | 121.10 | - |
| Rutina | 6.4 | 609 | 1140.76 | 1.09 |
| Catequina | 4.46 | 289 | - | 0.98 |
| Epicatequina | 5.18 | 289 | 41.99 | 0.13 |
| Galocatequina | 1.17 | 305 | 0.36 | 0.38 |
| Epicatequina galato | 6.73 | 441 | 5.99 | - |
| Galocatequina | 5.55 | 457 | 5.87 | 0.60 |
| Procianidina B2 | | 577.23 | 4.21 | - |

(-) Indica ausencia del compuesto en el extracto.

RT: Tiempo de retención.

Compuestos bioactivos por GC-MS

Los cromatogramas de los extractos, para el sistema GC-MS se muestran en la Figura 26.

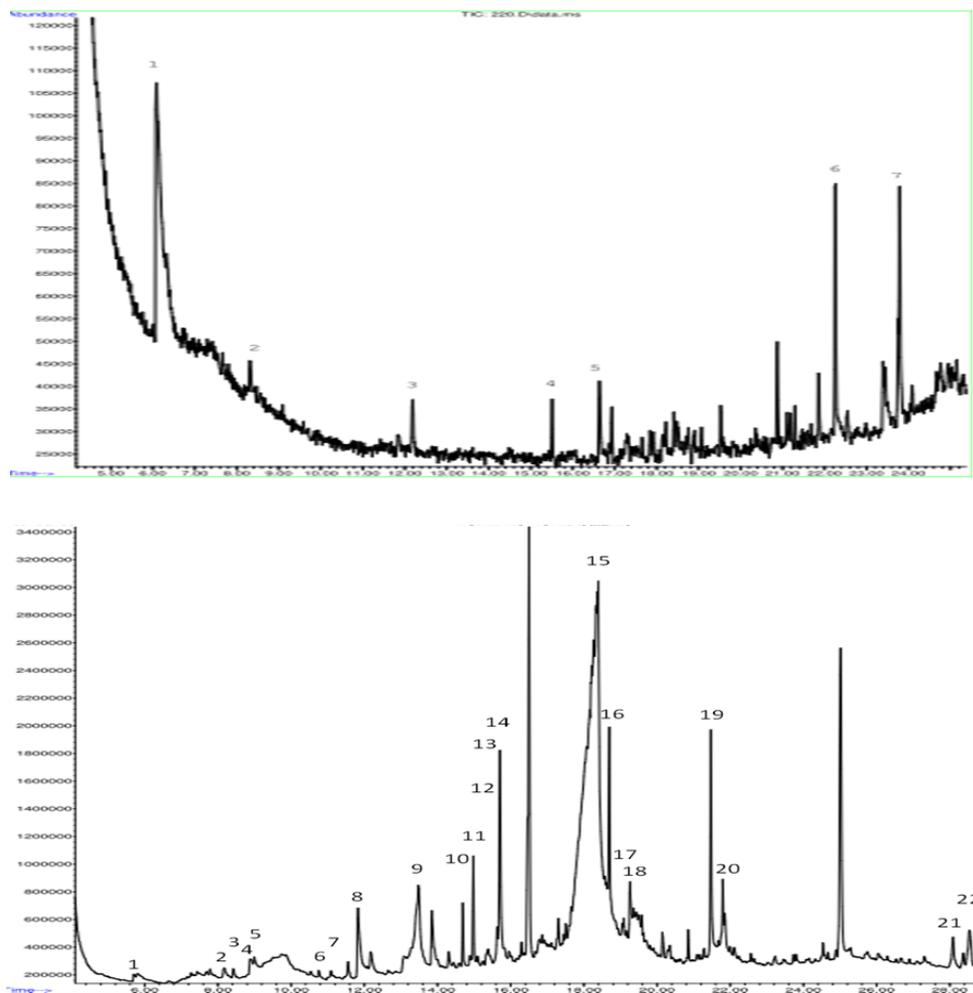


Figura 24. Cromatogramas de los extractos de *F. microphylla*. (a) Cromatograma del extracto de etanol y (b) Cromatograma del extracto de acetona

Se identificaron siete compuestos en el extracto de etanol, como hidrocarburos oxigenados y algunos compuestos nitrogenados de la familia de las amidas (Cuadro 5). El compuesto encontrado en mayor cantidad fue el hexilenglicol (poliol) con 31.70%, este compuesto ha mostrado actividades antibacterial y antifúngica (Kinnunen and Koskela, 1991). Los ésteres de ácido graso: éster etílico del ácido linoleico y éster etílico del ácido hexadecanoico, también se

encontraron en concentraciones altas con 10.30 y 9.69%, respectivamente. Estos compuestos han sido reportados como agentes antioxidantes, hipocolesterolémicos, nematocidas y pesticidas (Rajeswari et al., 2013). Los otros compuestos se presentan en menor concentraciones (2,5-difluoro- β ,3,4-trihidroxy-N-metil-bencenoetamina, 2-nonanol y 2-decanol), pero son compuestos que pueden tener importantes actividades biológicas. Amidas sustituidas han reportado actividad anticancerígena (Pachuta-Stec et al., 2009), además de efectos anticonvulsivos y neuroprotectores (Hassan et al., 2012); mientras tanto, los alcoholes han sido ampliamente descritos como antimicrobianos (Aiemsraad et al., 2011; Gołębiowski et al., 2012) y antimicobacterianos (Mukherjee et al., 2013).

Cuadro 5. Perfil de compuestos identificados en el extracto de etanol por GC-MS.

| RT (min) | Compuesto | Fórmula molecular | MW | Área (%) |
|----------|------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|-----|----------|
| 6.09 | Hexylene glycol | C ₆ H ₁₄ O ₂ | 118 | 31.70 |
| 8.31 | 2-hydroxy-propanamide | C ₃ H ₇ NO ₂ | 89 | 1.25 |
| 12.19 | 2-Nonanol | C ₉ H ₂₀ O | 144 | 2.41 |
| 15.52 | 2-Decanol | C ₁₀ H ₂₂ O | 158 | 1.71 |
| 16.64 | 2,5-difluoro- β ,3,4-trihidroxy-N-methyl-benzeneethanamine | C ₉ H ₁₁ F ₂ NO ₃ | 219 | 3.62 |
| 22.26 | Hexadecanoic acid, ethyl ester | C ₁₈ H ₃₆ O ₂ | 284 | 9.69 |
| 23.79 | Linolenic acid ethyl ester | C ₂₀ H ₃₄ O ₂ | 306 | 10.30 |

RT: Tiempo de retención; MW: Peso molecular

En el extracto de acetona se identificaron 21 compuestos, los cuales fueron de naturaleza bencénica (Cuadro 6). Fueron identificados alcoholes aromáticos de naturaleza fenólica y algunos compuestos nitrogenados; destacando la presencia de ácido quínico con 14.46% y sus derivados como hidroquinona. Se ha reportados una variedad de propiedades biológicas para estos compuestos como anti-inflamatoria, anticancer, antiviral, antioxidante y hepatoprotectora (Inbathamizh and Padmini, 2013; Park, 2010; Simin et al., 2013; Sladić and Gašić,

2006). Además se detectaron el 2-Benzotiazol (2.63%) y escopoletina (2.56%), los cuales han sido atribuidos a una amplia variedad de actividades como antimicrobianas, anti-inflamatorias intestinales y antioxidantes (Lindgren et al., 2014; Witaicenis et al., 2014). Se identificaron otros compuestos en concentraciones menores, sin embargo, debido a su naturaleza (eje. Aminas, amidas, fenoles, ésteres, aldehídos) pueden contribuir con potenciales actividades biológicas en el extracto (Hameed et al., 2015; Magnusson et al., 2015; Subashini et al., 2015).

Además de compuestos con efecto anti-inflamatorio, los extractos de hojas de *F. microphylla* presentaron compuestos con diferentes actividades biológicas y antioxidante, como el ácido hexadecanoico, éster etílico (Rajeswari et al., 2013). Este es el primer reporte de la caracterización química de *F. microphylla*, y de acuerdo a estos resultados, se ha observado que las hojas de esta planta contienen una gran fuente de compuestos con actividad antioxidante, anti-inflamatoria y anticarcinogénica.

Cuadro 6. Perfil de compuestos identificados en extracto de acetona por GC-MS

| RT (min) | Compuesto | Fórmula molecular | MW | Área (%) |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|-----|-------------|
| 5.71 | N,N-Dimetilglicina | C ₄ H ₉ NO ₂ | 103 | 0.04 |
| 8.18 | Bencenometanol,2-(2-aminopropoxy)-3-metil- | C ₁₁ H ₁₇ NO ₂ | 195 | 0.20 |
| 8.44 | Ciclohexanol, 2-metil-5-(1-metiletenil)- | C ₁₀ H ₁₈ O | 154 | 0.11 |
| 8.99 | 2-Penten-1-amina, N,N,2-trimetil-, (E) | C ₈ H ₁₇ N | 127 | 0.44 |
| 9.02 | Metil 6-oxoheptanoato | C ₈ H ₁₄ O ₃ | 158 | 0.72 |
| 11.10 | Etanamina,2-(2,6-dimetilfenoxi)-N-metil | C ₁₁ H ₁₇ NO | 179 | 0.11 |
| 11.56 | 1,7-Octanodiol,3,7-dimetil- | C ₁₀ H ₂₂ O ₂ | 174 | 0.22 |
| 11.84 | 1,2-Benzenodiol | C ₆ H ₆ O ₂ | 110 | 1.60 |
| 13.48 | Hidroquinona | C ₆ H ₆ O ₂ | 110 | 4.50 |
| 14.30 | 2(3H)-Benzofuranona, hexahidro-7a-metil | C ₉ H ₁₄ O ₂ | 154 | 0.44 |
| 14.70 | Ácido propanoico, 2-metil-, 2,2-dimetil-1-(2-hidroxi-1-metiletil)propil éster | C ₁₂ H ₂₄ O ₃ | 216 | 0.76 |
| 15.37 | Triciclo[5.2.1.0(4,10)]dec-2-ene, 6,6,8-trimetoxi- | C ₁₃ H ₂₀ O ₃ | 224 | 0.80 |
| 15.68 | Ciclopentanona, 2-(feniltio)- | C ₁₁ H ₁₂ OS | 192 | 0.66 |
| 15.71 | 2-Benzotiazol | C ₇ H ₅ NS | 135 | 2.63 |
| 18.40 | (1R,3R,4R,5R)-(-)-Ácido quínico | C ₇ H ₁₂ O ₆ | 192 | 14.46 |
| 18.71 | 2,5-Ciclohexadieno-1,4-diona, 2,5-bis(1,1-dimetilpropil)- | C ₁₆ H ₂₄ O ₂ | 248 | 5.14 |
| 19.09 | Tetraacetil-d- nitrilo xilónico | C ₁₄ H ₁₇ NO ₉ | 343 | 1.09 |
| 19.26 | 4-((1E)-3-Hidroxi-1-propenil)-2-metoxifenol | C ₁₀ H ₁₂ O ₃ | 180 | 1.35 |
| 21.47 | 7-Hidroxi-6-metoxi-2H-1-benzopiran-2-one | C ₁₀ H ₈ O ₄ | 192 | 2.56 |
| 21.78 | Pterine-6-ácido carboxílico | C ₇ H ₅ N ₅ O ₃ | 207 | 1.11 |
| 28.09 | (+)-5,5-Dimetil-4-(3-oxobutil)dihidro-2(3H)-furanona 4-(2,4-dinitrofenilhidrazona) | C ₁₆ H ₂₀ N ₄ O ₆ | 364 | 0.55 |
| 28.54 | Tosilato de esmilogenina | C ₃₄ H ₅₀ O ₅ S | 570 | 0.75 |

RT: Tiempo de retención; MW: Peso molecular

Contenido de Fenoles Totales

El contenido de fenoles totales de los extractos de *F. microphylla* se muestra en el Cuadro 7. El ANOVA mostró que el extracto de etanol presenta la concentración más alta ($p < 0.05$) del contenido de fenoles el extracto de acetona. Se ha determinado el contenido fenólico de extractos de etanol y agua de *F. cernua*, obteniendo un mayor contenido en el extracto de etanol (Wong-Paz et al., 2014). Con esto se podría indicar que el solvente etanólico es el ideal para arrastrar un mayor número de compuestos fenólicos en un extracto vegetal.

Cuadro 7. Contenido de Fenoles Totales (TPC) y actividad antioxidante de extractos de *F. microphylla*.

| Extracto | TPC (mg/100 mg extracto) | Capacidad antioxidante | | |
|----------|--------------------------------|---------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------|
| | | DPPH (%) | ORAC (mEq Trolox/100 mg extracto) | NO IC ₅₀ (µg/mL)* |
| Acetona | 856.16 ± 0.96 ^b | 58.97 ± 0.65 ^b | 138.19 ± 1.80 | 7.0 ± 0.001 ^a |
| Etanol | 1276.08 ± 1.17 ^a | 68.57 ± 1.09 ^a | 117.19 ± 1.74 | 14.8 ± 0.006 ^a |

Los valores IC₅₀ fueron calculados por medias del ensayo de óxido nítrico (NO).
Los datos representan las medias ± SD de dos determinaciones.
Diferentes letras en la misma columna indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

Capacidad antioxidante de *F. microphylla*

Los resultados de la actividad antioxidante de los extractos de *F. microphylla* son mostrados en el Cuadro. Los extractos de *F. microphylla* mostraron una actividad antioxidante considerablemente alta en el ensayo de DPPH, siendo el extracto de etanol el mayor (Cuadro 7). Estos resultados se pueden comparar con los reportados para *F. cernua* por Wong-Paz et al. (2014) y Salazar et al. (2008), quienes reportaron porcentajes de 50.70 y 75.30% de inhibición en extracciones de etanol y metanol, respectivamente. Por otro lado, los resultados del método de ORAC muestran una mayor actividad antioxidante en el extracto de acetona ($p < 0.05$) comparado con el extracto de etanol. Se ha reportado que diferentes métodos para estimar la capacidad antioxidante en extractos de plantas proveen

diferentes resultados, con bajas correlaciones entre ORAC y DPPH (Dudonné et al., 2009). Mientras el ensayo ORAC mide la degradación oxidativa de una molécula fluorescente, (Garrett et al., 2010), el DPPH mide la capacidad de donación de átomos de hidrógeno de un compuesto antioxidante (Miliauskas et al., 2004). Con el fin de obtener mayor información, la actividad antioxidante de los extractos se determinó en términos de IC_{50} por medio del método NO. El NO interactúa con especies reactivas de oxígeno (ROS) y genera moléculas que incrementan la citotoxicidad (Díaz-Rivas et al., 2015). Los valores encontrados para ambos extractos no presentaron diferencias estadísticas ($p > 0.05$). Bajos valores de IC_{50} son indicadores de un potencial antioxidante alto (Cerqueira et al., 2010). Los resultados obtenidos para ambos extractos de *F. microphylla* son mejores que los reportados para otras plantas como *Quercus* spp. con valores que van desde 152.51 a 447.56 $\mu\text{g/mL}$ (Sánchez-Burgos et al., 2013), y para extracto de bagazo de *Aloe vera* con un IC_{50} de 340 $\mu\text{g/mL}$ (Flores-López et al., 2016). Por lo tanto, los extractos de etanol y acetona de *F. microphylla* pueden ser considerados como agentes antioxidantes potenciales.

Cinética de crecimiento celular

En la Figura 27 se observa la duplicación de las células HT-29 cada 24 h durante 144 h. Se realizaron los cálculos para obtener el tiempo de duplicación celular, obteniendo como resultado 23.9664 h, tiempo similar al reportado por la ATCC, el cual es de 24 h.

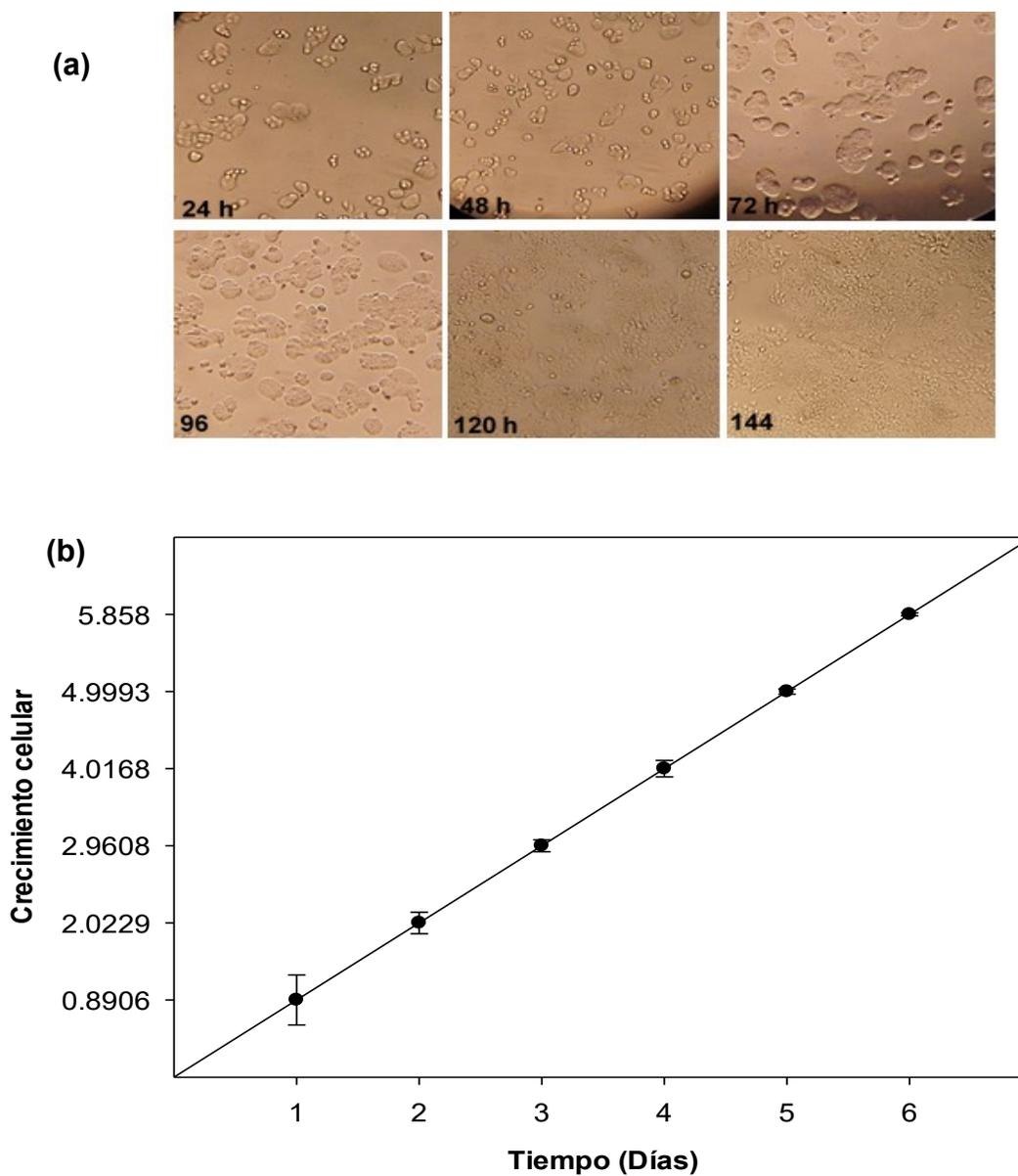


Figura 25. Cinética celular.

(a) Crecimiento de células HT-29 visto bajo microscopio durante seis días, (b) Gráfica de cinética de crecimiento celular de HT-29.

Efecto de los extractos de *F. microphylla* en la citotoxicidad celular.

Se realizó el ensayo MTT para determinar el efecto citotóxico de los tratamientos de *F. microphylla* sobre las células HT-29 después de 24 h de tratamiento (Figura 29). Se midieron el pH y la osmolaridad de los medios usados para el ensayo, sin encontrar modificación alguna en las diferentes concentraciones. Los tratamientos mostraron una disminución en la AEM con respecto a las concentraciones usadas para cada extracto (Figura 28).

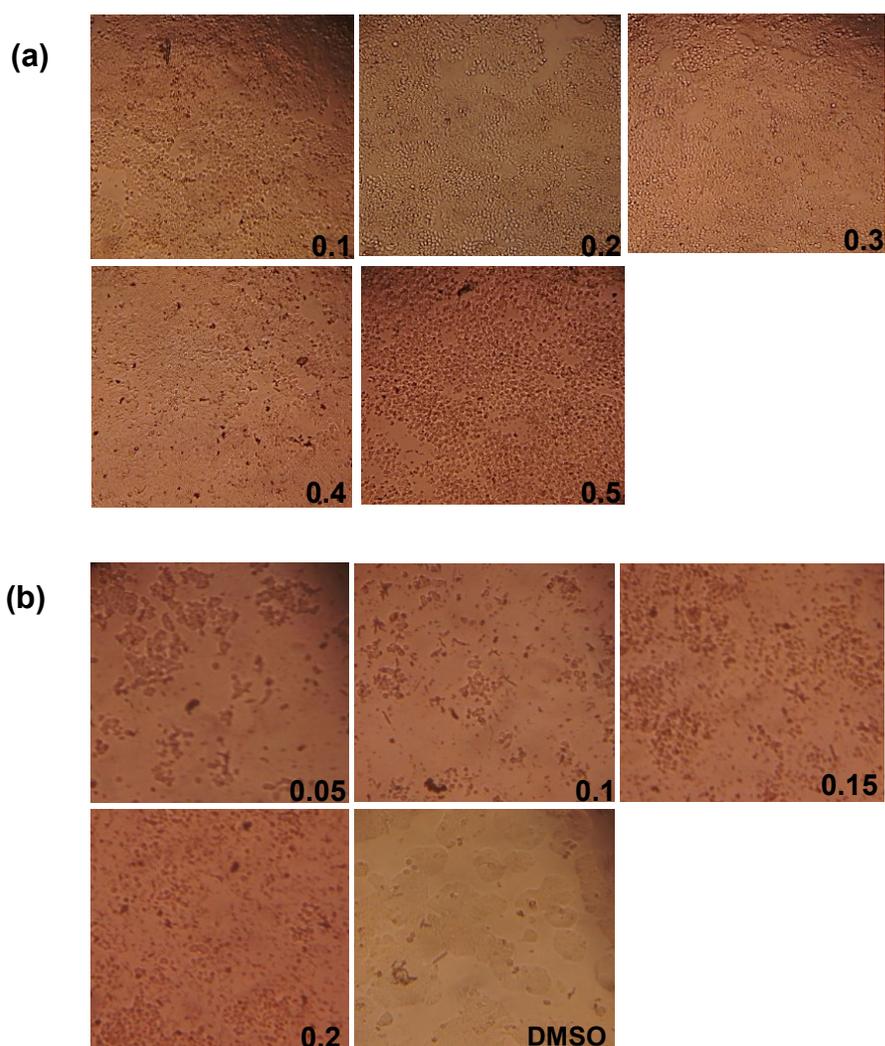


Figura 26. Células tratadas con extractos de *F. microphylla*.
(a) Concentraciones del extracto de etanol, (b) Concentraciones del extracto de acetona y DMSO.

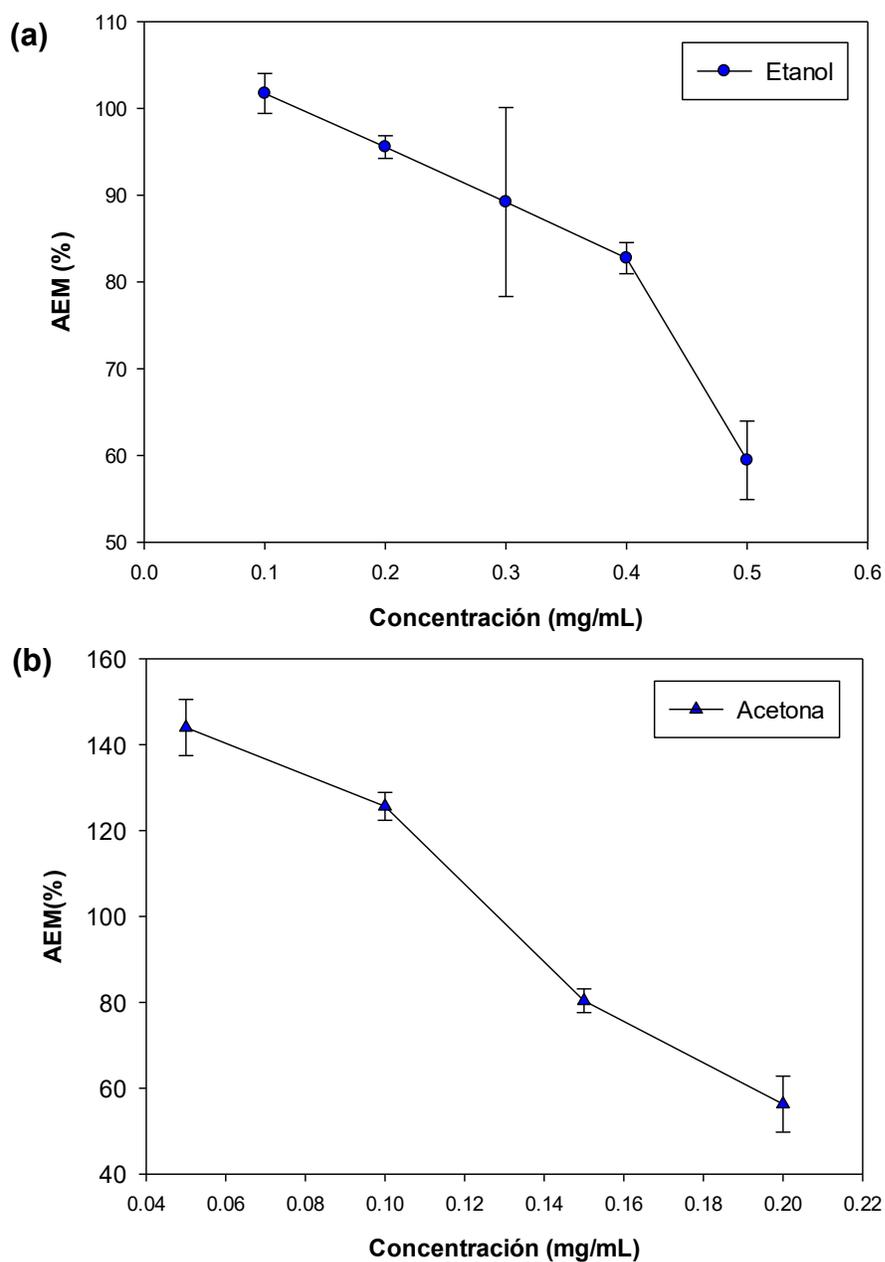


Figura 27. Efecto de los extracto en la Actividad Enzimática Mitocondrial de HT-29 por MTT. (a) Gráfico del efecto del extracto de etanol, (b) Gráfico del efecto del extracto de acetona. Barras de error indican la desviación estándar.

Las concentraciones efectivas obtenidas para los tratamientos apoptóticos fueron 0.4 y 0.07 mg/mL para los extractos de etanol y acetona, respectivamente. Ambos extractos mostraron una citotoxicidad notable, logrando disminuir la AEM hasta un

80%. Las concentraciones de inhibición de *F. microphylla* detectadas en este estudio fueron menores a las reportadas por Herrera-Carrera et al. (2015). Los autores reportaron una disminución de AEM en células de cáncer de colon HT-29 de un 80% con tratamientos de salvilla (1.25 mg/mL), manzanilla (5.0 mg/mL), y yerbaníz (2.5 mg/mL). La presencia del ácido cafeoilquínico y sus derivados, así como los flavonoides detectados en ambos extractos puede estar asociada con la inhibición de la proliferación de células HT-29 (Daskiewicz et al., 2005).

Obtención de proteína celular

Los resultados de la proteína total obtenida se observa en el Cuadro 8. Se realizaron cálculos para cargar 100 μ L de proteína en los geles para los ensayos antiinflamatorios; en el caso de apoptosis, los cálculos se realizaron para cargar 400 μ L de proteína en las membranas de los microarreglos.

Cuadro 8. Proteína total y proteína a cargar en membranas de bioensayos

| Muestra | Proteína Total (μ g/ μ L) | Anti-inflamación | Apoptosis |
|---------|---------------------------------------|------------------|------------------|
| | | μ L de carga | μ L de carga |
| DMSO | 11.133 | 2.88 | 35.929 |
| Etanol | 5.571 | 10.73 | 71.800 |
| Acetona | 11.908 | 12.28 | 33.591 |

Efecto antiinflamatorio de los extractos de *F. microphylla*.

Se determinaron los efectos de las concentraciones de los extractos de etanol y acetona que no mostraron efecto tóxico en las células HT-29 en el ensayo MTT: 0.1 y 0.05 mg/mL, respectivamente. En la Figura 30 se presentan las membranas con la expresión de las proteínas anti-inflamatoria (COX-1) y pro-inflamatorias (NF- κ B, COX-2, TNF- α , IL-8).

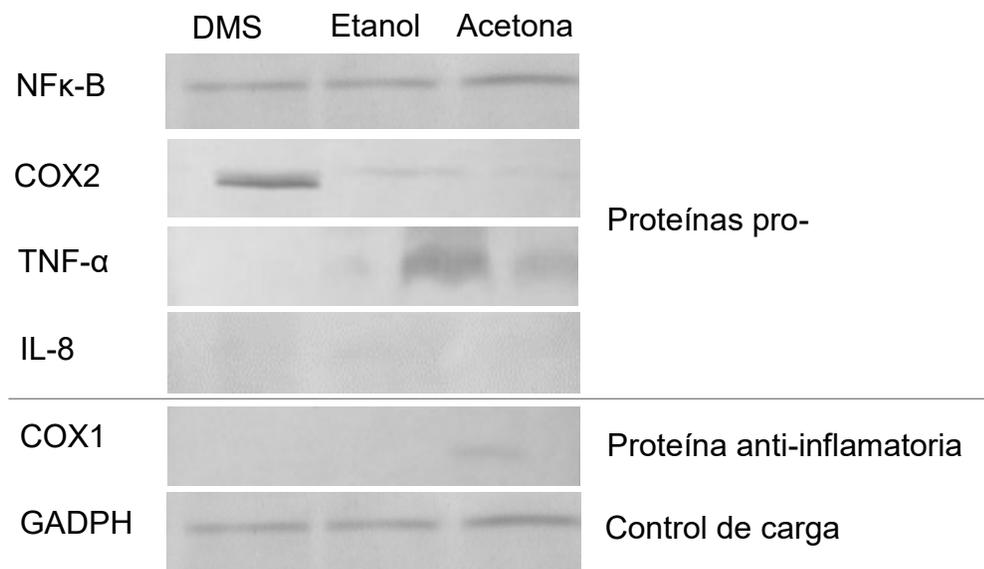


Figura 28. Expresión de proteínas pro y anti-inflamatorias en membranas de nitrocelulosa

Los resultados para ambos extractos de *F. microphylla* (Figura 31) mostraron la expresión de COX-1, NF- κ B y TNF- α y una inhibición de COX-2. Sin embargo, se observa una sobreexpresión relevante de COX-1 para el extracto de acetona. Estos resultados son indicadores de una protección a nivel epitelial por el extracto de acetona., debido a que COX-1 es responsable de la protección del tracto gastrointestinal. Por otro lado, el extracto de etanol permitió la expresión de IL-8, mientras que el extracto de acetona la inhibió considerablemente. La inhibición de esta proteína pro-inflamatoria es considerada una clave en el desarrollo del cáncer de colon (Bondurant et al., 2012).

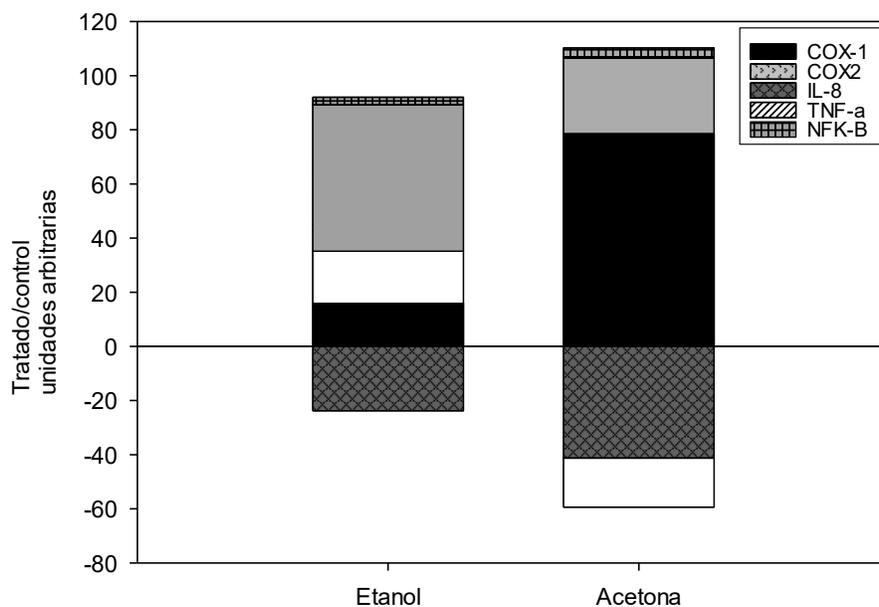


Figura 29. Efecto de los extractos de *F. microphylla* en la expresión de proteínas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias

Existen investigaciones encaminadas a controlar enfermedades inflamatorias, contrarrestando las proteínas pro-inflamatorias, como COX-2, IL-8 y TNF- α (Keyel, 2014). El efecto anti-inflamatorio del extracto de acetona puede ser atribuido a la presencia de algunos compuestos como el ácido quínico y la hidroquinona, los cuales han sido reportados con actividad anti-inflamatoria (Inbathamizh and Padmini, 2013; Sladić and Gašić, 2006). Además, otros compuestos encontrados en el extracto de acetona en menor cantidad, como el ácido cafeico y la naringina, han sido reportados por su capacidad de inhibir la IL-8 (Nie et al., 2012; Zhao et al., 2008). Por lo tanto, los resultados sugieren que el extracto de acetona puede ser considerado como un tratamiento anti-inflamatorio natural.

Efecto apoptótico de los extractos de *F. microphylla*.

Se observa la activación de los diferentes marcadores que se encuentran en las membranas de los microarreglos de apoptosis, con los tratamientos de los extractos de *F. microphylla* a las concentraciones efectivas encontradas por medio del ensayo MTT (0.4 y 0.15 para etanol y acetona, respectivamente) y los controles. Para obtener el resultado total del análisis densitométrico, los valores del DMSO se restaron a los valores de los extractos de etanol y agua, debido a que ambos extractos de *F. microphylla* se disolvieron en este reactivo para su aplicación en el tratamiento de apoptosis.

La Figura 32, muestra los marcadores de cada vía de apoptosis en las membranas con los diferentes tratamientos de control (etoposido) y extractos de *F. microphylla*.

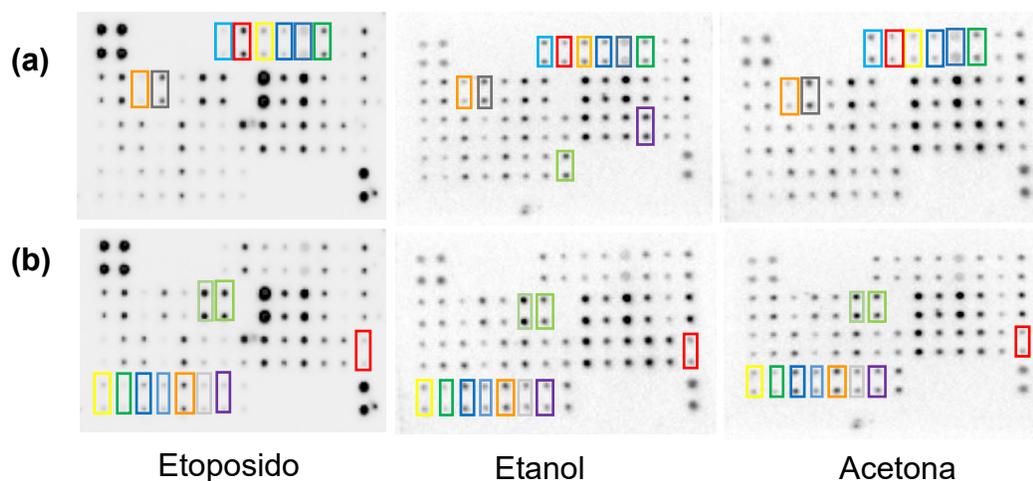


Figura 30. Expresión en membranas de marcadores de las vías de apoptosis. (a) Vía intrínseca, (b) Vía extrínseca

Los resultados para la vía intrínseca de la apoptosis con los extractos de *F. microphylla* se muestran en la Figura 33. El extracto de acetona fue capaz de estimular la activación de la vía intrínseca, presentando una relación Bax/Bcl-2 ($p<0.05$) y una expresión de SMAC significante altas al compararse con el extracto de etanol y el control, y dicha tendencia ha sido relaciona con una actividad apoptótica alta (Lee et al., 2012; Qiu et al., 2010).

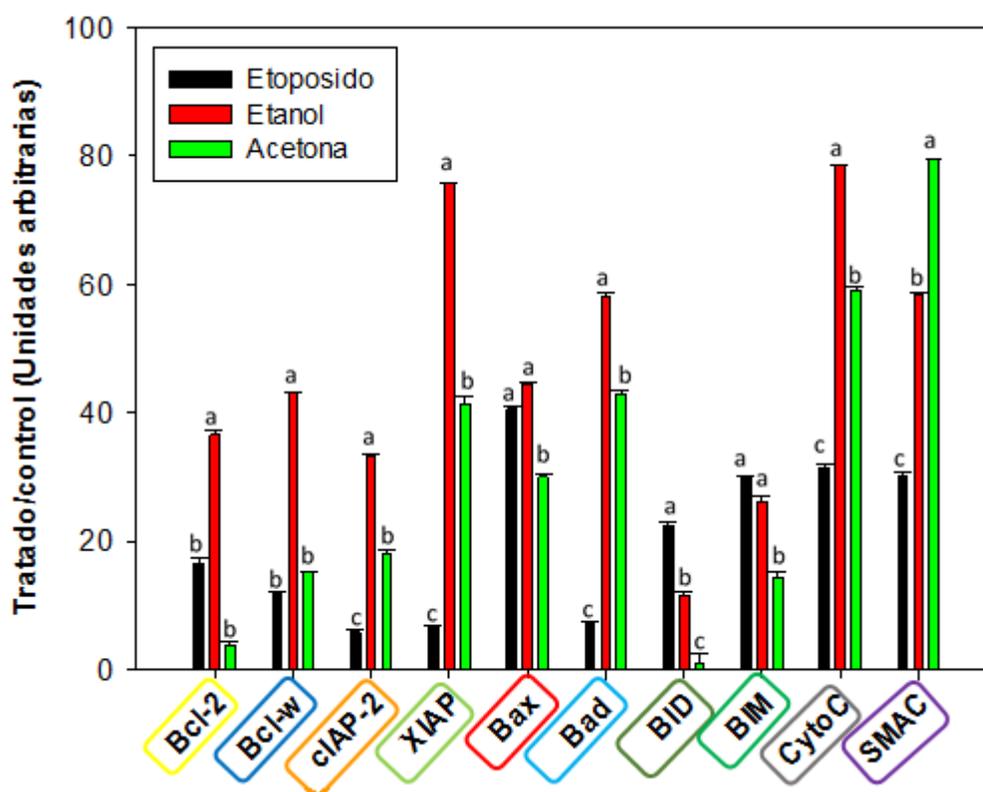


Figura 31. Efecto de los extractos en la expresión de las proteínas de la vía intrínseca de la apoptosis. Letras diferentes en la misma proteína indican diferencias significativas ($p<0.05$)

El efecto de los extracto de *F. microphylla* en la vía extrínseca se presenta en la Figura 34. El extracto de etanol mostró una expresión mayor ($p<0.05$) en la mayoría de las proteínas participantes en la vía extrínseca, excepto para sTNF-R1 que no fue estadísticamente diferente con respecto al extracto de acetona,

pero fue mayor ($p < 0.05$) que el control. Por lo tanto, el extracto de etanol fue más efectivo en la activación de la vía extrínseca que el extracto de acetona. La presencia de polifenoles y otros compuestos detectados en el extracto de etanol podrían contribuir a su efecto apoptótico, como el ácido caftarico, naringenina y luteolina (Leonardi et al., 2010; Seelinger et al., 2008).

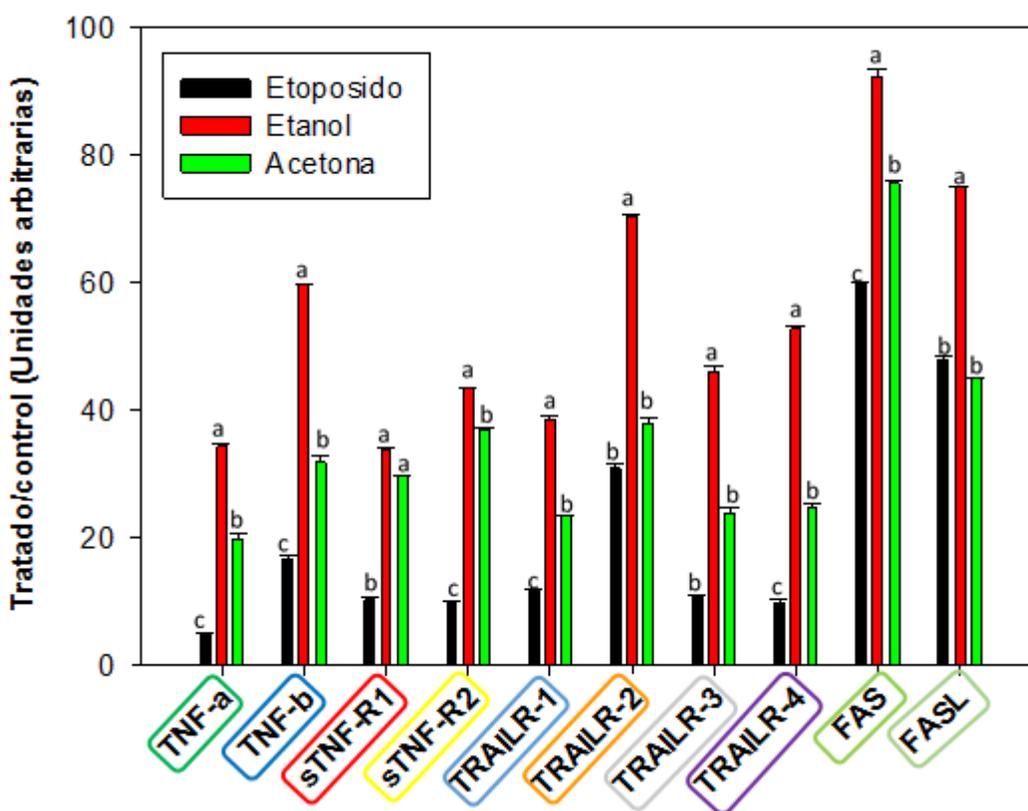


Figura 32. Efecto de los extractos en la expresión de las proteínas de la vía extrínseca de la apoptosis. Letras diferentes en la misma proteína indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Por otro lado, se observa un arresto al ciclo celular por parte de los dos extractos, siendo el extracto de etanol más eficiente que el extracto de acetona (Figura 35), mostrando mayor expresión ($p < 0.05$) de las proteínas (p21, p27 y p53)

relacionadas con este mecanismo (Figura 36). Esta actividad podría ser atribuida a la quercetina, la cual se ha reportado con actividad inductora para el arresto del ciclo celular regulado p53 y p21 sobre células HT-29(Kim et al., 2010).

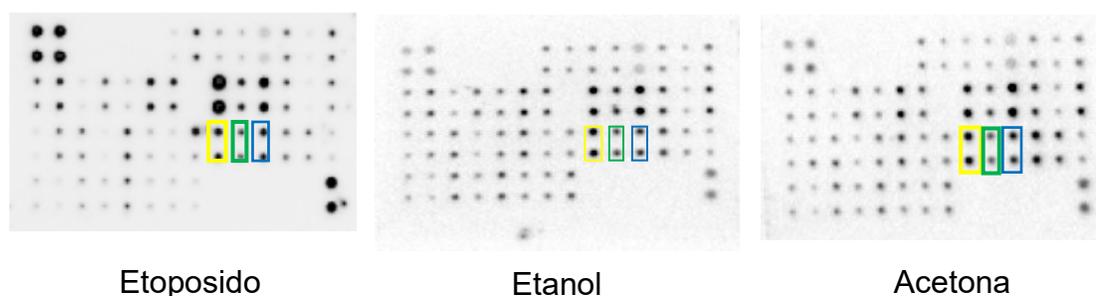


Figura 34. Expresión de las proteínas del ciclo celular en membranas de microarreglos

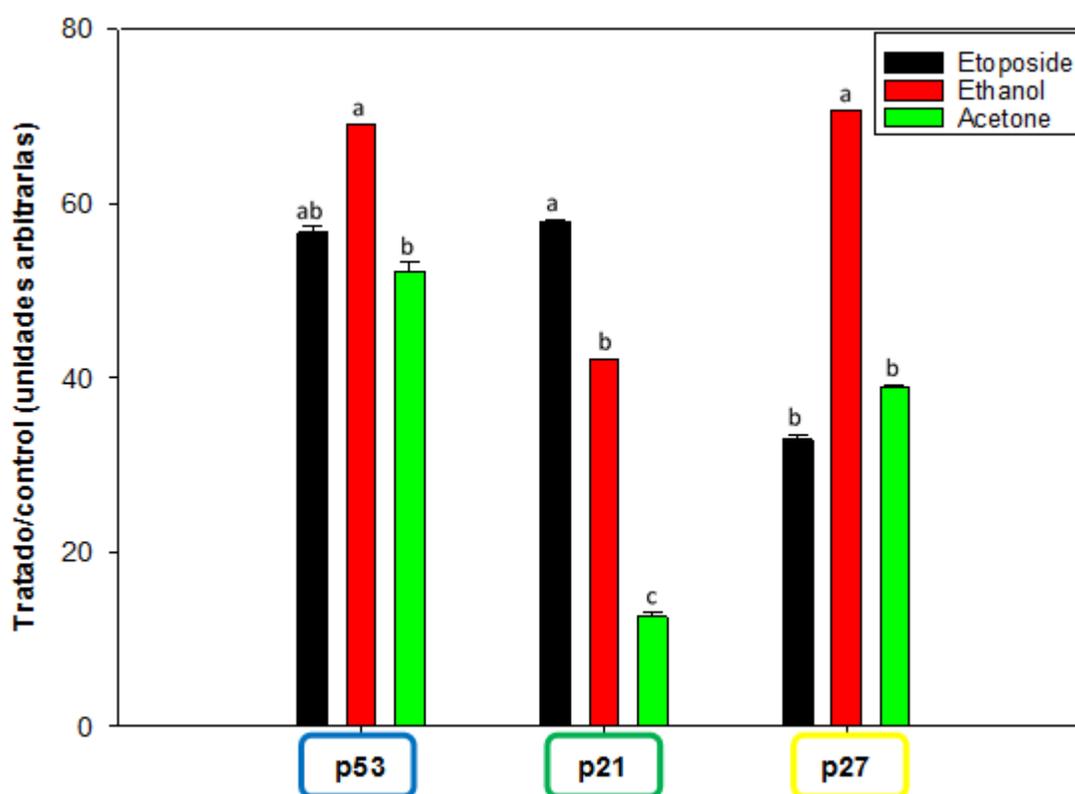


Figura 33. Efecto de los extractos de *F. microphylla* en la activación del arresto al ciclo celular por la expresión de p53, p21 y p27. Letras diferentes en la misma proteína indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

Para la fase de ejecución en el proceso de apoptosis, las vías intrínseca y extrínseca activan una serie de caspasas (Cas), terminando en la activación de la Cas-3 o Cas-7, conocidas como las caspasas efectoras (Wong, 2011).

Los resultados muestran que ambos extractos de *F. microphylla* permitieron la activación de la Cas-3 (Figura 37), indicando que el proceso de apoptosis se inició. Compuestos como ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico, el cual es presentado en concentraciones altas en ambos extractos, ha sido descrito por su habilidad de inducir apoptosis por la activación de Cas-3 en células HT-29 (Puangpraphant et al., 2011). Sin embargo, la Cas-8 solo fue activada con el extracto de etanol (Figura 38). La Cas-8 es conocida como la caspasa iniciadora de la vía extrínseca, y su activación resulta de la unión de citoquinas TNF con receptores de muerte, causando la apoptosis celular (Harmse et al., 2015; Wajant et al., 2003). De este modo, el extracto de etanol puede ser considerado como activador de la vía extrínseca. Por otro lado, el extracto de acetona podría ser activador de la vía intrínseca, una vez que la muerte celular programada puede ser conducida por la activación de otras caspasas iniciadora (ej. Cas-9), SMAC o liberación del Citocromo-c (Watson, 2004). En general, los extractos de *F. microphylla* mostraron actividad apoptótica, pero activando diferentes vías. Por lo tanto, ambos extractos podrían ser usados como un producto natural para inducir apoptosis.

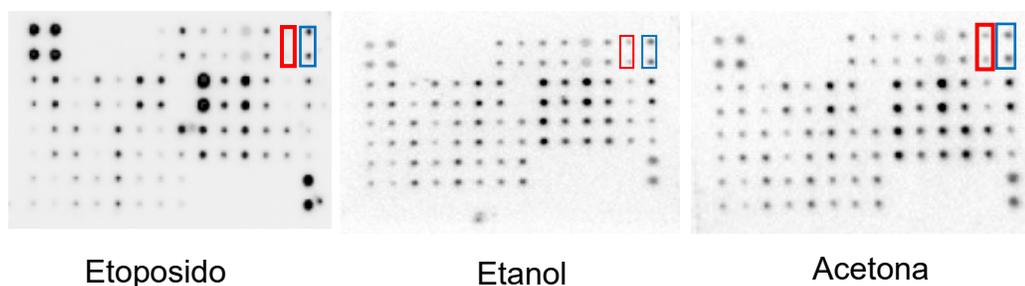


Figura 35. Expresión de Caspasas en membranas

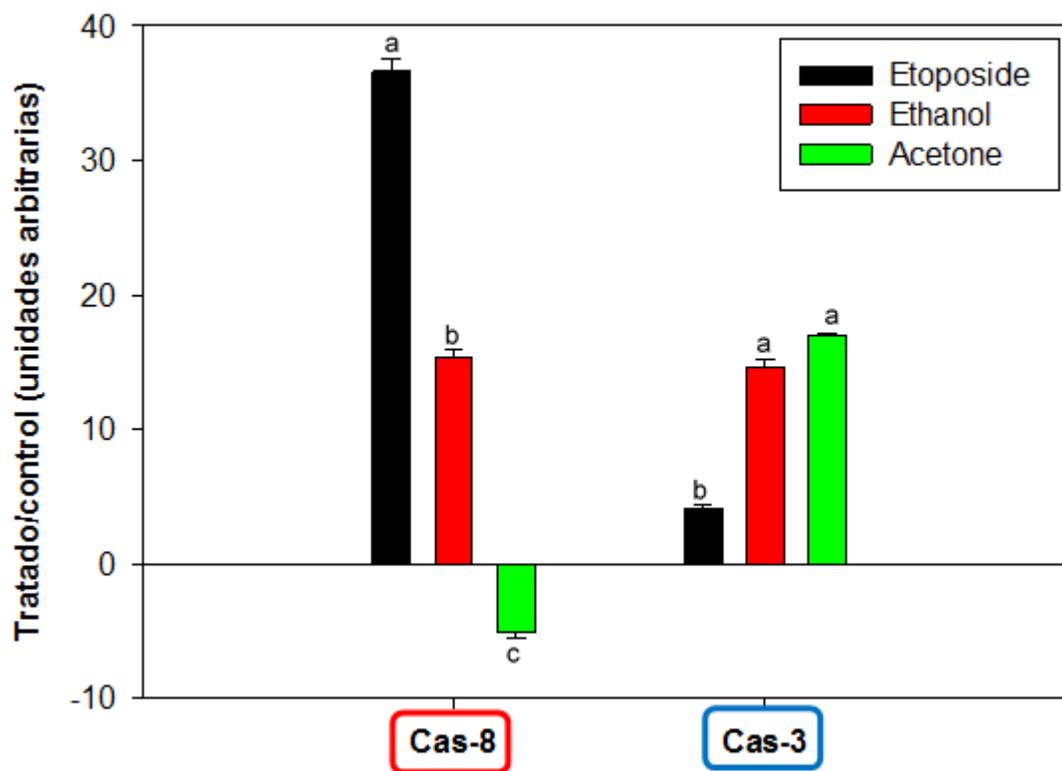


Figura 36. Activación de las Caspasas 8 y 3 en células HT-29 tratadas con extractos de *F. microphylla*. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

CONCLUSIONES

Los análisis por LC-MS/MS y GC-MS mostraron que *F. microphylla* contiene una gran fuente de compuestos antioxidantes. De acuerdo a los resultados obtenidos de los ensayos biológicos, este estudio indica que los extractos de etanol y acetona tienen actividad antiproliferativa en células de cáncer de colon HT-29. El extracto de acetona mostró ser un mejor agente anti-inflamatorio que el extracto de etanol, desde que permitió una sobreexpresión de COX-1 y NF-κB causando la inhibición de la IL-8 y COX-2. Además los hallazgos presentados indican que ambos extractos de *F. microphylla* inducen apoptosis en células HT-29: el extracto de etanol por la vía extrínseca y el extracto de acetona por la vía intrínseca. Además de lograr el arresto al ciclo celular y la activación de la Cas-3. Por lo tanto, estos resultados sugieren que los extractos de *F. microphylla* pueden ser usados como una alternativa natural para prevenir el cáncer de colon.

BIBLIOGRAFÍA

- Adame Martínez, J., Adame Martínez, H., 2000. Plantas curativas del Noreste Mexicano., 1st ed. Castillo.
- Aggarwal, B., Prasad, S., Sung, B., Krishnan, S., Guha, S., 2013. Prevention and treatment of colorectal cancer by natural agents from Mother Nature. *Curr. Colorectal Cancer Rep.* 9, 37–56.
- Aguirre-Garrido, J.F., Montiel-Lugo, D., Hernández-Rodríguez, C., Torres-Cortes, G., Millán, V., Toro, N., Martínez-Abarca, F., Ramírez-Saad, H.C., 2012. Bacterial community structure in the rhizosphere of three cactus species from semi-arid highlands in central Mexico. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 101, 891–904.
- Aiemsraad, J., Aiumlamai, S., Aromdee, C., Taweechaisupapong, S., Khunkitti, W., 2011. The effect of lemongrass oil and its major components on clinical isolate mastitis pathogens and their mechanisms of action on *Staphylococcus aureus* DMST 4745. *Res. Vet. Sci.* 91, e31–e37.
- Ainsworth, E.A., Gillespie, K.M., 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nat. Protoc.* 2, 875–877.
- Alía, M., Mateos, R., Ramos, S., Lecumberri, E., Bravo, L., Goya, L., 2006. Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2). *Eur. J. Nutr.* 45, 19–28.
- Altobelli, E., Lattanzi, a., Paduano, R., Varassi, G., di Orio, F., 2014. Colorectal cancer prevention in Europe: Burden of disease and status of screening programs. *Prev. Med.* 62, 132–141.
- Amirghofran, Z., Bahmani, M., Azadmehr, A., Javidnia, K., Miri, R., 2009. Immunomodulatory activities of various medicinal plant extracts: effects on human lymphocytes apoptosis. *Immunol. Invest.* 38, 181–192.
- Aparna, V., Dileep, K. V., Mandal, P.K., Karthe, P., Sadasivan, C., Haridas, M., 2012. Anti-Inflammatory property of n-hexadecanoic acid: structural evidence and kinetic assessment. *Chem. Biol. Drug Des.* 80, 434–439.
- Balkwill, F., Charles, K.A., Mantovani, A., 2005. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 7, 211–217.
- Balkwill, F., Mantovani, A., 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357, 539–545.

- Barba de la Rosa, A. P., Barba Montoya, A., Martínez-Cuevas, P., Hernández-Ledesma, B., León-Galván, M.F., De León-Rodríguez, A., González, C., 2010. Tryptic amaranth glutelin digests induce endothelial nitric oxide production through inhibition of ACE: Antihypertensive role of amaranth peptides. *Nitric Oxide - Biol. Chem.* 23, 106–111.
- Bayala, B., Bassole, I.H.N., Gnoula, C., Nebie, R., Yonli, A., Morel, L., Figueredo, G., Nikiema, J.B., Lobaccaro, J.M.A., Simpore, J., 2014. Chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory and anti-proliferative activities of essential oils of plants from Burkina Faso. *Plos One* 9, 1–11.
- Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O., 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 5, 9–19.
- Bondurant, K.L., Lundgreen, A., Herrick, J.S., Kadlubar, S., Wolff, R.K., Slattery, M.L., 2012. Interleukin genes and associations with colon and rectal cancer risk and overall survival. *Int. J. Cancer* 132, 905–915.
- Cachofeiro, V., Goicochea, M., de Vinuesa, S.G., Oubiña, P., Lahera, V., Luño, J., 2008. Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. *Kidney Int. Suppl.* 74, S4–S9.
- Candido, J., Hagemann, T., 2013. Cancer-related inflammation. *J. Clin. Immunol.* 33.
- Castillo, F., Hernández, D., Gallegos, G., Mendez, M., Rodríguez, R., Reyes, A., Aguilar, C.N., 2010. In vitro antifungal activity of plant extracts obtained with alternative organic solvents against *Rhizoctonia solani* Kühn. *Ind. Crops Prod.* 32, 324–328.
- Cerqueira, M.A., Souza, B.W.S., Martins, J.T., Teixeira, J.A., Vicente, A.A., 2010. Seed extracts of *Gleditsia triacanthos*: Functional properties evaluation and incorporation into galactomannan films. *Food Res. Int.* 43, 2031–2038.
- Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., Mantovani, A., 2009. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: Links to genetic instability. *Carcinogenesis* 30, 1073–1081.
- Conforti, F., Sosa, S., Marrelli, M., Menichini, F., Statti, G.A., Uzunov, D., Tubaro, A., Menichini, F., Loggia, R. Della, 2008. In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. *J. Ethnopharmacol.* 116, 144–151.
- Cooks, T., Pateras, I.S., Tarcic, O., Solomon, H., Schetter, A.J., Wilder, S., Lozano, G., Pikarsky, E., Forshev, T., Rozenfeld, N., Harpaz, N., Itzkowitz, S., Harris, C.C., Rotter, V., Gorgoulis, V.G., Oren, M., 2013. Mutant p53 prolongs NF- κ B activation and promotes chronic inflammation and inflammation-associated colorectal cancer. *Cancer Cell* 23, 634–646.
- Coussens, L.M., Werb, Z., 2002. Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860–867.

- Dai, J., Mumper, R.J., 2010. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15, 7313–7352.
- Danese, S., Mantovani, A., 2010. Inflammatory bowel disease and intestinal cancer: a paradigm of the Yin-Yang interplay between inflammation and cancer. *Oncogene* 29, 3313–3323.
- Daskiewicz, J.B., Depeint, F., Viornery, L., Bayet, C., Comte-Sarrazin, G., Comte, G., Gee, J.M., Johnson, I.T., Ndjoko, K., Hostettmann, K., Barron, D., 2005. Effects of flavonoids on cell proliferation and caspase activation in a human colonic cell line HT29: An SAR study. *J. Med. Chem.* 48, 2790–2804.
- De León, M.Á., Sáenz, A., Jasso-Cantú, D., Rodríguez, R., Pandey, A., Aguilar, C.N., 2013. Fermented *Flourensia cernua* extracts and their in vitro assay against *Penicillium expansum* and *Fusarium oxysporum*. *Food Technol. Biotechnol.* 51, 233–239.
- Delbón, N., Teresa, M., Bernardello, G., 2012. Exomorfoloía y anatomía de órganos vegetativos aéreos en especies de *Flourensia* DC (Asteraceae) con importancia fitoquímica. *Acta Bot. Brasilica* 26, 2–10.
- Diaz Napal, G.N., Carpinella, M.C., Palacios, S.M., 2009. Antifeedant activity of ethanolic extract from *Flourensia oolepis* and isolation of pinocembrin as its active principle compound. *Bioresour. Technol.* 100, 3669–3673.
- Díaz-Rivas, J.O., Herrera-Carrera, E., Gallegos-Infante, J.A., Rocha-Guzmán, N.E., González-Laredo, R.F., Moreno-Jiménez, M.R., Ramos-Gómez, M., Reynoso-Camacho, R., Larrosa-Pérez, M., Gallegos-Corona, M.A., 2015. Gastroprotective potential of *Buddleja scordioides* Kunth Scrophulariaceae infusions; effects into the modulation of antioxidant enzymes and inflammation markers in an in vivo model. *J. Ethnopharmacol.* 169, 280–286.
- Dillon, M.O., 1984. A systematic study of *Flourensia* (Asteraceae, Heliantheae). *Botany New Series* No. 16. Field Museum of Natural History, USA, pp. 59–61.
- Dou, W., Zhang, J., Sun, A., Zhang, E., Ding, L., Mukherjee, S., Wei, X., Chou, G., Wang, Z.-T., Mani, S., 2013. Protective effect of naringenin against experimental colitis via suppression of Toll-like receptor 4/NF- κ B signalling. *Br. J. Nutr.* 110, 599–608.
- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M., Mérillon, J.-M., 2009. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH , ABTS , FRAP. *J. Agric. Food Chem.* 57, 1768–1774.

- Elinav, E., Nowarski, R., Thaiss, C.A., Hu, B., Jin, C., Flavell, R.A., 2013. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nat. Rev. Cancer* 13, 759–771.
- Evan, G.I., Vousden, K.H., 2001. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411, 342–348.
- Figuerola Pérez, M.G., Rocha-Guzmán, N.E., Mercado-Silva, E., Loarca-Piña, G., Reynoso-Camacho, R., 2014. Effect of chemical elicitors on peppermint (*Mentha piperita*) plants and their impact on the metabolite profile and antioxidant capacity of resulting infusions. *Food Chem.* 156, 273–278.
- Flores-López, M.L., Romani, A., Cerqueira, M.A., Rodríguez-García, R., Jasso de Rodríguez, D., Vicente, A.A., 2016. Compositional features and bioactive properties of whole fraction from *Aloe vera* processing. *Ind. Crops Prod.* 91, 179–185.
- García, M., Gonzalez-Coloma, A., Donadel, O.J., Ardanaz, C.E., Tonn, C.E., Sosa, M.E., 2007. Insecticidal effects of *Flourensia oolepis* Blake (Asteraceae) essential oil. *Biochem. Syst. Ecol.* 35, 181–187.
- Garrett, A.R., Murray, B.K., Robison, R.A., Neill, K.L.O., 2010. *Advanced Protocols in Oxidative Stress II* 594, 251–262.
- Giansanti, V., Torriglia, A., Scovassi, A.I., 2011. Conversation between apoptosis and autophagy: Is it your turn or mine?. *Apoptosis* 16, 321–333.
- Golebiowski, M., Dawgul, M., Kamysz, W., Bogus, M.I., Wieloch, W., Wloka, E., Paszkiewicz, M., Przybysz, E., Stepnowski, P., 2012. Antimicrobial activity of alcohols from *Musca domestica*. *J. Exp. Biol.* 215, 3419–3428.
- Grivennikov, S.I., 2013. Inflammation and colorectal cancer: Colitis-associated neoplasia. *Semin. Immunopathol.* 35, 229–244.
- Grivennikov, S.I., Greten, F.R., Karin, M., 2010. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell* 140, 883–899.
- Guerrero-Rodríguez, E., Solís Gaona, S., Hernández-Castillo, F.D., Flores-Olivas, A., Sandoval-López, V., Jasso-Cantú, D., 2007. Actividad Biológica in vitro de Extractos de *Flourensia cernua* D.C. en Patógenos de Postcosecha: *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Keissl., *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. y *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc.. *Rev. Mex. Fitopatol.* 25, 48–53.
- Hameed, I.H., Hussein, H.J., Kareem, M.A., Hamad, N.S., 2015. Identification of five newly described bioactive chemical compounds in methanolic extract of *Mentha viridis* by using gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS). *J. Pharmacogn. Phyther.* 7, 107–125.

- Han, T., Li, H.L., Zhang, Q.Y., Han, P., Zheng, H.C., Rahman, K., Qin, L.P., 2007. Bioactivity-guided fractionation for anti-inflammatory and analgesic properties and constituents of *Xanthium strumarium* L. *Phytomedicine* 14, 825–829.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144, 646–674.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100, 57–70.
- Harmse, L., Dahan-Farkas, N., Panayides, J.-L., van Otterlo, W., Penny, C., 2015. Aberrant apoptotic response of colorectal cancer cells to novel nucleoside analogues. *Plos one* 10, e0138607.
- Hassan, M.Z., Khan, S.A., Amir, M., 2012. Design, synthesis and evaluation of N - (substituted benzothiazol-2-yl) amides as anticonvulsant and neuroprotective. *Eur. J. Med. Chem.* 58, 206–213.
- Herrera-Carrera, E., Moreno-Jiménez, M.R., Rocha-Guzmán, N.E., Gallegos-Infante, J.A., Díaz-Rivas, J.O., Gamboa-Gómez, C.I., González-Laredo, R.F., Yildiz, F., 2015. Phenolic composition of selected herbal infusions and their anti-inflammatory effect on a colonic model in vitro in HT-29 cells. *Cogent Food Agric.* 1, 1059033.
- Inbathamizh, L., Padmini, E., 2013. Quinic acid as a potent drug candidate for prostate cancer - A comparative pharmacokinetic approach. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 6, 106–112.
- Ishikawa, Y., Kitamura, M., 2000. Anti-apoptotic effect of quercetin: Intervention in the JNK- and ERK-mediated apoptotic pathways. *Kidney Int.* 58, 1078–1087.
- Jasso de Rodríguez, D., Hernández-Castillo, D., Angulo-Sánchez, J.L., Rodríguez-García, R., Villarreal Quintanilla, J.A., Lira-Saldivar, R.H., 2007. Antifungal activity in vitro of *Flourensia* spp. extracts on *Alternaria* sp., *Rhizoctonia solani*, and *Fusarium oxysporum*. *Ind. Crops Prod.* 25, 111–116.
- Jasso De Rodríguez, D., Rodríguez García, R., Hernández Castillo, F.D., Aguilar González, C.N., Sáenz Galindo, A., Villarreal Quintanilla, J.A., Moreno Zuccolotto, L.E., 2011. In vitro antifungal activity of extracts of Mexican Chihuahuan Desert plants against postharvest fruit fungi. *Ind. Crops Prod.* 34, 960–966.
- Joray, M.B., Rollán, M. del R., Ruíz, G.M., Palacios, S.M., Carpinella, M.C., 2011. Antibacterial Activity of Extracts from Plants of Central Argentina — Isolation of an Active Principle from *Achyrocline satureioides* 77, 95–100.

- Jungbauer, A., Medjakovic, S., 2012. Anti-inflammatory properties of culinary herbs and spices that ameliorate the effects of metabolic syndrome. *Maturitas* 71, 227–239.
- Kathiria, A.S., Butcher, L.D., Feagins, L.A., Souza, R.F., Boland, C.R., Theiss, A.L., 2012. Prohibitin 1 modulates mitochondrial stress-related autophagy in human colonic epithelial cells. *Plos one* 7, e31231.
- Keller, J., Camaré, C., Bernis, C., Astello-García, M., de la Rosa, A.P.B., Rossignol, M., del Socorro Santos Díaz, M., Salvayre, R., Negre-Salvayre, A., Guéraud, F., 2015. Antiatherogenic and antitumoral properties of *Opuntia cladodes*: inhibition of low density lipoprotein oxidation by vascular cells, and protection against the cytotoxicity of lipid oxidation product 4-hydroxynonenal in a colorectal cancer cellular model. *J. Physiol. Biochem.* 71, 577–587.
- Keyel, P.A., 2014. How is inflammation initiated? Individual influences of IL-1, IL-18 and HMGB1. *Cytokine* 69, 136–145.
- Kim, H.J., Kim, S.K., Kim, B.S., Lee, S.H., Park, Y.S., Park, B.K., Kim, S.J., Kim, J., Choi, C., Kim, J.S., Cho, S.D., Jung, J.W., Roh, K.H., Kang, K.S., Jung, J.Y., 2010. Apoptotic effect of quercetin on HT-29 colon cancer cells via the AMPK signaling pathway. *J. Agric. Food Chem.* 58, 8643–8650.
- Kinnunen, T., Koskela, M., 1991. Antibacterial and antifungal properties of propylene glycol, hexylene glycol, and 1,3-butylene glycol in vitro. *Acta Derm. Venereol.* 71, 148–150.
- Kohen, R., Nyska, A., 2002. Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol. Pathol.* 30, 620–650.
- Kurata, R., Adachi, M., Yamakawa, O., Yoshimoto, M., 2007. Growth suppression of human cancer cells by polyphenolics from sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) leaves. *J. Agric. Food Chem.* 55, 185–190.
- Lee, J.S., Jung, W.-K., Jeong, M.H., Yoon, T.R., Kim, H.K., 2012. Sanguinarine Induces Apoptosis of HT-29 Human Colon Cancer Cells via the Regulation of Bax/Bcl-2 Ratio and Caspase-9-Dependent Pathway. *Int. J. Toxicol.* 31, 70–77.
- Leonardi, T., Vanamala, J., Taddeo, S.S., Davidson, L.A., Murphy, M.E., Patil, B.S., Wang, N., Carroll, R.J., Chapkin, R.S., Lupton, J.R., Turner, N.D., 2010. Apigenin and naringenin suppress colon carcinogenesis through the aberrant crypt stage in azoxymethane-treated rats. *Exp. Biol. Med.* 235, 710–7.
- Li, H., Horke, S., Förstermann, U., 2013. Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention. *Trends Pharmacol. Sci.* 34, 313–319.

- Lin, Y., Shi, R., Wang, X., Shen, H.-M., 2008. Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy. *Curr. Cancer Drug Targets* 8, 634–646.
- Lindgren, E.B., De Brito, M.A., Vasconcelos, T.R.A., De Moraes, M.O., Montenegro, R.C., Yoneda, J.D., Leal, K.Z., 2014. Synthesis and anticancer activity of (E)-2-benzothiazole hydrazones. *Eur. J. Med. Chem.* 86, 12–16.
- Lu, J., Papp, L. V., Fang, J., Rodriguez-Nieto, S., Zhivotovsky, B., Holmgren, A., 2006. Inhibition of mammalian thioredoxin reductase by some flavonoids: Implications for myricetin and quercetin anticancer activity. *Cancer Res.* 66, 4410–4418.
- Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 101, 13–30.
- Magnusson, M., Wang, T.J., Clish, C., Engström, G., Nilsson, P., Gerszten, R.E., Melander, O., 2015. Dimethylglycine deficiency and the development of diabetes. *Diabetes* 64, 3010–3016.
- Maniati, E., Bossard, M., Cook, N., Candido, J.B., Emami-shahri, N., Nedospasov, S. a, Balkwill, F.R., Tuveson, D. a, Hagemann, T., 2011. Crosstalk between the canonical NF- κ B and Notch signaling pathways inhibits Ppar γ expression and promotes pancreatic cancer progression in mice. *J. Clin. Invest.* 121, 4685–4699.
- Manosroi, J., Sainakham, M., Manosroi, W., Manosroi, A., 2012. Anti-proliferative and apoptosis induction activities of extracts from Thai medicinal plant recipes selected from MANOSROI II database. *J. Ethnopharmacol.* 141, 451–459.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., Balkwill, F., 2008. Cancer-related inflammation. *Nature* 454, 436–444.
- Mata, R., Bye, R., Linares, E., Macías, M., Rivero-Cruz, I., Pérez, O., Timmermann, B.N., 2003. Phytotoxic compounds from *Flourensia cernua*. *Phytochemistry* 64, 285–291.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P.R., Van Beek, T.A., 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem.* 85, 231–237.
- Mishra, P., Samanta, L., 2012. Oxidative Stress and Heart Failure in Altered Thyroid States. *Sci. World J.* 2012, 1–17.
- Moreno-Jiménez, M.R., Cervantes-Cardoza, V., Gallegos-Infante, J.A., González-Laredo, R.F., Estrella, I., García-Gasca, T. de J., Herrera-Carrera, E., Díaz-Rivas, J.O., Rocha-Guzmán, N.E., 2015. Phenolic composition changes of processed common beans: Their antioxidant and anti-inflammatory effects in intestinal cancer cells. *Food Res. Int.* 76, 79–85.

- Moreno-Jimenez, M.R., Trujillo-Esquivel, F., Gallegos-Corona, M.A., Reynoso-Camacho, R., González-Laredo, R.F., Gallegos-Infante, J.A., Rocha-Guzmán, N.E., Ramos-Gomez, M., 2015. Antioxidant, anti-inflammatory and anticarcinogenic activities of edible red oak (*Quercus* spp.) infusions in rat colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine. *Food Chem. Toxicol.* 80, 144–153.
- Mueller, M., Hobiger, S., Jungbauer, A., 2010. Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices. *Food Chem.* 122, 987–996.
- Mukherjee, K., Tribedi, P., Mukhopadhyay, B., Sil, A.K., 2013. Antibacterial activity of long-chain fatty alcohols against mycobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 338, 177–183.
- Mukhopadhyay, S., Panda, P.K., Sinha, N., Das, D.N., Bhutia, S.K., 2014. Autophagy and apoptosis: Where do they meet?. *Apoptosis* 19, 555–566.
- Nie, Y.-C., Wu, H., Li, P.-B., Luo, Y.-L., Long, K., Xie, L.-M., Shen, J.-G., Su, W.-W., 2012. Anti-inflammatory effects of naringin in chronic pulmonary neutrophilic inflammation in cigarette smoke-exposed rats. *J. Med. Food* 15, 894–900.
- Noratto, G.D., Kim, Y., Talcott, S.T., Mertens-Talcott, S.U., 2011. Flavonol-rich fractions of yaupon holly leaves (*Ilex vomitoria*, Aquifoliaceae) induce microRNA-146a and have anti-inflammatory and chemopreventive effects in intestinal myofibroblast CCD-18Co cells. *Fitoterapia* 82, 557–569.
- Olivares, S.E., 2015. Paquete de diseños experimentales. FAUANL. Marin, N.L.
- Ortega-Ramirez, L.A., Rodriguez-Garcia, I., Leyva, J.M., Cruz-Valenzuela, M.R., Silva-Espinoza, B.A., Gonzalez-Aguilar, G.A., Siddiqui, M.W., Ayala-Zavala, J.F., 2014. Potential of medicinal plants as antimicrobial and antioxidant agents in food industry: A hypothesis. *J. Food Sci.* 79, 129–137.
- Pachuta-Stec, A., Rzymowska, J., Mazur, L., Mendyk, E., Pitucha, M., Rzaczyńska, Z., 2009. Synthesis, structure elucidation and antitumour activity of N-substituted amides of 3-(3-ethylthio-1,2,4-triazol-5-yl)propenoic acid. *Eur. J. Med. Chem.* 44, 3788–3793.
- Park, H.-J., 2010. Chemistry and pharmacological action of caffeoylquinic acid derivatives and pharmaceutical utilization of chwinamul (Korean Mountainous vegetable). *Arch. Pharm. Res.* 33, 1703–20.
- Puangpraphant, S., Berhow, M.A., Vermillion, K., Potts, G., Gonzalez de Mejia, E., 2011. Dicafeoylquinic acids in Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) inhibit NF- κ B nucleus translocation in macrophages and induce apoptosis by activating caspases-8 and -3 in human colon cancer cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 55, 1509–1522.

- Qiu, W., Wang, X., Leibowitz, B., Liu, H., Barker, N., Okada, H., Oue, N., Yasui, W., Clevers, H., Schoen, R.E., Yu, J., Zhang, L., 2010. Chemoprevention by nonsteroidal anti-inflammatory drugs eliminates oncogenic intestinal stem cells via SMAC-dependent apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 20027–20032.
- Rajeswari, G., Murugan, M., Mohan, V.R., 2013. GC-MS analysis of bioactive components of *Hugonia mystax* L. bark (Linaceae). *J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* 29, 818–824.
- Reyes, M.G., Torres, M.J., Maggi, M.D., Marioli, J.M., Gil, R.R., Sosa, V.E., Uriburu, M.L., Audisio, M.C., 2013. In vitro inhibition of *Paenibacillus larvae* by different extracts and pure compounds from *Flourensia* spp. *Ind. Crops Prod.* 50, 758–763.
- Rios, M.Y., Estrada-Soto, S., Flores-Morales, V., Aguilar, M.I., 2013. Chemical constituents from *Flourensia resinosa* S.F. Blake (Asteraceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 51, 240–242.
- Rocha-Guzmán, N.E., Gallegos-Infante, J.A., González-Laredo, R.F., Reynoso-Camacho, R., Ramos-Gómez, M., García-Gasca, T., Rodríguez-Muñoz, M.E., Guzmán-Maldonado, S.H., Medina-Torres, L., Lujan-García, B.A., 2009. Antioxidant activity and genotoxic effect on HeLa cells of phenolic compounds from infusions of *Quercus resinosa* leaves. *Food Chem.* 115, 1320–1325.
- Rosales-Castro, M., González-Laredo, R.F., Rocha-Guzmán, N.E., Gallegos-Infante, J.A., María José Rivas-Arreola, M.J., Karchesy, J.J., 2012. Antioxidant activity of fractions from *Quercus sideroxylla* bark and identification of proanthocyanidins by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Holzforschung* 66, 577–584.
- Rubin, D.C., Shaker, A., Levin, M.S., 2012. Chronic intestinal inflammation: Inflammatory bowel disease and colitis-associated colon cancer. *Front. Immunol.* 3, 1–10.
- Salazar, R., Pozos, M.E., Cordero, P., Perez, J., Salinas, M.C., Waksman, N., 2008. Determination of the antioxidant activity of plants from northeast Mexico. *Pharm. Biol.* 46, 166–170.
- Sánchez-Burgos, J.A., Ramírez-Mares, M. V., Larrosa, M.M., Gallegos-Infante, J.A., González-Laredo, R.F., Medina-Torres, L., Rocha-Guzmán, N.E., 2013. Antioxidant, antimicrobial, antitopoisomerase and gastroprotective effect of herbal infusions from four *Quercus* species. *Ind. Crops Prod.* 42, 57–62.

- Santos, M.D. dos, Chen, G., Almeida, M.C., Soares, D.M., Souza, G.E.P. de, Lopes, N.P., Lantz, R.C., 2010. Effects of caffeoylquinic acid derivatives and C-flavonoid from *Lychnophora ericoides* on in vitro inflammatory mediator production. *Nat. Prod. Commun.* 5, 733–740.
- Schieber, M., Chandel, N.S., 2014. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr. Biol.* 24, R453–R462.
- Schütz, K., Kammerer, D., Carle, R., Schieber, A., 2004. Identification and quantification of caffeoylquinic acids and flavonoids from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads, juice, and pomace by HPLC-DAD-ESI/MSn. *J. Agric. Food Chem.* 52, 4090–4096.
- Seelinger, G., Merfort, I., Wölfle, U., Schempp, C.M., 2008. Anti-carcinogenic effects of the flavonoid luteolin. *Molecules* 13, 2628–2651.
- Sies, H., 2015. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* 4, 180–183.
- Silva, M.P., Piazza, L.A., López, D., López Rivilli, M.J., Turco, M.D., Cantero, J.J., Tourn, M.G., Scopel, A.L., 2012. Phytotoxic activity in *Flourensia campestris* and isolation of (-)-hamanasic acid A as its active principle compound. *Phytochemistry* 77, 140–148.
- Simin, N., Orcic, D., Cetojevic-Simin, D., Mimica-Dukic, N., Anackov, G., Beara, I., Mitic-Culafic, D., Bozin, B., 2013. Phenolic profile, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activities of small yellow onion (*Allium flavum* L. subsp. *flavum*, Alliaceae). *LWT - Food Sci. Technol.* 54, 139–146.
- Sladić, D., Gašić, M.J., 2006. Reactivity and biological activity of the marine sesquiterpene hydroquinone avarol and related compounds from sponges of the order dictyoceratida. *Molecules* 11, 1–33.
- Subashini, S., Rameshkannan, V., Mani, P., 2015. PHYTOCHEMICAL AND GC-MS ANALYSIS OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM *Borassus flabellifer* Linn ROOT. *Eur. J. Mol. Biol. Biochem.* 2, 148–152.
- Tellez, M., Estell, R., Fredrickson, E.D., Powell, J., Wedge, D., Schrader, K., 2001. Extracts of *Flourensia cernua* (l): volatile constituents and antifungal , antialgal , 27, 2263–2273.
- Tormo, D., Checińska, A., Alonso-Curbelo, D., Pérez-Guijarro, E., Cañón, E., Riveiro-Falkenbach, E., Calvo, T.G., Larribere, L., Megías, D., Mulero, F., Piris, M.A., Dash, R., Barral, P.M., Rodríguez-Peralto, J.L., Ortiz-Romero, P., Tüting, T., Fisher, P.B., Soengas, M.S., 2009. Targeted activation of innate immunity for therapeutic induction of autophagy and apoptosis in melanoma cells. *Cancer Cell* 16, 103–114.
- Turner, J.J.O., Foxwell, K.M., Kanji, R., Brenner, C., Wood, S., Foxwell, B.M.J., Feldmann, M., 2010. Investigation of nuclear factor- κ B inhibitors and

interleukin-10 as regulators of inflammatory signalling in human adipocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 162, 487–493.

- Valavanidis, A., Vlachogianni, T., Fiotakis, K., Loridas, S., 2013. Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer: Respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanisms. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 10, 3886–3907.
- Van Kempen, L.C.L., de Visser, K.E., Coussens, L.M., 2006. Inflammation, proteases and cancer. *Eur. J. Cancer* 42, 728–734.
- Vodovotz, Y., Constantine, G., Rubin, J., Csete, M., Voit, E.O., An, G., 2009. Mechanistic simulations of inflammation: Current state and future prospects. *Math. Biosci.* 217, 1–10.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., Scheurich, P., 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death.Differ.* 10, 45–65. 189
- Watson, A.J.M., 2004. Apoptosis and Colorectal Cancer. *Gut* 53, 1701–1709.
- Wen, C.T.P., Hussein, S.Z., Abdullah, S., Karim, N.A., Makpol, S., Yusof, Y.A.M., 2012. Gelam and nenas honeys inhibit proliferation of HT-29 colon cancer cells by inducing DNA damage and apoptosis while suppressing inflammation. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 13, 1605–1610.
- Witaicenis, A., Seito, L.N., Da Silveira Chagas, A., De Almeida, L.D., Luchini, A.C., Rodrigues-Orsi, P., Cestari, S.H., Di Stasi, L.C., 2014. Antioxidant and intestinal anti-inflammatory effects of plant-derived coumarin derivatives. *Phytomedicine* 21, 240–246.
- Wong, R.S.Y., 2011. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 30, 87.
- Wong, S.K., Lim, Y.Y., Ling, S.K., Chan, E.W.C., 2014. Caffeoylquinic acids in leaves of selected Apocynaceae species: Their isolation and content. *Pharmacognosy Res.* 6, 67–72.
- Wong Paz, J.E., Muñoz Márquez, D.B., Martínez Ávila, G.C.G., Belmares Cerda, R.E., Aguilar, C.N., 2015. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from native plants in the Mexican desert. *Ultrason. Sonochem.* 22, 474–481.
- Wong-Paz, J.E., Contreras-Esquivel, J.C., Rodríguez-Herrera, R., Carrillo-Inungaray, M.L., López, L.I., Nevárez-Moorillón, G. V., Aguilar, C.N., 2015. Total phenolic content, in vitro antioxidant activity and chemical composition of plant extracts from semiarid Mexican region. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 8, 104–111.

- Wong-Paz, J.E., Muñiz-Márquez, D.B., Aguilar-Zárate, P., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar, C.N., 2014. Microplate quantification of total phenolic content from plant extracts obtained by conventional and ultrasound methods. *Phytochem. Anal.* 439–444.
- World Health Organization, 2014. Cancer Country Profiles [WWW Document]. URL http://www.who.int/cancer/country-profiles/mex_en.pdf?ua=1
- Zhao, Z., Hee, S.S., Satsu, H., Totsuka, M., Shimizu, M., 2008. 5-Caffeoylquinic acid and caffeic acid down-regulate the oxidative stress- and TNF- α -induced secretion of interleukin-8 from Caco-2 cells. *J. Agric. Food Chem.* 56, 3863–3868.