



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Nutrición Humana

**Efecto potenciador de la irradiación UV sobre compuestos fenólicos y
capacidad antiproliferativa *in vitro* de extractos de fresa (*Fragaria x.
ananassa* Duch)**

Tesis

Que para obtener el grado de Maestro en Nutrición Humana

Presenta

L.N. Dulce María Soria Lara

Co-dirigido por

Dra. Herlinda Aguilar Zavala

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
México
Agosto, 2015

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Nutrición Humana

**Efecto potenciador de la irradiación UV sobre compuestos fenólicos y
capacidad antiproliferativa *in vitro* de extractos de fresa (*Fragaria x.
ananassa* Duch)**

Tesis

Que para obtener el grado de Maestro en Nutrición Humana

Presenta

L.N. Dulce María Soria Lara

Co-dirigido por

Dra. Herlinda Aguilar Zavala

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca

Sinodales

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca

Presidente

Dra. Herlinda Aguilar Zavala

Secretario

Dr. Vicente Beltrán Campos

Sinodal

Dr. Roberto Augusto Ferriz Martínez

Sinodal

Dr. Jorge Luis Chávez Servín

Sinodal

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Directora de la Facultad

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
México
Agosto, 2015

Resumen

La fresa es un alimento catalogado como nutraceutico, debido al contenido de compuestos orgánicos no nutricios, que funcionan como metabolitos secundarios en la planta y en el ser humano tienen acción de antioxidante, además de participar como moléculas de señalización celular. En el presente trabajo se determinó el contenido de antocianinas (cianidina-3-glucosido, pelargonidina-3-glucosido, pelargonidina-3-rutosido), fenoles totales (equivalentes de ácido gálico) y taninos condensados (equivalentes de catequina), así como su capacidad antioxidante, contenido de fisetina, se probó su efecto en células de cáncer de mama. Para ello, se obtuvieron cuatro diferentes extractos: acuoso (100%), etanólico (50%), metanólico (80%) y acetona (99%), con su respectivo control. Se observó que el extracto acuoso fue el mejor medio para la extracción de fenoles y taninos sin embargo, el extracto etanólico obtuvo concentraciones superiores estadísticamente en el contenido de antocianinas, fenoles, taninos, capacidad antioxidante y fisetina. Posteriormente, se determinó el efecto antiproliferativo sobre células de cáncer de mama y en células de linfoma de rata, mediante una curva de dosis respuesta utilizando el extracto etanólico. Se obtuvo un mayor efecto antiproliferativo con el extracto irradiado de fresa. El extracto etanólico de fresa irradiada fue el más eficiente para potenciar el contenido de compuestos fenólicos. Futuros estudios se concentrarán en efectos biológicos sobre otro tipo de células.

Palabras clave: cáncer de mama, flavonoides, fresa, *Fragaria sp*

Summary

Strawberry is listed as a nutraceutical food due to its non-nutritional content of organic compounds, which function as secondary metabolites in the plant and in humans have antioxidant action and participated as cell signaling molecules. In this paper the content of anthocyanins (cyanidin-3-glucoside, pelargonidin-3-glucoside, pelargonidin-3-rutinoside), total phenols (gallic acid equivalents) and condensed tannins (catechin equivalents) was determined as well as their antioxidant capacity, fisetin content and its effect on breast cancer cells. Four different extracts were obtained: Aqueous (100%), ethanol (50%), methanol (80%) and acetone (99%) extracts, with their respective controls. It was observed that the aqueous extract was better for the extraction of phenols and tannins however, with the ethanol extract is was obtained higher concentrations of anthocyanins, phenols, tannins, antioxidant capacity and fisetin. Subsequently, the antiproliferative effect on breast cancer cells and rat lymphoma cells was determined by a dose response curve using the ethanolic extract. Greater antiproliferative effect was obtained with irradiated strawberry extract. The ethanol extract of irradiated strawberry was the most efficient to enhance the content of phenolic compounds. Future studies will focus on biological effects on other cell types

Key words: strawberry, flavonoid, breast cancer, *Fragaria sp*

Este trabajo está dedicado a Dios, a mi Padre y a mi hija.

Gracias por ser los motores de mi vida.

Agradecimientos

Quiero agradecer a todas las personas que hicieron posible este trabajo, desde los que me ayudaron hasta las personas que solo me causaron tropiezos, pero en especial quiero agradecer a:

A Dios, gracias por darme vida, ánimo y esperanza, para que cada día pudiera realizarme como persona, estudiante, madre, hija y esposa. Gracias por que siempre has estado a mi lado.

A mi papá, gracias por ser el mejor padre del mundo, por haber sido también un padre para mi hija cuando yo estaba ausente en la casa por causa de la escuela, gracias por haber cuidado de mí y de ella. Gracias por haberte esforzado tanto por mi educación y porque aunque mis decisiones no eran de tu agrado, siempre me apoyaste y me brindaste tu ayuda. Y aun después de haberte ido te has convertido en un ángel que cuida de nosotros.

A mi mamá, por todos los días que dedico al cuidado de mi pequeña y de mi persona, por ese apoyo incondicional que me da todos los días, sin ti nada de esto sería posible, gracias por luchar por mis sueños.

A mí beba: Elsy Johana, por su amor, su sonrisa y su paciencia, ya que a pesar de ser tan pequeña entiendes mis necesidades.

A sula, por ser una gran hermana y aunque a veces te enojas, siempre me ayudas; A mis hermanos, Juan y Lalo, porque sin ustedes no hubiera forjado mi carácter ni mi fuerza, gracias por el apoyo y por la comprensión.

A CONACYT, por el apoyo para la realización de este proyecto.

A Elena, gracias por tu amistad y porque sin ti, mis días hubieran sido muy tristes y largos.

A Pame, porque eres un ejemplo de vida para mí, me enseñaste muchísimas cosas profesionalmente y como personal, gracias por tu amistad y todo el tiempo que invertiste al apoyo de mi proyecto.

A la Dra Herlinda, que a pesar de todas las adversidades siempre ha creído en mí, y a pesar de todos los problemas que se le presentaron siempre me apoyo, y estuvo conmigo. Muchas gracias por todo.

Índice general

Resumen	3
Summary	4
Agradecimientos.....	6
Índice general.....	7
Índice de cuadros	10
Índice de figuras	11
I. Introducción.....	11
II. Antecedentes	14
2.1 Origen y clasificación botánica de la fresa (<i>Fragaria x ananassa</i> Duch)	14
2.2 Importancia económica	16
2.2.1 Producción mundial.....	16
2.2.2 Producción nacional	17
2.3 Uso de la luz ultravioleta en fresa	18
2.4 Importancia nutricional, funcional y nutracéutica de la fresa	22
2.4.1 Composición nutricional de la fresa.....	22
2.4.2 Compuestos fenólicos de la fresa	23
2.4.2.1 Fenoles.....	24
a) Antocianinas.....	24
b) Catequina.....	26
c) Flavonoides	26
2.4.2.2 Fisetina.....	27
2.5 Fresa como alimento funcional.....	29
2.6 La fisetina como agente anticancerígeno	32
2.7 Cáncer.....	37
2.7.1 Definición y características de la enfermedad	37
2.8 Etapas en el desarrollo del Cáncer	39
2.9 Genética del cáncer	41
2.9.1 Protooncogenes y oncogenes	42
2.9.2 Genes supresores de tumores	43
2.10 Apoptosis.....	45

2.10.1 Proteínas de la familia Bcl-2	47
2.10.2 Familia de las Caspasas	48
2.11 Papel del Glutathión en la promoción de Apoptosis para el tratamiento del cáncer.	50
III.JUSTIFICACIÓN	51
IV. HIPOTESIS.....	52
V. OBJETIVO GENERAL	52
5.1 Objetivos específicos	52
VI. Materiales y Métodos	53
6.1 Diseño Experimental	53
6.2 Características de la línea celular	53
6.2.1 Cultivo celular cáncer de mama	53
6.2.2 Cultivo celular de linfoma	54
6.3 Extracto de fresa potenciado en compuestos fenólicos	55
6.3.1 Muestra tratada por irradiación.....	55
6.3.2 Extractos de fresa	55
6.4 Calidad nutracéutica.....	58
6.4.1 Determinación de antocianinas	58
6.4.2 Determinación de Fenoles totales	59
6.4.3 Determinación de taninos condensados.....	60
6.4.4 Flavonoides Totales	61
6.4.5 Medición de Fisetina por HPLC.....	62
6.5 Capacidad antioxidante	62
6.5.1 Método de FRAP	62
6.5.2 Método de DPPH	63
6.6 Evaluación biológica.....	64
6.6.1 Curva dosis respuesta.....	64
VII. Análisis estadístico	66
VIII. Resultados y Discusión.....	67
IX. CONCLUSIONES	79
X. PERSPECTIVAS	80

XI. REFERENCIAS	81
X.II Anexos	103

Índice de cuadros

N. de Cuadro	Descripción	Pág.
1	Escala de producción a nivel mundial de la fresa	16
2	Composición nutrimental de la fresa en porción de 100 g de fruto fresco	22
3	Efectos de los polifenoles dietarios.	25
4	Resumen de los efectos anticancerígenos de la fisetina	36
5	Factores relacionados con cáncer	39
6	Características generales de la línea celular Mcf7	54
7	Características generales de la línea celular Nb2	54
8	Antocianinas en los diferentes extractos de fresa	69
9	Contenido de Fenoles totales y taninos en los diferentes extractos	72
10	Contenido de flavonoides totales de los diferentes extractos.	73
11	Contenido de fisetina en los diferentes extractos de fresa, medidas por HPLC	73
12	Contenido de Flavonoides totales del extracto libre de solvente etanólico	74
13	Contenido de Fisetina del extracto libre de solvente etanólico por HPLC	74

Índice de figuras

N. de figura	Descripción	Pág.
1	Planta de la fresa	15
2	Principales entidades productoras de fresa en la Republica Mexicana.	17
3	Activación del receptor de luz UV en la planta para la activación de la proteína COP1.	20
4	Activación de los genes para la producción de las enzimas PAL y CHS	21
5	Vía del ácido shikimico y de los fenil propanoides	21
6	Clasificación esquemática de los compuestos fenólicos	23
7	Estructura de la Fisetina	28
8	Mecanismos propuestos para la modulación de los polifenoles de la fresa en células normales y cancerosas	31
9	Fisetina y señalización mTOR.	34
10	Objetivos moleculares de la fisetina	35
11	Diferentes etapas en el desarrollo de cáncer	40
12	Proceso invasión-metástasis	41
13	Apoptosis	46
14	Esquema representativo del mecanismo central de apoptosis	49
15	Modelo del diseño experimental	53
16	Método de preparación de los diferentes extractos de fresa	57
17	Contenido de Cianinida-3-Glucosido, Pelargonidina-3-Glucosido y Pelargonidina-3-rutosido en los diferentes extractos	68
18	Contenido de Fenoles totales en los diferentes extractos	70
19	Contenido de Taninos condensados en los diferentes extractos	71
20	Porcentaje de inhibición de los diferentes extractos de fresa por el método de DPPH	75
21	Porcentaje de quelación de los diferentes extractos para el método de FRAP	76
22	Efecto de los extractos de fresa sobre la proliferación celular en dos líneas de cáncer	78

I. Introducción

Los compuestos fenólicos son una serie de metabolitos ampliamente distribuidos en las plantas. Los flavonoides, son una de las subfamilias de los compuestos fenólicos y se localizan principalmente en los frutos como fenólicos simples y antocianinas. Sus múltiples propiedades biológicas, tales como la actividad antioxidante los han convertido en posibles candidatos para explicar la asociación encontrada entre el consumo de determinados productos de origen vegetal y la disminución del riesgo de presentar enfermedades crónico degenerativas (Dirzo, 1985).

La Fresa es un cultivo de gran importancia económica a nivel nacional, la cual posee cantidades relevantes de la antocianina pelargonidina, además de otros compuestos como la fisetina, los cuales no han sido evaluados lo suficiente en el área nutracéutica; de ahí el interés por estudiar a la fresa (Avila-Arce y González-Milán 2008; Giampieri y col. 2014). Sin embargo, al ser un fruto carnoso, se convierte en un producto altamente perecedero una vez que han sido cosechados. Existen varias causas que provocan pérdidas económicas importantes en el periodo post-cosecha de este fruto, destacando un prolongado tiempo de almacenamiento lo cual desencadena aumento en la concentración de etileno y por ende senescencia, la presencia de infecciones debidas a bacterias y hongos, entre otros (Nigro y col, 2000).

Históricamente, estas pérdidas, sobre todo aquellas causadas por patógenos son tratadas en los últimos años con luz ultravioleta en lugar de los fungicidas e insecticidas, pues al mismo tiempo de proporcionar alimentos libres de toxinas e inocuos, ayuda a preservar características atractivas para los consumidores como lo son el aroma y un aspecto visual de fresca. Estos tratamiento tienen bajas repercusiones en el sabor, así como generándole plusvalía al producto debida a la potenciación de compuestos fenólicos en el fruto y facilitando así su comercialización (Carrasco-Ríos 2009; Giampieri y col., 2012; Lozoya-Gloria y Ayala 2012; Pastore y col., 2011)

Cabe mencionar que las fresas, son fuente importante de polifenoles para los seres humanos, los cuales además de ser metabolitos secundarios en las plantas son ampliamente reconocidos por diversos beneficios a la salud. Por ello el campo de estudio enfocado en el uso de elicitores para mejorar el contenido de compuestos fenólicos en las frutas es muy amplio, sin conocer certeramente el cambio en cuanto a la bioactividad o funcionalidad de estos compuestos causado por el elicitador (Ruiz-García y Gómez-Plaza, 2013; Scalbert y col., 2011; Schreckinger y col., 2010)

Los principales elicitores se basan en promover un estrés ambiental afectando la biosíntesis de metabolitos secundarios en las plantas. Se han descrito varios elicitores para promover el incremento así como la acumulación de estos metabolitos en las plantas, dentro de estos agentes de elicitación destaca la luz ultravioleta, la cual no solo disminuye los patógenos del fruto, sino que desencadena cambios en la regulación génica de las plantas de manera prioritaria en procesos tales como el crecimiento, desarrollo, señalización, adaptación al estrés así como senescencia, promoviendo el incremento de compuestos fenólicos a través del aumento tanto de la vía del ácido Shikimico así como de los fenilpropanoides (Cheng y Breen, 1991; Kanazawa y col., 2012; Nigro y col., 2000; Zoratti y col., 2014).

Por su parte, el cáncer es un problema de salud pública, ya que según la Organización Mundial de la Salud (OMS), para las próximas dos décadas, se espera que la incidencia de cáncer en el mundo aumente a 22 millones por año y que el incremento en la mortalidad para el mismo periodo sea de 13 millones anuales (OMS, 2014); En México, desde 1990 los tumores malignos representan la tercera causa de muerte en la población y actualmente la tasa anual promedio de mortalidad por cáncer por los hombre y mujeres es de 75.5 y 89.6 por cada 100 000 habitantes, respectivamente. (Mohar y col. 1997; Torres-Sánchez y col., 2014). Debido a que los tratamientos contra el cáncer tales como las cirugías, quimioterapias, radioterapias, entre otros, generan grandes repercusiones en la salud, así como los altos costos de los tratamientos tradicionales, actualmente se

buscan nuevas alternativas de tratamientos entre los que destaca el uso de compuestos naturales (Teiten y col., 2012), entre ellos los fitoquímicos. La fisetina es una molécula que ha sido postulada como un compuesto antiproliferativo contra varios tipos de cáncer en modelos *in vivo* e *in vitro* (Doré, 2005; Higa y col., 2003; Hou y col., 2001; Maza y col., 2012; Melo y col., 2011; Nagai y col., 2009; Sengupta y col., 2013; Yang y col., 2012), destacando su potencial para disminuir la angiogénesis, y por consiguiente suprimir el crecimiento tumoral a través de la inhibición del plasminógeno activador de uroquinasa (uPA) (Chou y col., 2013). También es un potente inhibidor del activador de la metaloproteinasa de la matriz (MMP-1 activada), enzima clave en la progresión del cáncer (Chien y col., 2010) e inhibe la enzima topoisomerasa II evitando la replicación del ADN dañado en las células de cáncer (Khan y col. 2013).

A pesar de que las fresas son el fruto con mayor contenido de fisetina existen otros alimentos que la contienen sin embargo, actualmente, todos los estudios en los cuales se ha probado el efecto de la fisetina lo han hecho utilizando un reactivo comercial sin tener en cuenta que la certeza de la funcionalidad de un compuesto se evalúa en el contexto de los demás componentes del alimento, ya que esta es la manera en la cual los seres humanos consumen los compuestos fenólicos (Arai y col., 2000; Naghma Khan y col., 2013).

Por lo anterior, resulta importante evaluar el efecto de extractos de fresa con la finalidad de sentar las bases del uso de este fruto como fuente de compuestos con potencial uso en la terapia convencional de esta enfermedad.

II. Antecedentes

2.1 Origen y clasificación botánica de la fresa (*Fragaria x ananassa* Duch)

La fresa pertenece a la familia de las rósaceas, con subfamilia de las rosídeas, insertada en la tribu potentilla, dentro de la cual existen más de 160 especies del género *Fragaria*. Se sabe que la variedad *Fragaria ananassa* resulta del cruce de *Fragaria Chiloensis* (originaria del Ecuador) y *Fragaria virginiana*, cultivada principalmente en Chile (Carmona, 2009).

Esta planta tiene varios nombres comunes según la región, el país o idioma, entre los que se encuentra: frutilla, fragola, morongo, fraise, strawberry y terdbere (Arróniz, 1945). La planta de la fresa (**Figura 1**) se caracteriza por ser perene (de temporada) y tener un tallo principal, el cual es llamado corona, ya que de este surgen los tallos florales así como las hojas y estolones. Su sistema de raíces es de extensión moderada, regularmente no rebasa los 30 cm de profundidad, teniendo así raíces con crecimiento horizontal y vertical. Cada tallo vegetativo soporta una hoja trifoliada, es decir, una hoja compuesta por tres hojas, que a su vez son dentadas, con nervaduras destacadas y un color verde más oscuro en el haz y un verde ligeramente pálido en el envés. Los tallos florales no presentan hojas, en su ápice aparecen las flores, de cinco pétalos blancos, cinco sépalos y numerosos estambres. Los estolones crecen en múltiples direcciones produciendo así nuevas plantas gracias a sus yemas terminales capaces de crear raíces (CONSEJO DE SALUD OCUPACIONAL, 2006). Su tiempo de floración preferencial es a temperaturas cálidas, por ello, los principales meses de producción son en los meses de marzo a julio, teniendo un periodo de cosecha de 2 a 3 semanas (Moyano y col. 2001).



Figura 1. Planta de la fresa. A: Rama con la frutilla; B: rama en floración; 2: corte transversal del fruto; 3: Raíz; 4: fruto o fresa;5: semilla (Arróniz, 1945).

2.2 Importancia económica

2.2.1 Producción mundial

La fresa se adapta a muchos climas sin embargo, es preferente a temperaturas frías, por lo cual la producción en invernadero garantiza un mayor rendimiento de fruto, así como inocuidad del mismo (FAO, 2013). Para el 2013 se obtuvo a nivel mundial una producción anual de 4,178,152 toneladas de fresa. Los principales productores fueron Estados Unidos de Norteamérica, Turquía, España y México. Para el 2015, los 6 principales países productores de fresa a nivel mundial produjeron un total de 2,462,654 de toneladas, lo que representa el 58.94% del total de la producción. El cuadro uno muestra los principales productores de fresa a nivel mundial.

Cuadro 1. Escala de producción a nivel mundial de la fresa (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013).

Lugar	País	Producción 2009 (Toneladas)	Porcentaje a nivel mundial
1	Estados Unidos	1 270 690	30.41%
2	Turquía	291 996	6.99%
3	España	263 700	6.31%
4	México	233 041	5.58%
5	Corea	203 227	4.86%
6	Egipto	200 000	4.79%
7	Otros	1 715 498	41.06%

Como en muchos otros mercados hortícolas, China se está convirtiendo en un actor importante en el mercado mundial de fresa sin embargo, en el 2013 su producción fue de sólo 12,290 toneladas. En países del oriente la demanda interna de fresas frescas está creciendo rápidamente con el aumento de los ingresos urbanos y el cambio de gusto de los consumidores. Las exportaciones chinas de fresas congeladas han aumentado rápidamente. China ha hecho incursiones en mercados de países en vías de desarrollo, en los cuales ha logrado sustituir a los

Estados Unidos como el mayor proveedor de fresas congeladas a Japón (FAO, 2013).

2.2.2 Producción nacional

En México, la producción y exportación de fresa representa un importante pilar económico. Según a los datos del Servicio de Información Agrícola y Pesquera (SIAP) de la SAGARPA, se cultivan a aproximadamente 6,283 hectáreas de las diferentes variedades, con las cuales se logra una producción superior a 226,657 toneladas, con un valor de la producción superior a los 2,102 millones de pesos (CONAFRE, 2012).

Los principales estados productores de fresa en nuestro país en 2010 fueron Baja California, Guanajuato, Jalisco, Estado de México y Michoacán (Figura 2). En esta última entidad se concentra la mayor producción nacional sin embargo, Guanajuato aporta el 7% de la producción total del país, colocándose así como el tercer estado de mayor producción a nivel nacional. Otros estados productores de fresa con los cuales se obtiene poco menos del tres por ciento de la producción nacional son Baja California Sur, Coahuila, Durango Morelos, Sinaloa, Veracruz y Zacatecas (CONAFRE, 2012).



Figura 2. Principales entidades productoras de fresa en la Republica Mexicana. 1) Michoacan, 2) Baja california Norte, 3) Guanajuato, 4) Edo. De México, 5) Jalisco (CONAFRE :Consejo Nacional de La Fresa, 2012)

El consumo de la fresa en México responde al nivel de su precio, es decir, es un producto que tiene las características de ser vendible según el precio en venta para el consumidor, ya que en la medida de que aumenta la oferta disminuye el precio. Este comportamiento se observa en estratos de la población de ingresos medios hacia bajo, ya que su demanda se incrementa cuando bajan los precios. En el caso contrario, al aumentar su precio, disminuye el consumo de esta fruta, sustituyéndose por frutas de temporada. En 1999 se exportaron 31,145.67 toneladas de fresa y su comportamiento a través de los años ha tenido una notable tendencia al aumento en volumen, de tal forma que en el 2010 se exportaron 155,948.65 toneladas. La mayor parte de fresa se destina a la producción de mermeladas o jaleas y el resto de la producción se comercializa como fruto fresco, el cual puede ser consumido fresco o usado en perfumes, cosméticos, entre otros artículos (Servicio de Información agroalimentaria y pesquera México, 2013).

2.3 Uso de la luz Ultravioleta en fresa

Hoy en día se sabe que la composición nutricional de frutas varía considerablemente como consecuencia de los diferentes manejos antes de cosecharlas así como factores post-cosecha. Por estas razones, los programas de mejoramiento biotecnológicos tienen centrado su atención en mejorar aspectos como la productividad, la forma, la firmeza de la fruta, así como su sabor, aroma y, si es el caso, incremento en compuestos fenólicos para asegurar un valor agregado para los consumidores (Giampieri, Alvarez-suarez y col. 2012).

Un ejemplo de estas herramientas biotecnológicas es el uso de luz ultravioleta (UV), la cual era utilizada en un principio por su gran efectividad para erradicar la contaminación por el moho gris producido por *Rhizopus stolonifer* (principal contaminación post-cosecha en las fresas) (Nigro y col., 2000). En estudios recientes se ha observado que la luz UV influye de manera directa en la enzima PAL (fenil alanina amonino liasa), responsable de transformar a L-fenilalanina en ácido cinámico, el cual es el primer precursor de la vía del ácido shikimico

(metabolismo secundario de la planta), así como de la enzima PAL (Fenilalanina aminoliasa) y CHS (Chalcona sintetasa) enzima clave de la vía de los fenilpropanoides (Cheng y Breen 1991).

Se estima que el nivel de irradiación de luz UV mundial dada por el sol se encuentra entre 40 y 900 mol/ m²s¹, considerando los cambios durante el día y a lo largo del año, y ésta influye en procesos de fototropismo en la planta (Lawton y col., 1991). Si bien es sabido que la acción de la luz UV actúa de manera diferente según el alimento, se han hecho varios estudios en diferentes frutos. Así se ha descrito que las uvas aumentan el contenido de estilbenos y resveratrol (Cantos, Espin, Fernandez, Oliva, y A., 2003), en manzanas aumenta el contenido de trans-resveratrol (Sautter, Storck, Rizzatti, Mallmann, y Brackmann, 2008); aumento de fenoles volátiles y no volátiles en los arándanos (Eichholz y col., 2011). En la fresa se ha visto un aumento de la capacidad antioxidante debido a un incremento generalizado de los metabolitos secundarios (Kanazawa y col., 2012).

En este sentido el principal mecanismo estudiado es el incremento en los precursores de la enzima PAL y CHS. Todas las plantas poseen foto receptores también llamados “fitocromos”, los cuales se componen de una proteína soluble con dos subunidades equivalentes y un peso molecular de 250 kDa. Cada subunidad tiene dos componentes: una molécula de pigmentos que absorben la luz, llamada cromóforo; y una cadena peptídica llamada apoproteína (la cual es una proteína de tipo G). Los fitocromos (los cuales tienen una conversión de inactiva “pr” a activa “prf” por la unión del amino terminal a un fotón dando le actividad quinasica al carboxilo terminal) se subdividen en criptocromos y fototropinas (diferenciándose en su dominio). Éstos son capaces de captar la luz azul en un rango de 600 a 750 nm, se producen en los plástidos de la planta y están distribuidos por todo el citosol, cloroplastos, vacuolas, núcleo de las células así como en la raíz, tallo y tejidos aéreos de las plantas (Eichholz y col. 2011).

El primer paso es la captación de un fotón de luz UV por un cromóforo presente en la membrana de la planta (en sus diferentes partes), después este cambia de

forma, liberando la sub unidad alfa de la proteína la cual activa a COP1 (complejo proteico de la cubierta), la cual es un tetrámero que se encuentra en la cara cis del aparato de Golgi en la célula vegetal (Figura 3). Ahí atrapa a las proteínas Cry 1 (proteína del criptocromo 1, encargada de regular ciclos circadianos en las plantas) y 2 (proteína del criptocromo 2, encargada de detener los procesos de fotoprotección), las cuales serán ubiquitinadas y posteriormente destruidas. Lo anterior permite que la proteína HY5 (factor transcripcional de la proteína larga del hipocotíleo), la cual funge un papel principal en la transducción de señales, al entrar al núcleo y activar la transcripción para los genes de PAL2 y CHS (Figura 4). Esto promoverá en la planta el incremento de estas dos enzimas, promoviendo tanto la ruta del ácido shikímico como la ruta de los fenilpropanoides (Figura 5) (Pastore y col. 2011).

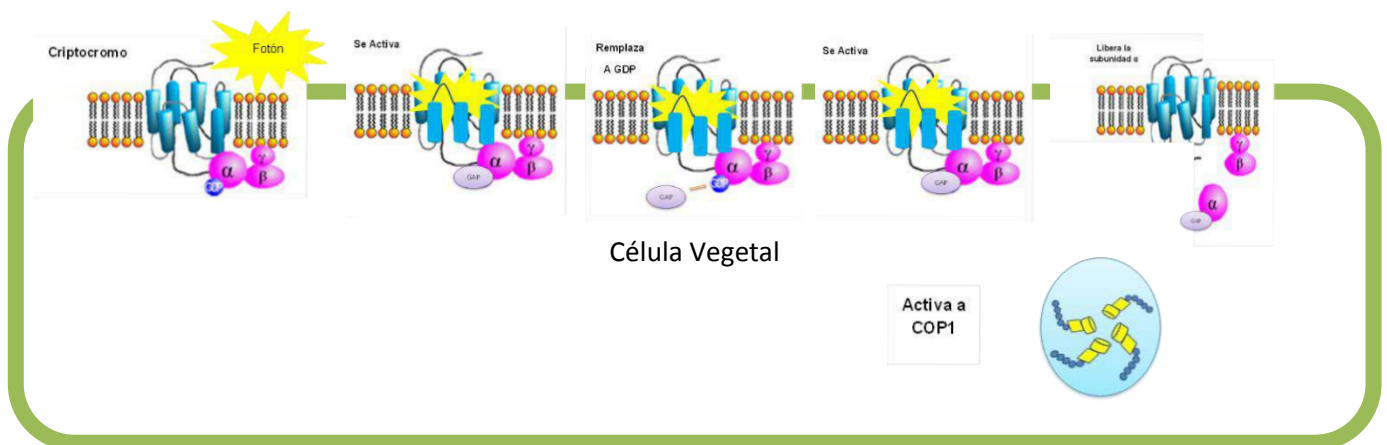


Figura 3. Activación del receptor de luz UV en la planta para la activación de la proteína COP1 (Pastore y col. 2011).

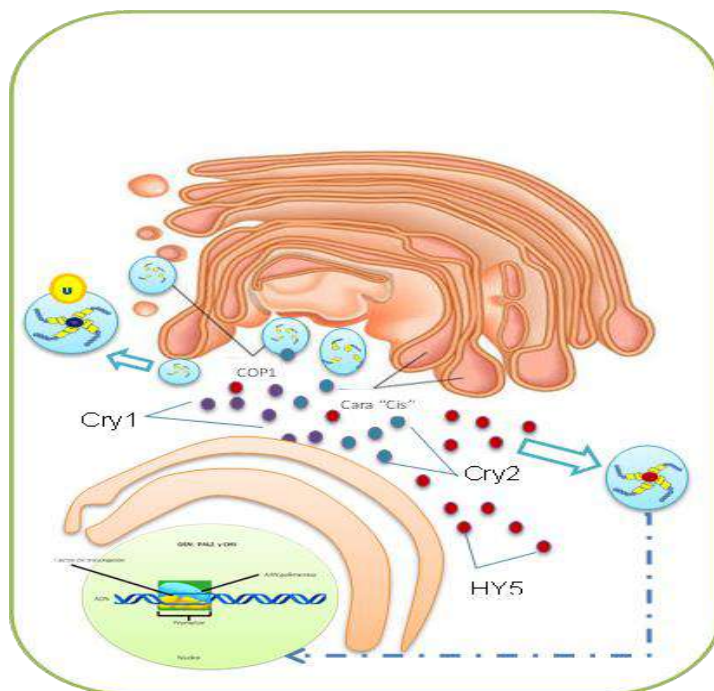


Figura 4. Activación de los genes para la producción de las enzimas PAL y CHS por HY5 (Pluemsamran y col. 2012).

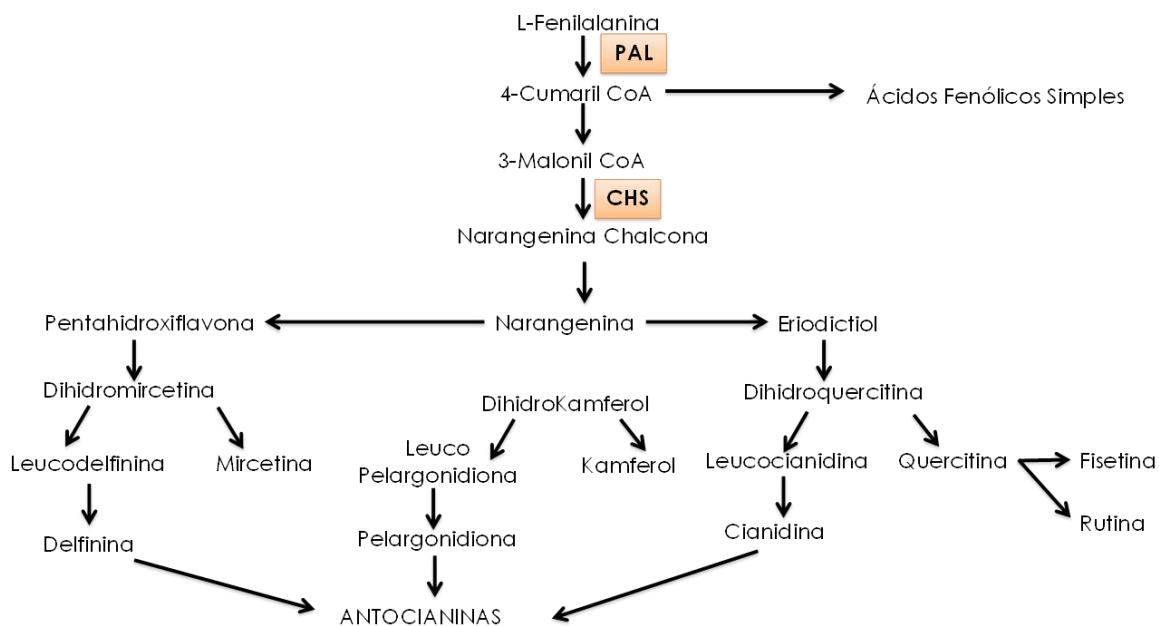


Figura 5. Vía del ácido shikimico y de los fenil propanoides (Nigro y col., 2000).

2.4 Importancia nutricional, funcional y nutracéutica de la fresa

2.4.1 Composición nutricional de la fresa

De acuerdo con el cuadro dos, la fresa es considerada como un alimento nutracéutico debido a su composición, ya que aporta cantidades significativas de fibra, ácidos grasos esenciales, principalmente ácidos grasos insaturados. Además de un alto contenido en vitamina C y micronutrientes esenciales, así como compuestos orgánicos benéficos para la salud como lo son los flavonoides, taninos, ácidos orgánicos, ácidos fenólicos, entre otros (Giampieri, Tulipani, y col., 2012).

Cuadro 2. Composición nutricional de la fresa en porción de 100 g de fruto fresco (Giampieri, Tulipani, y col., 2012).

Nutriente	Cantidad por 100g	Nutriente	Cantidad por 100g
Agua (g)	90.95	Manganeso (mg)	0.386
Energía (Kcal)	32	Selenio (µg)	0.4
Proteína (g)	0.67	Vitamina C (mg)	58.8
Ceniza (g)	0.40	Tiamina (mg)	0.024
Lípidos totales (g)	0.30	Rivoflavina (mg)	0.022
Carbohidratos (g)	7.68	Niacina (mg)	0.386
Fibra (g)	2.0	Ácido pantoténico (mg)	0.125
Azúcar (g)	4.89	Piridoxina (mg)	0.047
Sacarosa (g)	0.47	Folato (µg)	24
Glucosa (g)	1.99	Colina (mg)	5.7
Fructosa (g)	2.44	Betanina (mg)	0.2
Calcio (mg)	16	Vitamina B12 (µg)	0.2
Hierro (mg)	0.41	Vitamina A (µg)	1
Magnesio (mg)	13	Luteína (µg)	26
Fosforo (mg)	24	Vitamina E (mg)	0.29
Potasio (mg)	153	β-tocoferol (mg)	0.01
Sodio (mg)	1	α-tocoferol (mg)	0.08
Zinc (mg)	0.14	Δ- tocoferol (mg)	0.01
Cobre (mg)	0.048	Vitamina K (mg)	2.2

2.4.2 Compuestos fenólicos de la fresa

Los compuestos fenólicos son sustancias con uno o más anillos aromáticos y, al menos, un sustituyente hidroxilo. Existen dos grandes grupos: polifenoles (los cuales solo tienen un anillo y se subdividen en los ácidos fenólicos y cumárico) y ácidos fenólicos (tienen dos anillos fenólicos, unidos por un anillo heterocíclico; los cuales incluyen a los flavonoides y taninos) (Figura 6). Estos compuestos se caracterizan por reaccionar fácilmente con un ácido orgánico o un azúcar para formar polímeros (Badui Dergal, 2006).

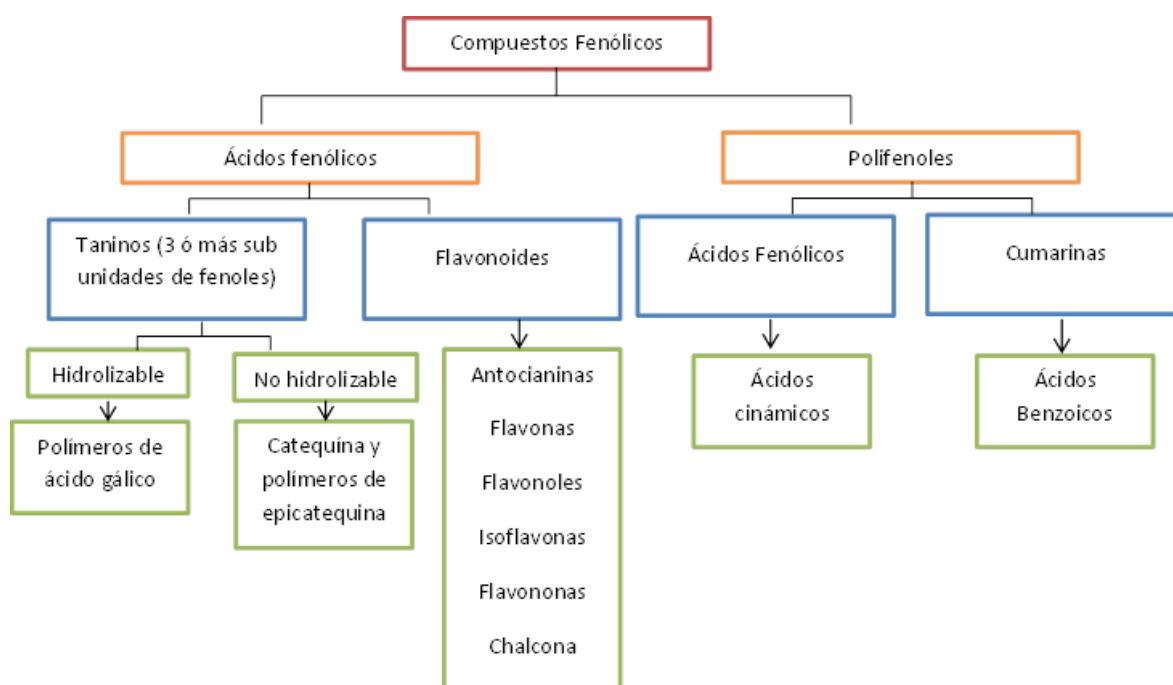


Figura 6 Clasificación esquemática de los compuestos fenólicos(Badui Dergal, 2006).

En el caso particular de la fresa, se han encontrado una extensa variedad de compuestos fenólicos, a los cuales se les han atribuido un gran número de funciones en la salud (Dominí, 2012).

2.4.2.1 Fenoles

Los fenoles o compuestos fenólicos son compuestos orgánicos en cuyas estructuras moleculares contienen al menos un grupo fenol. Muchos son clasificados como metabolitos secundarios de las plantas, aquellos productos biosintetizados en las plantas que poseen la característica biológica de ser productos secundarios de su metabolismo. En general son sintetizados por una de dos vías biosintéticas: la ruta del ácido shikímico o la vía del ácido malónico (o por las dos, por ejemplo los flavonoides). Algunos son solubles en solventes orgánicos, otros son glucósidos o ácidos carboxílicos y por lo tanto solubles en agua, y otros son polímeros muy grandes e insolubles (Tomás-Barberán, 2003).

Entre sus efectos bioactivos se encuentra el efecto angiogénico ya que aumentan la NO sintasa endotelial (eNOS), mientras que regulan a la baja la NO sintasa inducible (iNOS) en diferentes estructuras. Al mismo tiempo que inhiben fuertemente la síntesis de la endotelina-1, péptido vasoactivo, el cual es crucial en el desarrollo de la aterosclerosis coronaria así como la atenuación de la liberación de citoquinas, tales como interleucina 1-beta (IL-1beta) y factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-alfa) (Letenneur, Proust-Lima, Le Gouge, Dartigues, y Barberger-Gateau, 2007; Tomás-Barberán, 2003). En el cuadro tres se muestran algunos beneficios a la salud de compuestos fenólicos.

a) Antocianinas

Las antocianinas son los compuestos fenólicos solubles en agua responsables de la pigmentación roja, azul y púrpura principalmente, por lo que se sabe que las concentraciones en muestra fresca pueden ir desde 150 hasta 600 mg/Kg y valores superiores a 800 mg/Kg de muestra seca (Lopes da Silva y col., 2002). Se han descrito más de 25 diferentes antocianinas para este fruto sin embargo, se sabe que la pelargonidina-3-glucósido es la de mayor concentración, independientemente de la variedad y las condiciones del cultivo, seguidas de la

cianidina-3-glucósido y la pelargonidina-3-rutósido (Giampieri, Tulipani, y col. 2012).

Se ha observado que las antocianinas ejercen un efecto antioxidante pues participan en la regulación de la expresión así como actividad del súper óxido dismutasa (SOD), principal agonista del sistema glutatión reductasa. Además posiblemente actúan en la disminución en la oxidación lipídica de las membranas celulares (Chen y Luo 2010).

Cuadro. 3 Efectos biológicos de polifenoles dietarios.

Patología	Modelo	Efecto	Referencia
Daño con luz UV	In vivo	Disminución de la concentración intracelular de ROS	(Rhodes y col., 2013; Yin y col., 2014)
		Incremento de la actividad de enzimas antioxidantes	(Rhodes y col., 2013; Yin y col., 2014)
	In vitro	Aumento de la viabilidad celular	(Giampieri, Alvarez-suarez, y col., 2012)
		Reducción del daño de ADN	(Giampieri, Alvarez-suarez, y col., 2012)
		Disminución de la concentración de ROS intracelular	(Pluemsamran y col., 2012; Yin y col., 2014)
		Incremento de la actividad de enzimas antioxidantes	(Pluemsamran y col., 2012; Yin y col., 2014)
		Disminución de proteínas inflamatorias relacionadas con TNF- α	(Pastore y col., 2011, 2012)
		Disminución de úlceras	(Alvarez-Suarez y col., 2011)
Patologías gástricas	In vivo	Disminución de la peroxidación lipídica en el estomago	(Benedetti y col., 2012; Giampieri, Alvarez-suarez, y col., 2012; Kim, Park, Paik, y Chang, 2011)
		Aumento de las defensas antioxidantes	(Benedetti y col., 2012; Giampieri, Alvarez-suarez, y col., 2012; Kim y col., 2011)
		Reducción de la supresión de la actividad de MMP-2	(Kim y col., 2011)
		Inhibición de la fosforilización de la actividad mitogénica de proteínas cinasas	(Duan y col., 2012)
	in vitro	Reducción de la supresión de la actividad de MMP-2	(Kim y col., 2011)
		Disminución de la peroxidación lipídica en el estomago	(G. Chen y Luo, 2010; Kim y col., 2011), Kim y col., 2011)
		Aumento de las defensas antioxidantes	(Stoner, Wang, y Casto, 2008)
		Inhibición de la fosforilización de la actividad mitogénica	(Guevara, 2010)
Cáncer	In vitro	Metilación de genes relacionados con la supresión de cáncer	(Atalay y col., 2003; Link y col., 2013; Wang y col., 2013)
		Promoción de arresto de ciclo celular y apoptosis	(Maher y col., 2011; Wang y col., 2013; Yang, y col., 2012)
		Modulación de oncogenes	(Atalay y col., 2003)

Un estudio *in vitro* sobre células de cáncer de próstata reveló que los extractos de té ricos en polifenoles en diferentes concentraciones (0.4, 0.8, 1,2, 1.6, o 20 mg/mL) inhibió la proliferación celular, indujo la apoptosis y modificó el potencial de membrana mitocondrial promoviendo un menor gasto de ATP (Suzuki y col., 2007).

b) Catequina

Este compuesto es el mayoritario flavonol o flavan-3-ol de las fresas, el cual se refiere a un subgrupo de los flavonoides que también pueden actuar como proantocianidinas. Son los pigmentos principales de muchas semillas, y también están presentes en los tejidos vegetativos de algunas plantas forrajeras (Lozola-Gloria y Ayala, 2012). Las proantocianidinas han demostrado tener una gran capacidad antioxidante eliminando los radicales hidroxilo y peroxilo e inhibiendo la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). El grado de potencia de la acción antioxidante está relacionado con el grado de polimerización de las moléculas (Guevara, 2010).

c) Flavonoides

Los flavonoides son sustancias de bajo peso molecular producidas por casi todas las plantas vasculares. Confieren resistencia contra la fotooxidación de la luz UV del sol, intervienen en el transporte de hormonas y algunos funcionan como defensa ante los depredadores (Mähler y col., 2013). Su estructura se basa en un esqueleto de un sistema C6-C3-C6 (anillos A, C y B) o, más específicamente, con una funcionalidad fenilbenzopirano, benzo-γ-pirona o cromano consistente en un anillo fenólico y un anillo pirano y son clasificados de acuerdo a su sustitución. Los flavonoides se dividen inicialmente en tres clases dependiendo del sitio de unión del anillo B con el benzopirano (A): los flavonoides 1 (2-fenilbenzopiranos), isoflavonoides 2 (3-benzopiranos) y los neoflavonoides 3 (4-benzopiranos).

Los isoflavonoides (3-benzopiranos 2) son una clase distintiva de flavonoides, estos compuestos poseen un esqueleto 3-fenilcromano que es derivado

biogénicamente de una migración 1,2-aril del precursor 2-fenilcromano. A pesar de su limitada distribución en el reino vegetal, los isoflavonoides son notablemente diversos en cuanto a sus variaciones estructurales, no sólo en el número y complejidad de los sustituyentes sobre el sistema básico, también en los diferentes niveles de oxidación y en la presencia de un heterociclo adicional. Es así que los isoflavonoides se dividen en los siguientes grupos: a) Los neoflavonoides (4-benzopiranos 3) que están estructural y biogénicamente relacionados con los flavonoides, y b) los isoflavonoides, conformados por las 4-arilcoumarinas (4-aril-2H-1-benzopiran-2-onas), las 3,4-dihidro-4-arilcoumarinas y el neoflavano (Estrada-reyes, Ubaldo-suárez, y Araujo-escalona, 2012). Una de las principales funciones de los flavonoides es asociada a su capacidad antioxidante al regular la homeostasis GSH/GSSG el cual se ve alterado durante procesos de cáncer (Denzoin Vulcano, Soraci, y Tapia, 2013; Estrada-reyes y col., 2012)

Además se sabe que algunos flavonoides pueden interactuar de manera selectiva con algunas proteínas cinasas, vía involucrada en la cascada de MAPK, PI3K/AKT) cuyas vías de activación están desreguladas en el cáncer (Adhami, Syed, Khan, y Mukhtar, 2012).

2.4.2.2 Fisetina

La 3,3',4',7- tetrahidroxyflavona (fisetina) (Figura 7), es un flavonoide sin la sustitución en el hidróxido 5, la cual se encuentra en diferentes frutos (cáscara del pepino, cebolla, kiwi, y chabacano), pero sus mayores concentraciones se encuentran en la fresa (160µg/g) (Maher, 2009).

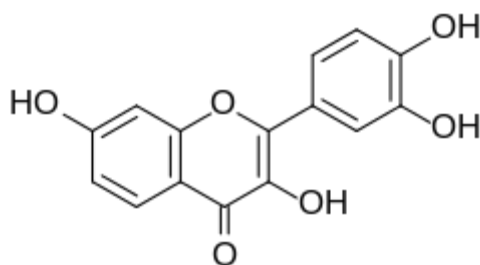


Figura 7. Estructura de la fisetina(Maher, 2009)

Son varios los estudios que reportan beneficios a la salud tanto en modelos *in vitro* como en modelos *in vivo*, entre los que se pueden mencionar sus efectos cardioprotectores, antiinflamatorias, anticancerígenos, quimiopreventivo, agente quimioterapéutico en varios tipos de cáncer (González-Gallego, Sánchez-Campos, y Tuñón, 2007; Higa y col., 2003; Kovacsova, Barta, Parohova, Vrankova, y Pechanova, 2010; W. R. Lee y col., 2002; Suh, Afaq, Johnson, y Mukhtar, 2009; Yang y col., 2012).

La capacidad de los flavonoides para eliminar los radicales libres contribuye a su actividad antioxidante marcada y significativa biológica efectos. Los radicales de oxígeno dañan lípidos, amino ácidos, carbohidratos y ácidos nucleicos, por ello, se ha implicado en el desarrollo de muchas enfermedades, incluyendo la diabetes mellitus, degeneración de la retina, enfermedades neurodegenerativas, mutagénesis, carcinogénesis así como en el envejecimiento (Spencer, 2008).

Se ha reportado que, por si sola, la capacidad antioxidante de la fisetina presente en la fresa está en un rango de 2.8 μM equivalente de trolox, y debido a sus OH, se puede unir fuertemente entre la cabeza polar y la cola hidrófoba de los fosfolípidos alrededor de la región interfacial de la fosfatidilcolina en los lisosomas, inhibiendo la lipooxidación de los lípidos (Bidisa Sengupta, Banerjee, y Sengupta, 2004). Además, en modelos *in vitro* se ha visto que disminuye la producción de LDL en hepatocitos, la cual es dependiente al tiempo y a la dosis, pero el hallazgo principal fue la disminución en la producción de CD36 en los macrófagos, la cual tiene en papel crucial en el desarrollo de la arterosclerosis (Hou y col., 2001).

La fisetina tiene un potencial de oxidación muy bajo en comparación con los demás flavonoides, por lo que se cree que la estructura o-dihidroxi en el anillo B y el grupo 3-hidroxi y doble enlace 2-3 en el anillo C, contribuyen a la actividad antioxidante. Se sugiere que su posible mecanismo de acción es principalmente por dos vías, 1) la de ERK $\frac{1}{2}$ la cual media SIN-1, la fosforilación de c-myc y los niveles de Nrf2, así como GSH y la viabilidad celular (Joseph, Schubert, y Maher, 2009). 2) La segunda vía está relacionada con la inhibición de PKC-d y MAPK (oncogén p38) por la inducción del OH-1 de la fisetina, la cual disminuye los ARN de interferencia y aumenta la producción de Nrf2 (Ehren y Maher, 2013; S. E. Lee y col., 2011)Ehren y Maher, 2013).

En este sentido se ha probado que la luz proveniente de la irradiación puede inducir el estrés en la planta de la fresa para iniciar la sintetizar de flavonoides para prevenir stress oxidativo, por lo cual se ve incrementado de manera principal a la familia de los flavonoides, entre los cuales se encuentra la fisetina, ya que estos se encargan de disminuir este daño en la planta de la fresa así como regular procesos de fototropismo(Kanazawa y col., 2012).

2.5 Fresa como alimento funcional

La fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) posee una composición nutricional notable en términos de micronutrientes como minerales, carotenoides vitamina C, vitamina E y folatos. También contiene como elementos no nutritivos tales como compuestos fenólicos (antocianinas, fisetina, derivados del ácido gálico, quercetina, taninos entre otros), que son esenciales para la salud humana, catalogando así a este fruto como nutraceutico (Fortalezas y col., 2010). Aunque los fenólicos de la fresa son conocidos principalmente por sus acciones antiinflamatorias y antioxidantes, estudios recientes han demostrado que sus actividades biológicas también se extendieron a otras vías implicadas en el metabolismo y la sobrevivencia celular (Giampieri y col., 2014).

El tratamiento de fibroblastos dérmicos humanos expuestos a los rayos UVA (los cuales provocan daño oxidativo mediante la generación de especies reactivas de oxígeno), con 0.5 mg/mL de extracto metanólico acidificado con ácido fórmico al 1% de fresa durante 24 h generó fotoprotección, aumentando la viabilidad celular y disminuyendo el daño al ADN además del disminuir notablemente marcadores de inflamación (Basu, Nguyen, Betts, y Lyons, 2014; Giampieri, Alvarez-suarez, y col., 2012; Stoner y col., 2008). De acuerdo con estos resultados, la potencia de polifenoles para proteger la piel contra los agentes nocivos podría estar relacionada con su capacidad de transducción de señales de alteración y la regulación epigenética. Por ejemplo, algunos polifenoles como la quercetina y el resveratrol han mostrado una actividad antiinflamatoria asociado con el control de la señal de transducción, con la reducción de la expresión de proteínas pro-inflamatorias (es decir, COX-2), inducible por factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), y la sintasa de óxido nítrico (Wang y col., 2013).

Otro papel importante descubierto en años recientes es que los polifenoles sintéticos pueden aumentar la transcripción del gen del factor nuclear Nrf2, un factor de transcripción que se une a la elemento de respuesta antioxidante y regula enzimas que participan en las funciones antioxidantes o de detoxificación (Na y Surh, 2008). Otro mecanismo importante que debe tenerse en cuenta, además de la capacidad antioxidante, es el efecto que polifenoles ejercen indirectamente sobre la actividad de los PPAR a través de la activación de Nrf2 (Cho y col., 2010). En los últimos años, la capacidad antioxidante de los polifenoles se ha tenido en cuenta como uno de los mecanismos de acción en la inhibición de la mutagénesis y la iniciación del cáncer. Lo anterior debido a su capacidad para atrapar e inhibir los radicales libres, activar enzimas antioxidantes que previenen carcinogénesis o la formación de aductos de ADN, mejorar la reparación del ADN, así como la modulación de cambios epigenéticos y reducción de daños oxidativos del ADN (Figura 8) (Link y col., 2013). Se ha encontrado que la fisetina tiene una alta afinidad a los receptores de los ERK por lo que podría presentar potencial anti proliferativo en varias líneas tumorales (Soobrattee, Neergheen, Luximon-Ramma, Aruoma, y Baborun, 2005).

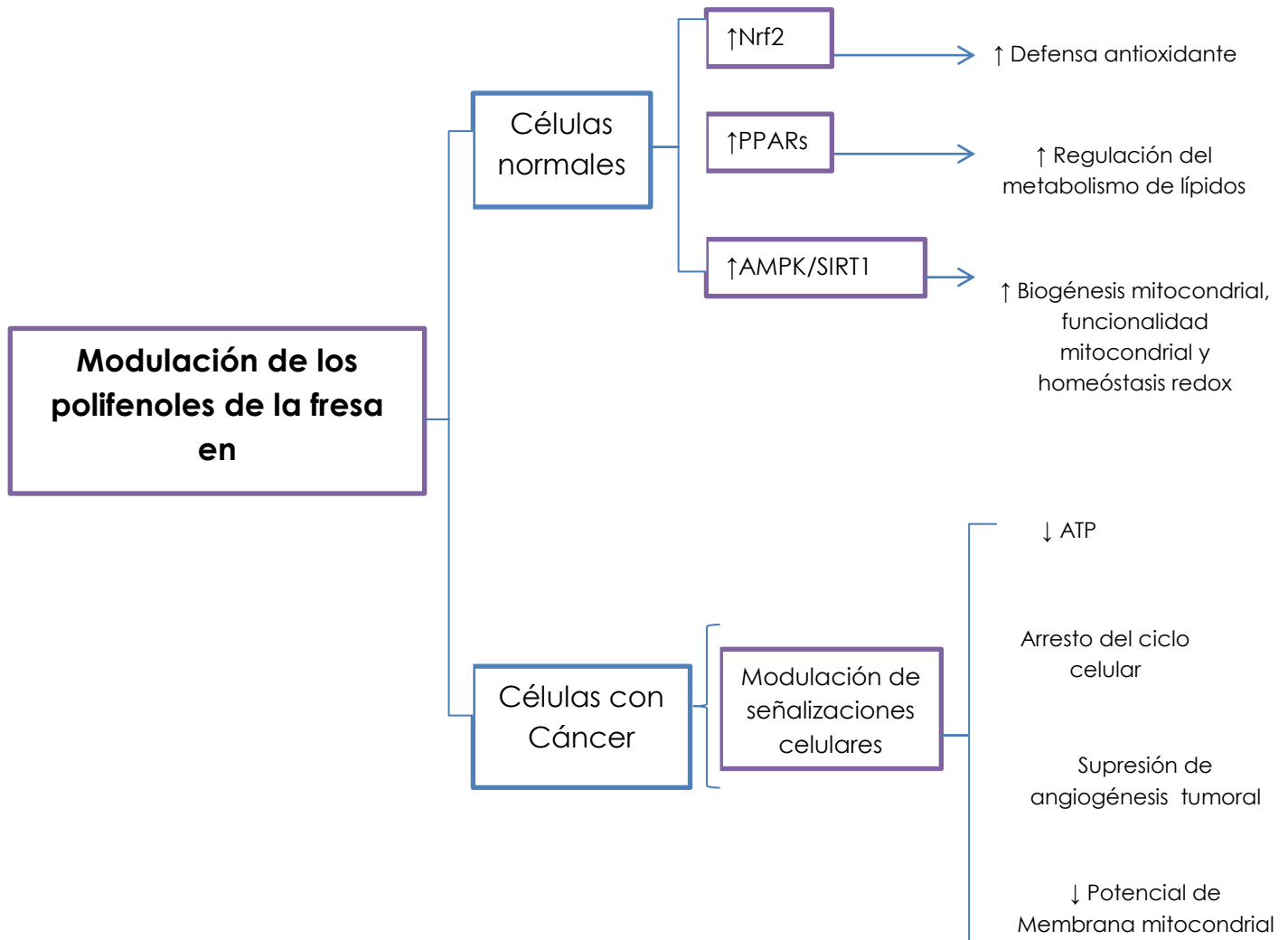


Figura 8. Mecanismos propuestos para la modulación de los polifenoles de la fresa en células normales y cancerosas. (Nrf2: factor nuclear 2 derivado de eritroide 2; PPARs: receptores activados por el proliferador de peroxisomas; AMPK: proteína cinasa activada por 5'- adenosin monofosfato; SIRT1: sirtuína-1 deacetilasa dependiente de NAD; ROS: especies reactivas de oxígeno; ATP: adenosintrifosfato) (Giampieri y col., 2014).

A pesar de que la capacidad antioxidante tiene una función crucial en el desarrollo del cáncer, varias investigaciones han apoyado la función de los fenólicos como moduladores de los procesos celulares relacionados con el crecimiento del cáncer. La evidencia *in vitro* e *in vivo* indica que los compuestos fenólicos pueden modular la señalización celular y la inhibición de la proliferación de células cancerígenas a través de la desmetilación de genes supresores de tumores, detienen el ciclo

celular, promueven apoptosis y suprimen la angiogénesis tumoral (Atalay y col., 2003; Wang y col., 2013).

Recientemente se informó que diferentes concentraciones de fresa (correspondiente a 2.5 g de antocianinas/mL), aplicadas en una línea celular de cáncer de mama murino que expresa altos niveles de receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER-2) (considerado como un interesante objetivo terapéutico), provocaron mayores niveles de apoptosis (Somasagara y col., 2012; Suzuki y col., 2007). Otro estudio mostró reducción de la metástasis y propagación en pulmón en los animales alimentados con fresas en comparación con el grupo control (Jingxia Li, Zhang, Stoner, y Huang, 2013).

2.6 La fisetina como agente anticancerígeno

Varios estudios *in vitro* e *in vivo* indican que la fisetina posee propiedades antiproliferativas contra varios tipos de cáncer (Bhat, Nambiar, Pal, Agarwal, y Singh, 2012; Chou y col., 2013; N. Khan, Afaq, Syed, y Mukhtar, 2008; Lu y col., 2005). Su valor potencial en la prevención del cáncer se debe a que puede reducir la angiogénesis y, por consiguiente, suprimir el crecimiento tumoral mediante la inhibición de activador de plasminógeno uroquinasa (uPA) (Chou y col., 2013). Conjuntamente se han reportado los efectos de la aplicación de fisetina en varios modelos celulares, en los que se incluyen actividades de neuroprotección y potencial antioxidante (Hanneken, Lin, Johnson, y Maher, 2006), anti-inflamatorias (Higa y col., 2003), antimetastásica (Chou y col., 2013) y con efectos antimitogénicos y anti-angiogénicos (Bhat y col., 2012).

Entre los mecanismos de acción de la fisetina está la activación de p53 e inhibición de las vías de NF-Kappa B (Jing Li y col., 2011), activación de caspasa 3 (W. R. Lee y col., 2002) y promoción de la autofagia en células deficientes de caspasa 3 evitando la fragmentación de ADN (Yang y col., 2012). También se encontró que la fisetina es un potente inhibidor de la metaloproteinasa de la matriz MMP-1, una enzima clave en la remodelación y la degradación de la matriz

extracelular, con un papel importante en la progresión del cáncer (Adhami y col., 2012). Su modo de acción está basado en comprometer rápidamente microtúbulos durante el proceso mitótico de una manera dependiente del proteasoma en varias líneas celulares humanas, causando una iniciación prematura de la segregación cromosómica y la salida de mitosis sin citocinesis normal en células cancerosas humanas (Salmela y col., 2009). Las consecuencias del tratamiento fisetina sobre la localización y la fosforilación de varias proteínas mitóticas fueron analizados en un estudio de cultivo celular. Se encontró que Aurora B, Bub1, BubR1, y CENP-F perdieron rápidamente la localización de su cinetocoro/centrómero tras la adición de fisetina al medio de cultivo. Además, Aurora B quinasa se identificó como un blanco directo de la fisetina y su actividad se redujo significativamente (Pal, Sharma, Elmets, Athar, y Afaq, 2013).

Otros estudios muestran que la fisetina es un inhibidor eficaz de la enzima nuclear humana topoisomerasa II-a, esencial para la replicación del ADN, e interfiere con la segregación de cromosomas durante la anafase y telofase (Sengupta y col., 2013). Lo anterior sugiere que la fisetina actúa tanto como aneugen (afectando la división celular y el aparato del huso mitótico, lo que resulta en la pérdida o ganancia de cromosomas enteros, induciendo de ese modo aneuploidía) y un clastógeno (causando rupturas en los cromosomas) (López-Lázaro, Willmore, y Austin, 2010). En dosis bajas, la fisetina fue capaz de interferir con la segregación cromosómica correcta y actuó como un aneugen, mientras que a concentraciones más altas, inhibió de manera eficaz a la topoisomerasa, II ejerciendo efectos clastogénicos que causan grietas de doble cadena de ADN en las células (Olaharski, Mondrala, y Eastmond, 2005). En mastocitos HMC-1, la fisetina inhibió la actividad del factor nuclear kappa B- (NF-kB) y MAPK, lo que muestra su potencial como agente antiinflamatorio (Nagai y col., 2009).

Uno de los mecanismo más estudiados de la acción de la fisetina en la modulación del cáncer es la vía de AMPK/AKT/mTOR (Adhami y col., 2012), la cual involucra intermediarios como Ras, Raf, MAPK/ERK cinasa (MEK) y la activación de una cinasa específica que activa la fosforilación de los residuos de tirosina y treonina

(Maher y col., 2011). La premisa principal es que la fisetina se une a dos sitios en la molécula de mTOR, generando energías de unión con valores de -7 a - 8 kcal/mol. El sitio de unión incluye enlaces de hidrógeno a un glutamato por dos grupos OH (Figura 9) (Deeba, Vaqar, Mohammad, y Hasan, 2013). Estudios en cultivos celulares mostraron que el tratamiento con fisetina es capaz de unirse en su dominio de la serina, treonina quinasa evitando la fosforilación para AKT y PI3K, generando de esta forma disminuir la activación de varios productos río debajo para esta vía, destacando a la proteína 4E-BP1 (proteína de traducción eucariótica del factor de iniciación 4E) así como mTOR. Las células tratadas con fisetina mostraron inhibición del complejo de señalización mTOR tales como Rictor, Raptor, GBL y PRAS40, lo que sugiere efectos inhibitorios en el crecimiento celular (Deeba y col., 2013; Yang y col., 2012).

Las posibles dianas moleculares para explicar las acciones de la fisetina se muestran en la figura 10, así como un resumen de los efectos anticancerígenos encontrados para la fisetina en varios modelos *in vitro* e *in vivo* (Cuadro 4).

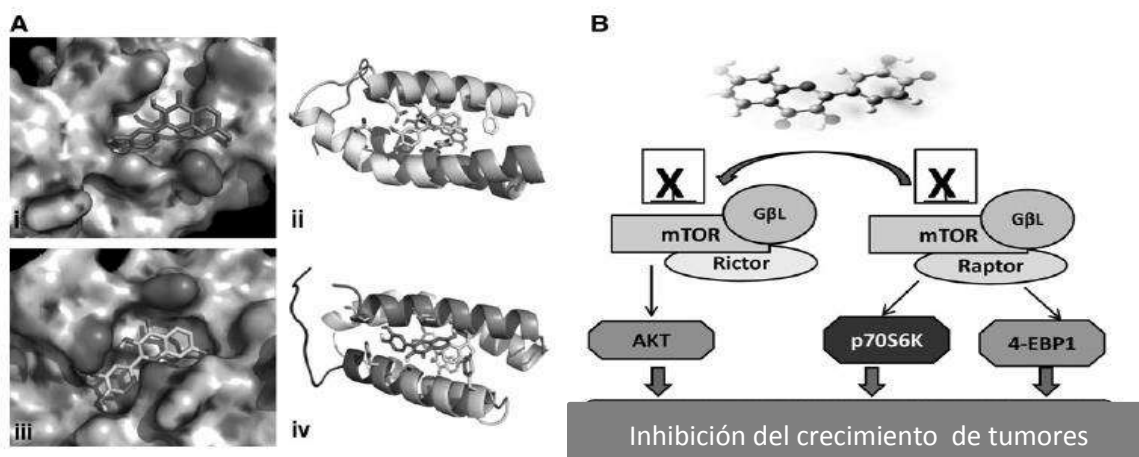


Figura 9. Fisetina y señalización mTOR. (A) Modelo hipotético de la meta de la rapamicina en mamíferos (mTOR) molécula en complejo con fisetina. (i, iii) acoplamiento de fisetina a la diana mTOR. Las energías de unión estaban en el -7 a - 8 kcal gamma/mol para la constante de unión. (ii, iv) La unión en el sitio incluye enlaces de hidrógeno a un glutamato por dos grupos hidroxilo. (B) Mecanismo propuesto a través del cual se dirige fisetina de señalización mTOR en las células cancerosas (Naghma Khan y col., 2012).

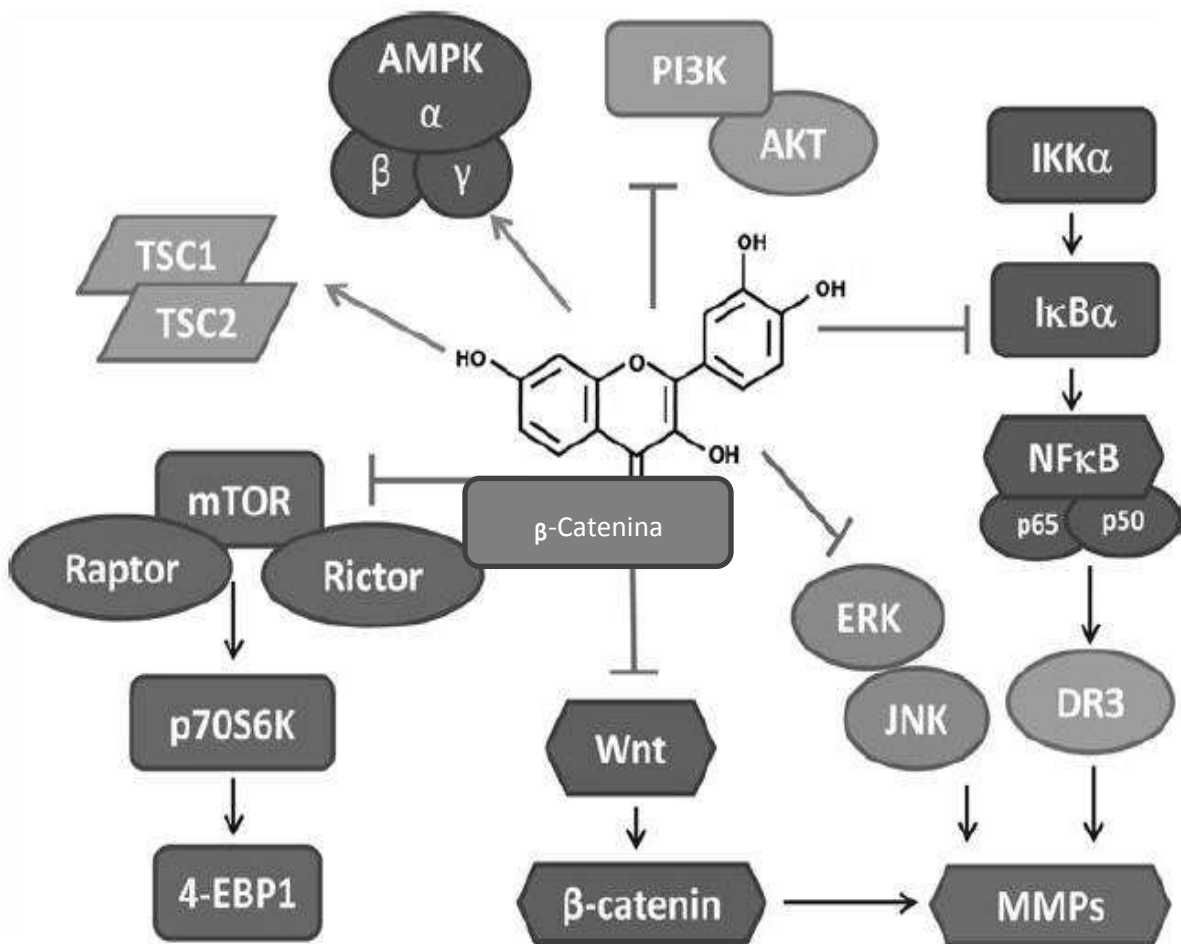


Figura 10. Objetivos moleculares de la fisetina (Naghma Khan y col., 2013).

Cuadro 4. Resumen de los efectos anticancerígenos de la fisetina

Órgano blanco	Estudios <i>in vitro</i>	Referencia
Pulmón	Disminución de la viabilidad de células cancerosas y clonogenicidad, aumento de PTEN, disminución de la PI3-K y Akt fosforiladas, activación de TSC y AMPK, disminución de la fosforilación y la activación de mTOR, disminución de la fosforilación de p70S6K1, eIF-4E, y 4E-BP1, inhibición de mTORC por sus constituyentes tales como Rictor, Raptor, GBL y PRAS40.	(Naghma Khan y col., 2012)
	Inhibición de la adhesión, la migración y la invasión a través de la inhibición de ERK1/2, cascada abajo de MMP-2, UPA, NF-JB y AP-1.	(Liao, Shih, Chao, Lee, y Chiang, 2009)
Colon	Disminución de la viabilidad celular.	(Kuntz, Wenzel, y Daniel, 1999)
	Induce arresto del ciclo celular, inhibición de cdk-4 y 6.	(Li y col., 2011)
	Induce citotoxicidad de manera secundaria e independiente a la vía de p53.	(Yu y col., 2011)
	Inhibe EGFR y NF-JB, disminución de la COX2 y PGE2, inhibe la señalización cascada debajo de la Wnt/b-catenina y TCF-4, disminución de la ciclina D1 y MMP-7.	(Suh y col., 2009)
Próstata	Mejora la radio sensibilidad de las células de cáncer de colon, en células con p53 mutante, aumenta la apoptosis y G2/M.	(Chen y col., 2010)
	Antiproliferativo	(Haddad y col., 2006)
	Inhibición de la adhesión, migración e invasión, supresión de PI3K/Akt/JNK y su regulación cascada debajo de MMP.	(Chien y col., 2010)
	Inhibición de la transactivación de los genes diana de AR, incluyendo PSA, a través de la interacción con AR.	(Naghma Khan, Afaq, Syed, y Mukhtar, 2008)(Naghma Khan, Asim, Afaq, Abu Zaid, & Mukhtar, 2008)
Páncreas	Inhibe el crecimiento celular, promueve la apoptosis, inhibe la invasión, suprime DR3 mediando la activación de NF-kB, disminución de la expresión de MMP-9.	(Murtaza y col., 2009)
Melanoma	Disminución de la viabilidad celular, inducida por la detención de la fase G1, regulación cascada debajo de las proteínas Wnt y sus co-receptores, aumento de los inhibidores de Wnt, Dickkopf y WIF-1, disminución de los niveles de β -catenina nuclear, y regulación cascada debajo de los objetivos de b-catenina, tales como c-myc, Bm-2 y MITF.	(Syed y col., 2011)
Estudios <i>in vivo</i>		
Pulmón	Protege contra B (a) P- en carcinogénesis pulmonar inducida, reduce las lesiones histológicas, restauración enzimática y no enzimática de las defensas antioxidantes.	(Ravichandran y col., 2011)
	Actúa como anti-angiogénico, promueve la reducción de la densidad de los microvasos, disminución del volumen del tumor y es más eficaz con ciclofosfamida.	(Touil y col., 2011)
Próstata	Retarda el crecimiento del tumor y disminuyen los niveles séricos de PSA.	(Naghma Khan, Afaq, Syed, y Mukhtar, 2008)(Naghma Khan, Asim, y Col., 2008)

AMPK, AMP, activadores de la protein kinasa; AR, receptor de andrógenos; COX, cicloxigenasa; DR, receptor de muerte; EGFR, receptor del factor de crecimiento epidérmico; eIF4B, factor de iniciación eucariótico 4B; ERK1 / 2, la señal extracelular de regulación-quinasa; MITF, factor asociado a la transcripción mitocondrial; MMP, Metaloproteasas de la matriz; NF-kB, factor nuclear kappa B; PGE2, la prostaglandina E2; PSA, antígeno específico de la próstata; PTEN, fosfatasa y homólogo de la tensina; TCF, factor de transcripción del factor de células T; TRAIL, ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF; uPA, activador del plasminógeno de uroquinasa; WIF-1, inhibidor del factor de Wnt; XIAP, inhibidor de la apoptosis ligada al X; B(a)P, benzo(a)pirenos.

2.7 Cáncer

2.7.1 Definición y características de la enfermedad

El cáncer es una de las enfermedades consideradas como problema de salud pública a nivel mundial, no sólo por sus graves manifestaciones clínicas y su alta letalidad, sino también por la gran variedad de factores de riesgo (individuales y ambientales) con los que se asocia (Hanahan y Weinberg, 2000).

En México representa la tercera causa de muerte después de la diabetes y las enfermedades cardiovasculares (OMS, 2013). Biológicamente, la carcinogénesis es la consecuencia de diferentes mutaciones que transforman a los protooncogenes y a los genes supresores de tumores que participan en la proliferación celular, y a los que codifican enzimas reparadoras del DNA. Estas alteraciones producen una pérdida en el control del mecanismo homeostático de la proliferación celular, de la diferenciación y del programa de muerte celular (Murray y col., 1999). Por otro lado, los tratamientos relacionados con cáncer involucran el uso de costosas drogas, cirugías y radiación, lo que ha originado un aumento en el interés por la búsqueda de alternativas para la prevención y el tratamiento de este padecimiento (Silvestre-Donat y Puente Sandoval, 2008).

Según la Organización Mundial de Salud (OMS), se define al cáncer como un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo debidas a la aparición o presencia de un tumor maligno o neoplasia maligna, además de ser una enfermedad crónica degenerativa producida por alteraciones en la proliferación, diferenciación y muerte de las células. Debido a lo anterior, las células cancerosas son capaces de formar tumores malignos que tienden a crecer de manera invasiva, afectando tejidos y órganos normales (Cox y Sinclear, 1998; OMS, 2013).

En esta enfermedad, las células que se han transformado tienen un comportamiento de proliferación autónomo, con capacidad de invadir tejidos adyacentes y diseminarse a otras partes del cuerpo (Brandan y Villaseñor-

Navarro, 2006). Los casos de cáncer en México se reportan en unas 358 mil personas que viven con la enfermedad y van en aumento, en los próximos 30 años se atenderán a más del doble de personas, lo que significa que uno de cada 3 mexicanos padecerá de algún tipo de cáncer en su vida. Actualmente el cáncer es la tercera causa de muerte en el país, después de la diabetes y las enfermedades cardiovasculares (Reynoso-Noverón y Mohar, 2014).

Se plantean de forma muy general dos grandes causas fundamentales: las exógenas, responsables del 80-90 % de todas las neoplasias, y las endógenas responsables del 10-20 % restante. Estas últimas, a diferencia de las primeras, ocurren en el organismo independiente a cualquier incidencia externa. Pueden ser mutaciones espontáneas debidas a fallas en procesos biológicos endógenos naturales que ocurren en la célula como es el caso de la reparación del ADN que realizan enzimas correctoras específicas o por herencia, es decir, transmisión de mutaciones en genes recesivos llamados supresores que se transmiten de generación en generación (American Cancer Society, 2014).

Entre los factores relacionados con las mutaciones y el desarrollo de la carcinogénesis están los que existen naturalmente en el ambiente, tales como las radiaciones, los microorganismos, las sustancias químicas naturales producidas por organismos vivos, los minerales como el asbesto, entre otros. Otros han sido generados o incrementados directamente o indirectamente por el impacto de las actividades humanas sobre el ambiente, tales como los subproductos de la combustión del petróleo, sustancias químicas sintéticas, aditivos o pesticidas residuales en los alimentos, así como algunas drogas y medicamentos (OMS, 2013). Muchos de estos compuestos pueden inducir mutaciones en el DNA (mutágenos), otros son capaces de inducir cáncer (carcinógenos) y otros pueden provocar malformaciones congénitas (teratógenos). Todos estos compuestos se engloban en el término genérico de agentes genotóxicos. No todos los compuestos químicos extraños (xenobióticos) que entran en el organismo son de carácter genotóxico. Existen compuestos xenobióticos que no originan daños mutagénicos, cancerígenos o teratogénicos, es decir, son compuestos no

genotóxicos sin embargo, pueden ser promotores de cáncer una vez que éste ha iniciado. En el cuadro 5 se muestran algunos factores genotóxicos y no genotóxicos asociados con el cáncer.

Cuadro 5. Factores relacionados con cáncer (Torroella y Villa, 1998).

GENOTÓXICOS	NO GENOTÓXICOS
Aditivos alimenticios, cosméticos, pesticidas, productos industriales y del hogar, tabaquismo, alcoholismo, estimulantes, alimentos ingeridos o aquellos que se dejaron de ingerir.	Procesos de inflamación, heridas, erosiones, infecciones, irritaciones, cicatrización, daño oxidativo.

2.8 Etapas en el desarrollo del Cáncer

En el desarrollo del cáncer se pueden diferenciar tres etapas principales (Figura 11). La primera se conoce como iniciación y se caracteriza por ser un daño permanente y transmisible en el DNA de una célula que, al no ser reparado, se fija como una mutación. El segundo paso es la promoción, en donde ocurre la expansión clonal a partir de la célula iniciada. Esta etapa puede ser reversible y es en la que se forma propiamente la neoplasia es decir, el tumor. El nivel de acción en el que sucede la promoción es el de la activación de los mecanismos de transducción de señales (Torroella y Villa, 1998). La tercera etapa es la progresión, en la que las células adquieren autonomía y son capaces de migrar a sitios distantes del lugar de donde se originaron (metástasis) (Arteaga, 2003). El cáncer inicia con la aparición secuencial de subpoblaciones genéticamente modificadas y de una heterogeneidad celular incrementada dentro del clon neoplásico. Los cambios genéticos progresivos y acumulativos que se presentan son, entre otros, aneuploidía, pérdida de alelos y amplificación genética. Es característica de esta etapa final la aparición de rasgos que acusan una diferenciación incompleta o falta de ella. El rasgo distintivo de esta etapa terminal es la capacidad de escapar, invadir y colonizar o metastatizar órganos distantes (Fidler, 2003).

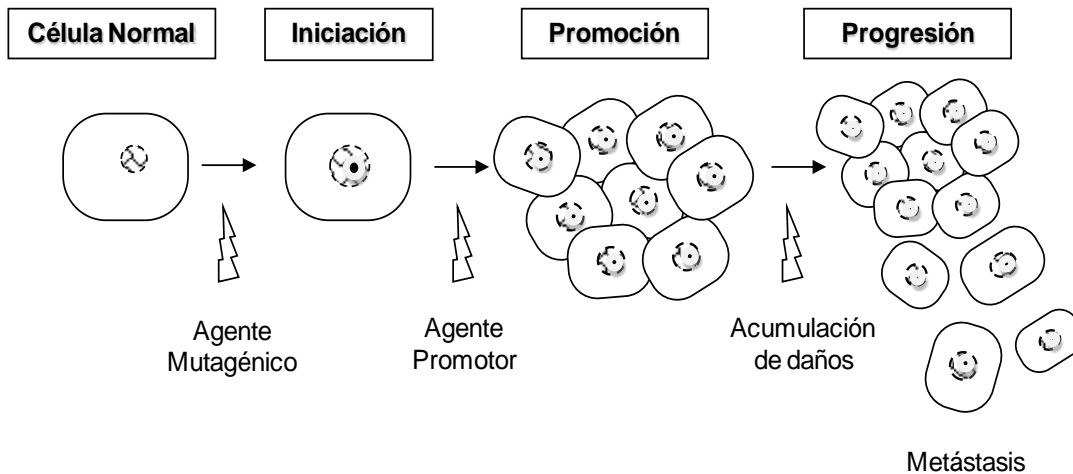


Figura 11. Diferentes etapas en el desarrollo de cáncer (Cornejo y col., 2012)

La invasión y metástasis pueden ser dividida en dos fases: invasión de la matriz extracelular y diseminación vascular con arraigo de las células tumorales en el órgano invadido (Fidler, 2003). Para que la invasión y la metástasis se lleven a cabo, las células tumorales deben adherirse a la membrana basal y posteriormente penetrar el sistema conectivo intersticial, atravesar la matriz extracelular y acceder al sistema circulatorio infiltrando la membrana basal del vaso (Figura 12). Posteriormente las células tumorales embolizadas vuelven a atravesar la pared vascular y la matriz extracelular para formar el tumor secundario (*homing*) (Mareel y Leroy, 2003). Para el proceso de invasión, es necesaria la pérdida de adhesión entre las células transformadas, así como la adhesión alterada a los componentes de la matriz extracelular, la degradación de la matriz extracelular y la mayor capacidad de migración y supervivencia de las células en focos fuera del su lugar de origen (Fidler, 1978). Dicho fenómeno se debe a una disminución en la expresión de moléculas de adhesión intercelular como son las cadherinas, cateninas y la expresión aumentada de receptores para la adhesión con componentes de la matriz extracelular, como el caso de lamininas, integrinas y fibronectinas. Además, las células tumorales segregan proteasas como catepsinas, colagenasas y metaloproteinasas para poder avanzar por la matriz celular (Mareel y Leroy, 2003).

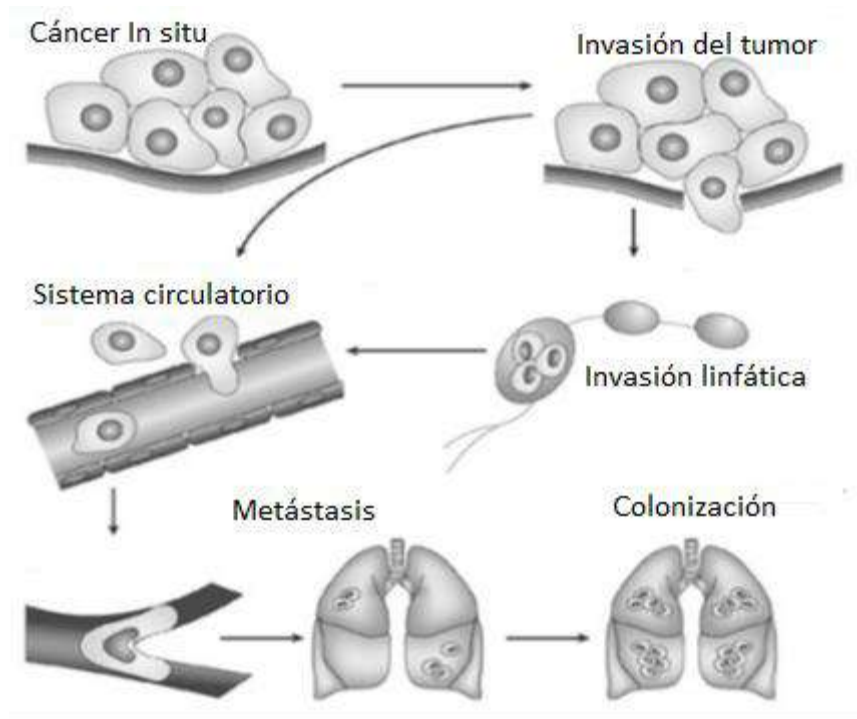


Figura 12. Proceso invasión-metástasis (Steeg, 2003).

2.9 Genética del cáncer

La génesis del cáncer es un proceso al cual se le suman alteraciones en el genoma de las células somáticas. Desde la iniciación, la promoción y la progresión del cáncer se suman una cadena de eventos complejos y sucesivos. Éstos consisten en múltiples episodios de expansión clonal que le confieren ventajas de crecimiento a las células, debido a la aparición de alelos mutantes de protooncogenes y genes supresores de tumores. Todo tipo de cáncer humano que ha sido analizado, evidencia un fenotipo maligno con múltiples alteraciones en oncogenes y antioncogenes. Para la transformación cancerosa, una célula deberá acumular al menos 5 ó 6 de esas mutaciones (Hanahan y Weinberg, 2000).

Existen genes que contribuyen a originar algún tipo de cáncer los cuales, en sus versiones normales, están relacionados con el control de crecimiento y la supervivencia de la célula. Entre ellos se encuentran los protooncogenes, que

estimulan la proliferación celular y los genes supresores de tumor, que la controlan (Miyashita y Reed, 1995) .

2.9.1 Protooncogenes y oncogenes

Los protooncogenes codifican para proteínas que se activan de manera selectiva en presencia de señales reguladoras adecuadas y muchos de los productos son elementos reguladores positivos del ciclo celular. Entre éstos se incluyen algunos receptores de factores de crecimiento, proteínas implicadas en la transducción de señales y algunos factores de transcripción. La versión alterada de un protooncogén se denomina oncogén. Las mutaciones oncogénicas producen un desacoplamiento entre la proteína mutada y el proceso de regulación encargado de su activación, provocando la expresión irregular y continua de la oncoproteína (Weinberg, 1991). Una gran diversidad de oncogenes codifican formas aberrantes de proteínas, las cuales provocan funciones celulares o actividades no deseadas, tales como la proliferación celular aumentada característica de las células cancerosas (Sang y col., 1988). Entre los oncogenes más importantes se encuentran:

- Genes de la familia ras, que codifican una proteína de 21 kDa (p21) que se localiza en la superficie interna de la membrana plasmática. Estas proteínas sirven como moléculas transductoras de señales que inducen la proliferación celular. El desarrollo de mutaciones de ras tiene lugar en estadios precoces del desarrollo de la tumorigénesis colorrectal (Ezquieta y col., 2012).
- El gen c-myc, localizado en el cromosoma 8, codifica una fosfoproteína de 64 kDa involucrada en la activación de la transcripción. Aproximadamente el 32% de los tumores de colon presentan un nivel bajo de amplificación de c-myc. Algunos estudios han mostrado que una sobreexpresión del gen se correlaciona con un mejor pronóstico de la enfermedad (Suzuki y col., 2007).
- Her-2/neu es una glucoproteína de 185-kDa con actividad de tirosina-cinasa. Su expresión tiene significado en el pronóstico en cáncer de mama y cáncer gástrico, incluso los anticuerpos anti-Her-2 han mostrado algún efecto

terapéutico en pacientes con cáncer de mama. En el cáncer colorrectal se mostró una correlación inversa entre la supervivencia y la presencia del Her-2/neu en un estudio en donde se incluyeron 151 pacientes en estadio I, II y III, de tal modo que a mayor expresión, la supervivencia fue menor (Yoon y col., 2014).

2.9.2 Genes supresores de tumores

Se ha sugerido que las células cancerosas presentan mutaciones que inducen inestabilidad genómica y, por lo tanto, aceleran la tasa de mutaciones. Algunas de estas mutaciones afectan a genes que codifican para componentes de los mecanismos de control del ciclo celular, llamados genes supresores de tumores. Estos genes determinan el orden de los eventos, así como la fidelidad e integridad de los sistemas de replicación y reparación del DNA que, de no llevarse a cabo, provoca un descontrol en la proliferación celular que, a su vez, se relaciona con el proceso de tumorigénesis (Miyashita y Reed, 1995). En resumen, las funciones de los genes supresores de tumores son: regular el crecimiento, reparar el DNA, inducir apoptosis, estabilizar el cromosoma, la adhesión celular y regular la transcripción (Menendez y col., 2013). En el conocimiento de los genes supresores se han dado algunos pasos importantes. Los estudios moleculares han identificado hasta la fecha más de 17 genes supresores de tumores implicados directamente en el cáncer humano. Ellos codifican para una serie de proteínas localizadas en distintas regiones dentro de la célula, tanto en el citoplasma como en el núcleo. Los 2 genes mejor caracterizados de esta clase codifican para las proteínas p53 y Rb (Donley y Thayer, 2012).

El primer gen supresor clonado fue rb1, que se relaciona con el desarrollo del retinoblastoma, un cáncer típico hereditario en el humano. El retinoblastoma es una enfermedad humana infantil que involucra un tumor de retina causado por la pérdida de ambas copias del gen rb en la banda q14 del cromosoma 13. Su presencia, además de originar este tumor en los portadores tratados con

radioterapia, incrementa el riesgo de segundas neoplasias, en particular sarcoma osteógeno. El producto del gen supresor de tumores *rb*, ejerce su efecto durante la primera parte de la fase G1 del ciclo celular. En este período o en las células quiescentes, la proteína Rb se une al factor de la transcripción E2F. Este complejo tiene 2 funciones, en primer lugar, muchos de los genes cuyos productos son esenciales para la fase S dependen de la actividad del factor E2F. Por tanto Rb, mediante el secuestro de este factor de transcripción, garantiza que la fase S no pueda ser iniciada. En segundo lugar, el complejo E2F-Rb reprime la transcripción de otros genes. En el punto de restricción de la fase G1 del ciclo celular o cerca del mismo, el Rb es fosforilado por el complejo quinasa 4 o 6 dependiente de ciclina D y esta fosforilación causa la liberación del factor E2F por el Rb, el cual entonces activa los genes cuyas funciones son requeridas para la fase S (Zhang y col., 2012).

El ejemplo más importante de gen supresor es p53, cuya pérdida o mutaciones producen principalmente inestabilidad genómica e inhibición de la apoptosis. Este gen se considera el “guardián del genoma” y su mutación se acompaña de mal pronóstico de cáncer (Torroella y Villa, 1998). Bajo condiciones normales, p53 determina que el daño es irreparable, entonces ordena que se pongan en marcha los mecanismos genéticos para que la célula entre en apoptosis o muerte celular programada. Si este gen sufre alguna mutación, no permite que la célula sea eliminada mediante la muerte programada, tampoco se ocupa de reparar los daños en el DNA y da lugar al inicio del proceso tumoral. Este gen es el más frecuentemente mutado en los cánceres humanos, se presenta en más de un 50% de todos los tipos de cáncer (Lim y Park, 2009).

Otros genes supresores importantes con funciones similares son BRCA1 y BRCA2, que se vinculan sobre todo con el cáncer de mama y ovarios y, en menor proporción, con cáncer de próstata y de páncreas en el varón (Escribano-Díaz y col., 2013).

2.10 Apoptosis

La apoptosis es un mecanismo sujeto a una regulación muy compleja a varios niveles (Becerra y col., 2009). La disminución provocada por apoptosis en el número de células de una población es una contraposición al mecanismo de mitosis que conduce al incremento del número de ellas. La palabra apoptosis significa caída con fragmentación, aludiendo al hecho de que el proceso se acompaña de fragmentación de la cromatina y fragmentación del citoplasma. La cromatina se condensa y el DNA es cortado entre los nucleosomas (Figura 13). El citoplasma experimenta condensación, reducción de volumen y fragmentación con formación de los denominados cuerpos de apoptosis. La apoptosis es un proceso discreto que no deja huellas en el tejido que la sufre, debido a la ausencia de respuesta inflamatoria y a que los fragmentos celulares son fagocitados por los macrófagos. Para la homeostasis del organismo resulta esencial la existencia de un balance adecuado entre mitosis y apoptosis. Además de un mecanismo de regulación del número de células, la apoptosis constituye un mecanismo de seguridad para la supervivencia del organismo, al permitir la eliminación de células alteradas, como las células preneoplásicas (Giansanti y col., 2011).

La apoptosis es esencial para la regulación de varios de los aspectos del desarrollo normal y patológico. Este proceso ocurre en respuesta a ligandos específicos o estímulos de estrés. En condiciones fisiológicas, las células están expuestas a numerosos mutágenos, de tal forma que cuando una célula acumula varias mutaciones y comienza a experimentar transformación maligna, se ponen en marcha diferentes mecanismos de control, entre los cuales se encuentra la activación de la apoptosis. El bloqueo de la apoptosis puede ser causado por mutación de genes supresores de tumores, dando como consecuencia la pérdida de este mecanismo y resultando en la inmortalización celular característica del proceso de carcinogénesis (Tabas y Ron, 2011).

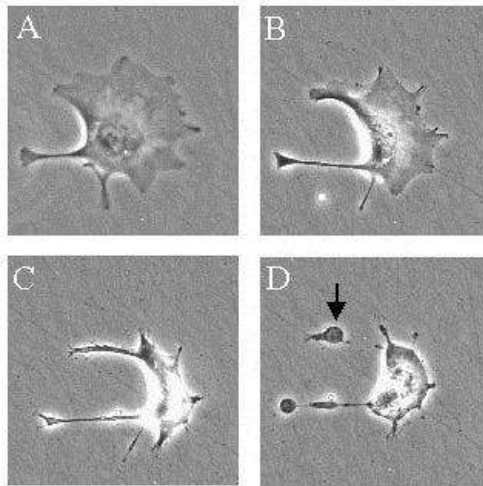


Figura 13. Apoptosis. La célula apoptótica disminuye de tamaño (A), se observa condensación nuclear (B), la célula continúa con la reducción (C), la etapa final de la apoptosis se caracteriza a menudo por la aparición de pequeñas vesículas llamados cuerpos apoptóticos(D, flecha) (Becerra y Col., 2009).

Las mitocondrias juegan un papel importante en la regulación de la muerte celular. Contienen muchas proteínas pro-apoptóticas, tales como el factor de inducción de apoptosis (AIF), Smac/Diablo y el citocromo C. Estos factores son liberados de la mitocondria tras la formación de un poro en la membrana mitocondrial llamado poro de transición de la permeabilidad, o poro PT. Se cree que estos poros se forman a través de la acción de los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2 de proteínas que, a su vez, son activados por señales de apoptosis tales como el estrés celular, el daño de los radicales libres o de la privación de factores de crecimiento (Pimentel y Benaim, 2012).

Las mitocondrias también desempeñan un papel importante en la amplificación de la señalización de apoptosis por receptores de muerte, receptores activadores de caspasa 8 que a su vez activan a proteínas pro-apoptóticas como Bcl-2 y BID (Wei y col., 2015). La inducción de la apoptosis a través de receptores de muerte típicamente resulta en la activación de una caspasa iniciadora, como las caspasas 8 ó 10. Estas caspasas pueden activar a otras caspasas en una cascada que eventualmente conduce a la activación de las caspasas efectoras, como la

caspasa 3 y la caspasa 6. Estas son las caspasas responsables de la división de las proteínas celulares como proteínas del citoesqueleto, lo que conduce a los cambios morfológicos observados en las células sometidas a la apoptosis (Lakhani y col., 2006).

2.10.1 Proteínas de la familia Bcl-2

Los miembros de la familia de proteínas Bcl-2 controlan la apoptosis bloqueándola o induciéndola. La oncoproteína Bcl-2 supresora de la apoptosis se encuentra principalmente anclada en la membrana mitocondrial externa y en otras membranas donde se generan iones superóxido (Raha y col., 2015). A partir de los iones superóxido, la superóxido dismutasa genera agua oxigenada y ésta, en presencia de Fe o Cu, da lugar a radicales libres hidroxilo capaces de alterar las membranas celulares, el DNA y las proteínas, de forma muy similar a lo observado durante la apoptosis. La generación de radicales libres, particularmente del radical hidroxilo, puede formar parte de los mecanismos desencadenantes de la apoptosis. La proteína Bcl-2 ejerce un efecto protector frente a la acción destructora del radical hidroxilo y bloquea la apoptosis. Otro miembro de la familia, la proteína Bax, forma dímeros con Bcl-2 garantizando la supervivencia de la célula (Colin y col., 2015). Sin embargo, un exceso de proteína Bax desplaza a la proteína Bcl-2, de forma que predominan los dímeros Bax-Bax en lugar de los dímeros Bax-Bcl-2, la consecuencia es la inducción de la apoptosis. La expresión de otro gen de la familia Bcl-2, el Bcl-x da lugar por control postranscripcional a dos proteínas distintas: la Bcl-x_L, supresora de apoptosis y la Bcl-x_S, inductora de apoptosis (Serasinghe y col., 2014).

La proteína pro-apoptótica Bcl-2 a menudo se encuentra en el citosol donde actúa como sensor de daño celular. Tras el estrés celular se traslada a la superficie de la mitocondria, donde se encuentran las proteínas anti-apoptóticas. Esta interacción entre proteínas pro-y anti-apoptótica interrumpe la función normal de las proteínas anti-apoptosis Bcl-2 y puede conducir a la formación de poros en las mitocondrias y la liberación de citocromo C y otras moléculas pro-apoptóticas en el espacio

intermembranal. Esto, a su vez, conduce a la formación del apoptosoma y a la activación de la cascada de las caspasas (Serasinghe y col., 2014).

2.10.2 Familia de las Caspasas

Las caspasas son proteasas que juegan un papel clave en el proceso de apoptosis (Lakhani y col., 2006). La familia de las caspasas está constituida por 14 proteasas caracterizadas por la presencia de residuos de cisteína en su sitio activo. Estas proteínas están ampliamente conservadas en el proceso evolutivo y comparten secuencias estructurales comunes (Wolf y Green, 1999). Las caspasas se sintetizan como precursores inactivos que se convierten en la forma activa por ruptura proteolítica. Una vez activas, las caspasas producen la hidrólisis a partir de residuos de ácido aspártico en la proteína sustrato. Así, la activación inicial de una caspasa provoca una reacción en cadena que conduce a la activación de otras caspasas y a la muerte de la célula (Figura 14). Por lo tanto, la regulación de la activación de las caspasas es fundamental para determinar la supervivencia celular (Wang y col., 2014).

Las caspasas iniciadoras (caspasas 2, 8, 9, 10) presentan pro-dominios funcionales que permiten la asociación de estas moléculas con complejos de señalización; las caspasas ejecutoras (caspasas 3, 6, 7) son activadas por las caspasas iniciadoras y son las responsables de la interacción con otras moléculas que desencadenan la apoptosis. La tercera subfamilia de caspasas es la de las caspasas procesadoras de citocinas (caspasas 1, 4, 5, 12, 13, 14). Se ha descrito que la caspasa 1 se activa por la ausencia de factores de crecimiento (Wolf y Green, 1999), que hidroliza a la caspasa 3 *in vitro* y que promueve el procesamiento y activación de la interleucina-1 β (IL-1 β), sustancia implicada en la muerte neuronal (Almeida y col., 2005). En cuanto a la caspasa 2, se sabe que se activa tras su unión a una molécula adaptadora que a su vez se une a una parte del complejo de señalización del receptor de factor de necrosis tumoral (TNF). La caspasa 2 activa puede procesar su propio precursor (Peintner y col., 2015).

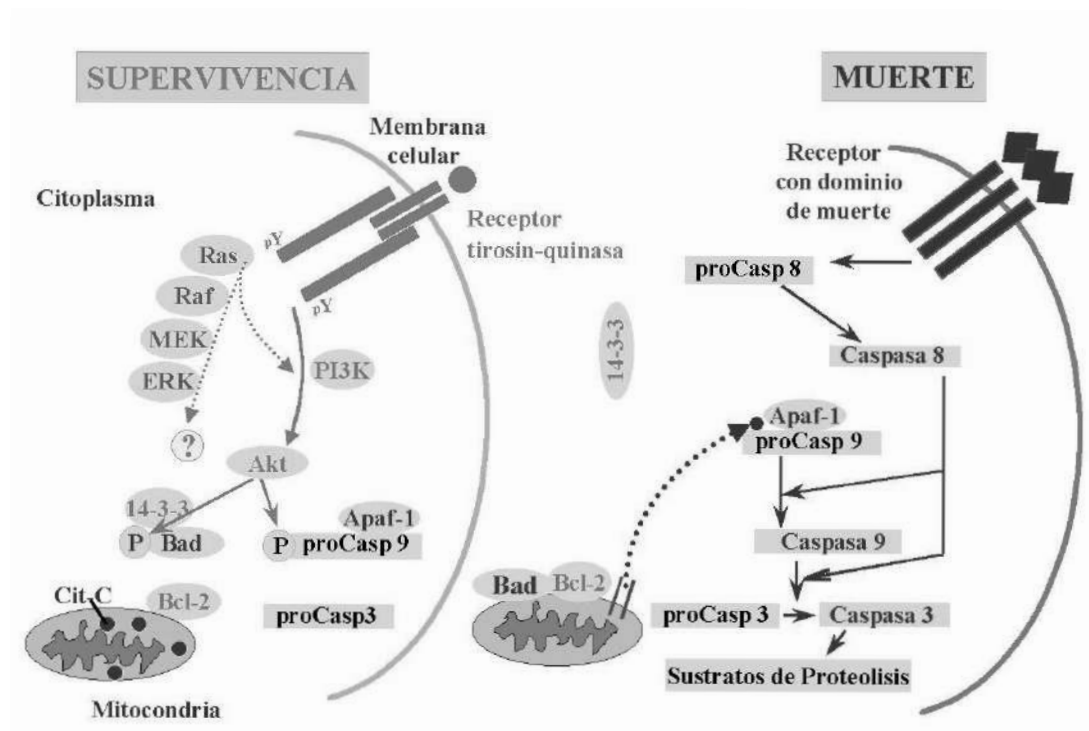


Figura 14. Esquema representativo del mecanismo central de apoptosis. La supervivencia representa las moléculas anti-apoptóticas y la muerte, las pro-apoptóticas (Wolf y Green, 1999).

La caspasa 9, que en situación fisiológica se encuentra en su forma inactiva en el citosol, se activa ante un determinado daño que produzca una alteración en la membrana mitocondrial, lo que desencadena la salida de citocromo C al citosol. El citocromo C forma entonces un complejo con Apaf-1, dATP y procaspasa 9, lo que conduce a la activación de la caspasa. Una vez activa, la caspasa 9 puede activar otras caspasas (Kasahara y Scorrano, 2014).

Debido a estas características se han hecho intentos en la última década para desarrollar moléculas capaces de activar directamente las caspasas ejecutoras para su uso en la terapia contra el cáncer. Por ello, el uso de compuestos que induzcan la apoptosis por esta vía es clave para el tratamiento actual contra el cáncer (McIlwain y col., 2013).

2.11 Papel del Glutati3n en la promoci3n de Apoptosis para el tratamiento del c3ncer.

Las glutati3n-S-transferasas (GSTs) son una familia de la segunda fase de enzimas de detoxificaci3n que catalizan la conjugaci3n de glutati3n (GSH) a una amplia variedad de compuestos electr3filos end3genos y ex3genos. Las GSTs se dividen en dos distintas super familias: la familia microsomal y los miembros de la familia citos3lica. Las GST microsomales son estructuralmente distintas de la familia citos3lica y tienen un papel clave en el metabolismo end3geno de leucotrienos y prostaglandinas. La familia de GST citos3licas son altamente polim3rficas y se pueden dividir en seis clases: α , μ , θ , ω , π y ζ . Las isoformas de π (GSTP1) y μ (GSTM1-4) juegan un papel regulador en la v3a de activaci3n de las prote3nas mitog3nicas map quinasas (MAP), que participan de manera directa en las se3ales de supervivencia y muerte celular a trav3s de interacciones con la prote3na cinasa de c-Jun N (JNK1) y ASK1 (cinasa se3aladora de la regulaci3n de apoptosis). JNK y ASK1 se activan en respuesta celular a estr3s. Las GST han sido implicadas en el desarrollo de resistencia a agentes de la quimioterapia. Por ello es plausible que las GSTs sirvan para dos funciones distintas en el desarrollo de resistencia a los medicamentos a trav3s de la detoxificaci3n directa as3 como actuar como inhibidores de la v3a de la MAPK. Por ello, las GSTs han surgido como una diana terap3utica prometedora ya que una amplia variedad de tumores sobreexpresan isoenzimas espec3ficas y pueden desempe3ar un papel en la etiolog3a de otras enfermedades (Hayes y Pulford 1995; Townsend y Tew, 2003; Joseph y col., 2009).

III.JUSTIFICACIÓN

Está bien documentado que la fresa es rica en compuestos fenólicos, los cuales tienen efectos nutracéuticos ya que disminuyen el riesgo de enfermedades cardiovasculares, mejorando la función endotelial y disminuyen la presión arterial. También se le atribuye una alta capacidad para inducir la apoptosis en células malignas, inhibir la proliferación de células de cáncer, así como prevenir la angiogénesis y la invasión de células tumorales (Duthie y col., 2003; Vauzour y col., 2010).

En los últimos años se reportó que la fisetina (3,3',4',7- tetrahydroxiflavona) es un flavonoide natural que se ha reportado en altas concentraciones en la fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) (Lozola-Gloria y Ayala, 2012) y que puede ser aumentado de manera significativa por la irradiación de la luz ultravioleta, ya que es un metabolito foto dependiente de la enzima Chalcona deshidrogenasa para la vía de los flavonoides, la cual aumenta su transcripción y acción a causa de una estimulación en la transcripción de la misma (Kanazawa y col., 2012).

La evidencia sobre la actividad biológica de los compuestos polifenólicos está aumentando y se proponen vías relacionadas y no relacionadas con su capacidad antioxidante. Es necesario profundizar en los mecanismos de acción de estos compuestos después de haber sido sometidos a irradiación por luz ultravioleta. Por lo anterior, el presente trabajo tiene como finalidad contribuir al conocimiento sobre las posibles vías involucrados en los efectos anticancerígenos de las fresas y caracterizar los compuestos mayoritarios que pueden desempeñar un papel fundamental contra el cáncer, además de probar el efecto biológico que puede generarse por la irradiación ultravioleta en este fruto, por lo cual la pregunta e investigación es **¿El extracto de fresa rico en flavonoides debido a una irradiación de luz ultravioleta tiene una optimización biológica de los compuestos fenólicos y cuál será su efecto en células de cáncer de mama (MCF 7) y linfoma de rata (Nb2)?**

IV. HIPOTESIS

La irradiación ultravioleta aplicada a las fresas potencia el contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante así como la capacidad antiproliferativa sobre células de cáncer.

V. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la el contenido de compuestos fenólicos, su capacidad antioxidante y efecto antiproliferativo sobre células de cáncer de mama humano y linfoma de rata de extractos de fresa irradiados con luz ultravioleta.

5.1 Objetivos específicos

- Determinación de las antocianinas en tres formas del ion flavilo, fenoles totales y taninos condensados en los diferentes extractos.
- Cuantificar la capacidad antioxidante por el método de FRAP y DPPH en los diferentes extractos
- Determinar la citotoxicidad y concentración letal media de los extractos de fresa sobre células de cáncer de mama humano y linfoma de rata.

VI. Materiales y Métodos

6.1 Diseño Experimental

El presente proyecto es experimental, cruzado. La figura 15 muestra el diseño experimental.

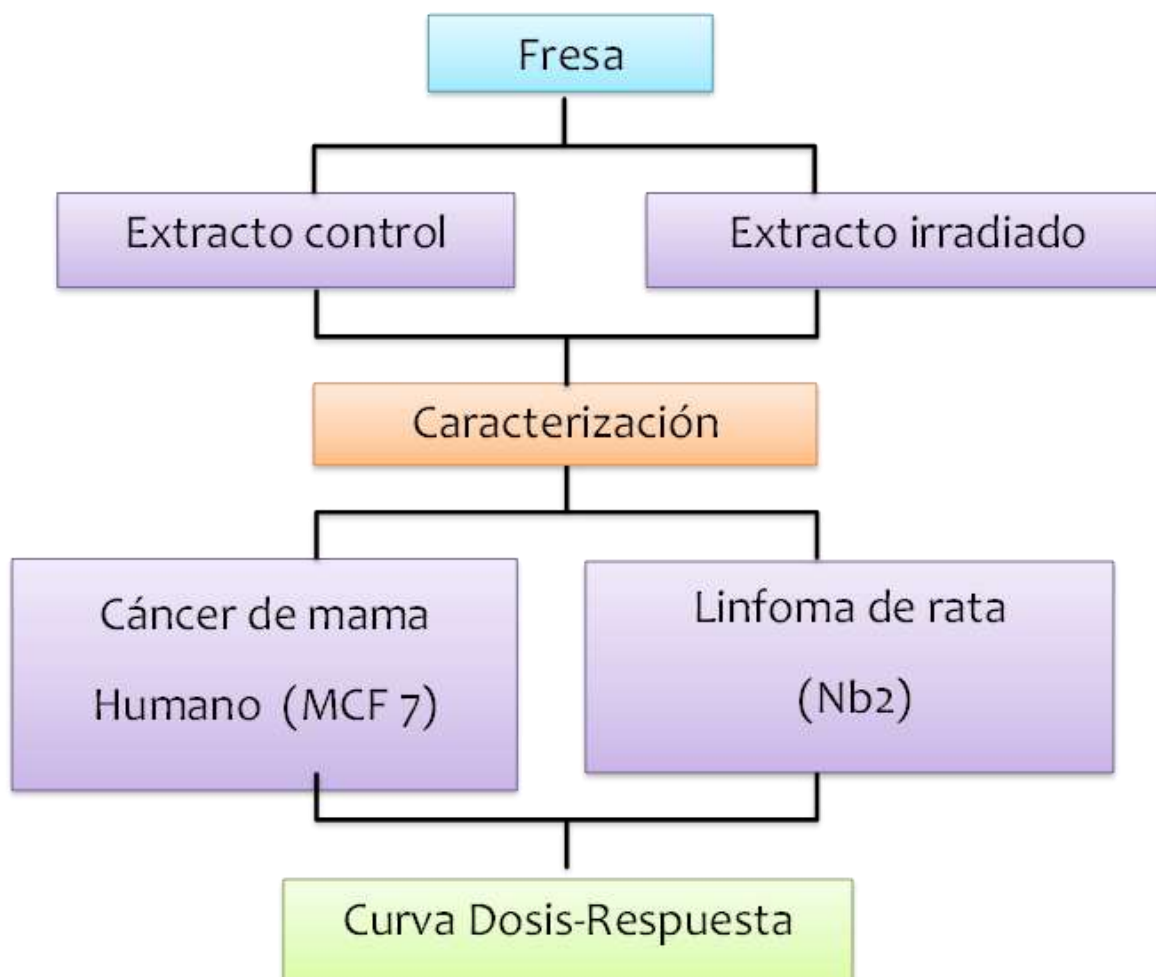


Figura 15. Modelo del diseño experimental

6.2 Características de las líneas celulares

6.2.1 Cultivo celular de cáncer de mama

Células MCF-7 de cáncer de mama se cultivaron en DMEM con Suero Fetal Bovino (SFB) al 15%, 1% con anti-anti a 36 °C en una atmósfera humidificada al

90% con 5 % de CO₂. Las células se cambiaron cada 2-3 días. Las características de las células MCF-7 se muestran en el cuadro 6.

Cuadro 6. Características generales de la línea celular MCF-7.

Organismo	Humano (Homo sapiens)
Tejido	Glándula Mama
Morfología	Epitelial
Enfermedad	Cáncer de mama
Edad	69 años
Genero	femenino
Expresión antigénica	Rh +, grupo sanguíneo O
Genes expresados	Oncogén WNT7B, IGFBP (2,4,5).

6.2.2 Cultivo de celular de linfoma

Las características de la línea celular de linfoma de rata se observan en el cuadro siete, las células Nb2 se mantuvieron en medio que contiene 10% de suero de caballo (Gibco, Life Technologies), suero fetal bovino al 10% y 1% de antibióticos (penicilina-estreptomicina), y mercaptoetanol por 250 ml de medio; Las células se mantuvieron a 37 ° C en 5% de CO₂ en una incubadora.

Cuadro 7. Características generales de la línea celular Nb2.

Organismo	Rata (Rattus)
Tejido	Nodo linfático del Timo
Morfología	Suspensión
Enfermedad	linfoma
Especie	Rat
Genero	Macho
Receptores	Prolactina
Genes expresados	Inmunoglobulina, agonistas de Thy-1, y anticuerpos monoclonales

6.3 Extracto de fresa potenciado en compuestos fenólicos

La base del extracto es la fresa (*Fragaria x ananassa* Duch) fue proporcionada por el Dr. Edmundo Lozoya Gloria del Cinvestav Irapuato. En el presente trabajo se utilizaron dos variantes de este extracto para las líneas celulares y 4 tipos diferentes para la caracterización.

6.3.1 Muestra tratada por irradiación

La fresa es (*Fragaria x ananassa* Duch) fue comprada a un proveedor de invernadero en macrotunel ubicado en el municipio de Irapuato. Al momento de comprar la fresa ésta debía estar en su estado de madurez comercial: la superficie del fruto iba desde el color rojo a rojo oscuro, de un tamaño variable que alcanzaba desde 15 a 22 mm de diámetro, coronada por sépalos de color verde, con un intenso aroma y un sabor dulce (Rámirez Padron, 2010). El fruto fue lavado a chorro de agua, se desinfectó durante 5 min en 1 litro de agua potable con 25 gotas de cloro. Posteriormente se escurrió y se secó con franelas para retirar la mayor cantidad de agua y finalmente se separó el sépalo de la pulpa con un cuchillo de manera manual (Rámirez Padron, 2010).

La fresa fue rebanada en rodajas con un rebanador especial para fresas, las rebanadas se pusieron en una charola de manera que no se sobre encimaran unas sobre las otras, y recibieron un tratamiento de luz UV (Patente MX/E/2013/069030, "Métodos para incrementar el contenido nutracéutico de frutos perecederos"). Las hojuelas fueron secadas en un horno y se liofilizaron posteriormente por 7 días, el producto final fue molido y homogenizado. A la par se obtuvo una muestra no irradiada, procesada de la misma forma.

6.3.2 Extractos de fresa

Los extractos se prepararon de acuerdo al diseño mostrado en la figura 16. Los cuales fueron protegidos de la luz durante todo el proceso; al finalizar la preparación de los mismos solo se podían almacenar con un máximo de 1 mes

previo a su liofilización. El caso del extracto acuoso fue una modificación del método descrito por Paladino y Zuritz. (2011). El extracto etanólico se modificó de acuerdo al método descrito por Fortalezas y col. (2010), el extracto metanólico también se obtuvo mediante una adaptación del método descrito en 2002 por Lopes da Silva y col. Finalmente, el extracto acetónico se obtuvo mediante modificación del método descrito por Kajdazañoska y col. en 2011.

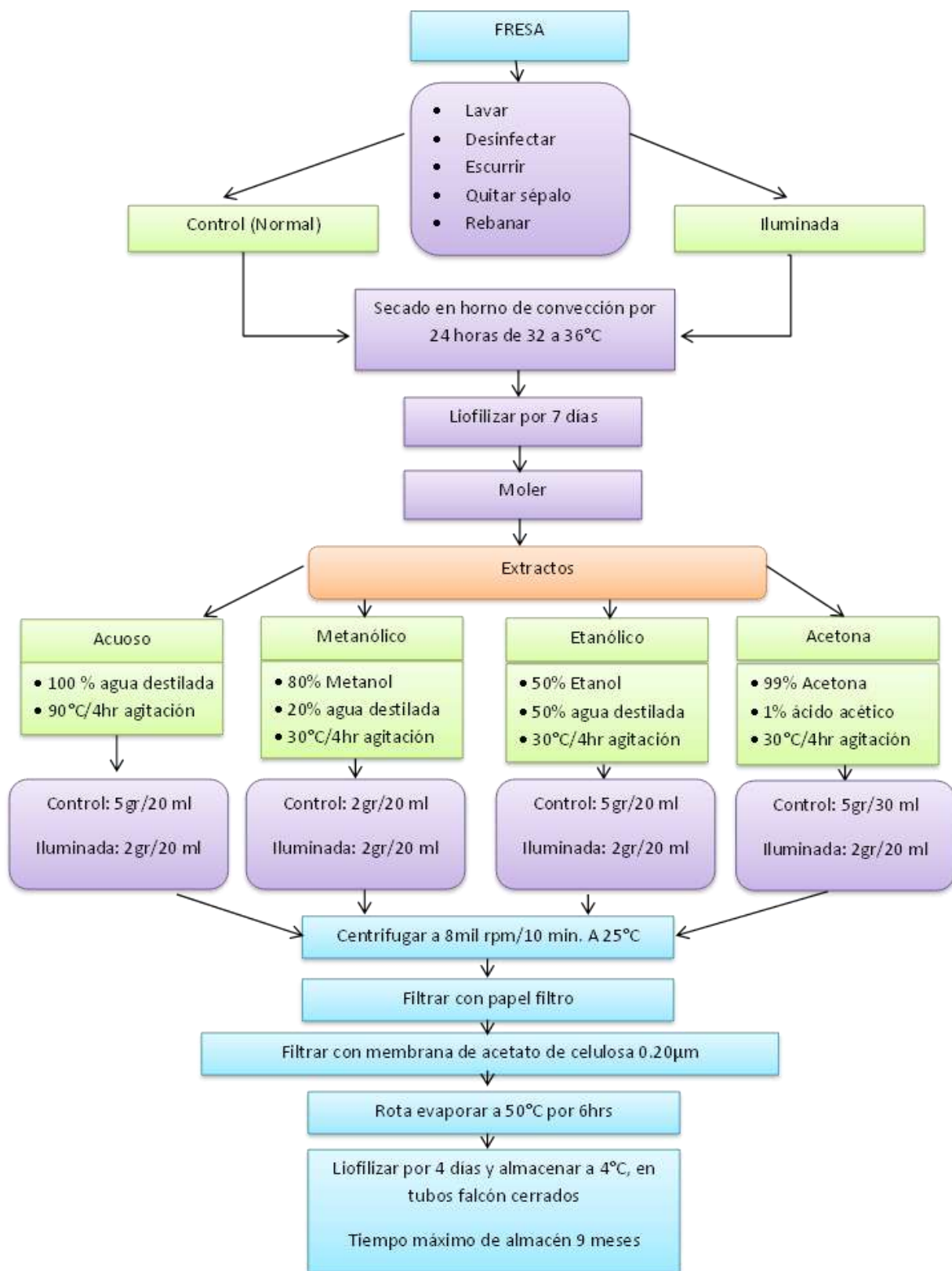


Figura 16. Método de preparación de los diferentes extractos de fresa

6.4 Calidad nutracéutica

6.4.1 Determinación de antocianinas

La cuantificación de antocianinas se realizó a un pH ácido (pH 1) con la finalidad de llevar a las antocianinas a la forma de ión flavilio que presenta coloración y de esta forma poder cuantificarlas espectrofotométricamente (Deighton y col., 2000). Para todos los extractos control se utilizó una alícuota de 250 µL, a excepción del acuoso, la cual fue de 200 µL. Para los extractos iluminados con luz UV, las alícuotas fueron de 200 µL. A cada una se le adicionó 12 mL de etanol acidificado (etanol: HCl 1N en proporción 85:15 respectivamente) y se agitó en un vórtex a 8000 rpm durante 30 min. Se determinó el pH del extracto directamente desde el tubo y de ser necesario se ajustó a 1.0 con HCl 4 N. La solución se agitó a 5000 rpm durante 5 min., posteriormente se aforó en un matraz volumétrico de 25 mL y se agitó manualmente por inversión vigorosa. Finalmente la muestra se leyó a una absorbancia de 535 nm en el espectrofotómetro de placa (6405 UV/Vis, JENWAY). La concentración de antocianinas totales en la muestra (µL/Kg) se calculó como cianidina 3-glucósido, pelargoidina 3-glucosido y pelargonidina-3-rutosida según la siguiente fórmula:

$$C = (A/\epsilon) \times (Vol/1000) \times PM \times (1/vol.muestra) \times 10^6$$

Dónde:

C=concentración de antocianinas (µL/kg)

A=absorbancia máxima

ϵ = Absortividad molar (cianidina 3-glucosido =25 965cm⁻¹M⁻¹ ; pelargonidina 3-glucosido = 15 600 cm⁻¹M⁻¹; pelargonidina 3-rutosida =39 590 cm⁻¹M⁻¹)

Vol= volumen total del extracto de antocianinas

PM= peso molecular (cianidina 3-glucosido =449.6 g/mol; pelargonidina 3-glucosido = 15 600 g/mol; pelargonidina 3-rutosida =39 590 g/mol).

Todos los análisis se realizaron por triplicado y los resultados finales se reportan en mg de la antocianina por 100 g de muestra seca.

6.4.2 Determinación de Fenoles totales

El método empleado fue el de Folin Ciocalteu, descrito por Palomino y col., (2009), el cual está basado en la reducción de ácido gálico por compuestos fenólicos en presencia de un álcali (carbonato de sodio). La extracción se realizó de la siguiente manera: Se tomaron de 1.8 a 2 mL de muestra de cada uno de los extractos, se colocaron en tubos falcon y se añadieron 10 mL de metanol al 30% y se agitó en un vórtex a 8000 rpm durante 10 min.

Para todas las muestras, se tomó una alícuota de 125 μ L del extracto y se colocó en un tubo de ensayo, se le adicionaron 500 μ L de agua desionizada y se agitó brevemente a 3000 rpm., después se le agregaron 125 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu y se agitó brevemente a 3000 rpm. Se dejó reposar 6 min en la oscuridad, posteriormente al tubo se le adicionaron 1.25 mL de Na_2CO_3 al 7% y 1 mL de agua desionizada, se agitó brevemente a 3000 rpm. Y se dejó reposar 1.5 h en la oscuridad a temperatura ambiente. Después del reposo se leyó a una absorbancia de 750 nm en el espectrofotómetro (6405 UV/Vis, JENWAY). En otro tubo se preparó el factor de corrección con 125 μ L del extracto de la muestra y todos los reactivos bajo las mismas condiciones a excepción del reactivo de Folin-Ciocalteu.

Por otro lado se prepararon dos blancos de calibración, en el primer blanco de calibración se usa metanol al 30% además de todos los demás reactivos bajo las mismas condiciones. Para el segundo blanco de calibración, que corresponde al blanco del factor corrección se usa metanol al 30% y todos los reactivos bajo las mismas condiciones a excepción del Folin. La concentración final se expresó como mg equivalentes de ácido gálico/100 g de muestra (mg EAG/100g de muestra seca). Para la determinación de fenoles totales se elaboró una curva estándar de calibración de ácido gálico, en la cual se tomó 10 mg de ácido gálico y

se disolvieron en 50 mL de metanol 30%; la concentración final fue de 0.2 mg/mL. De esta solución se tomaron 25 mL de alícuota y se llevó a 50 mL con metanol 30%, y así sucesivamente hasta obtener una serie de concentraciones de 0.2 hasta 0.00625 mg/mL. De cada una de las soluciones se tomó una alícuota de 125 μ L y se siguió la técnica de fenoles totales. Se graficó la absorbancia contra la concentración para obtener una ecuación lineal.

6.4.3 Determinación de taninos condensados

Se cuantificaron los taninos condensados de acuerdo a una adaptación del ensayo de la vainillina (Deshpande y Cheryan, 1987). El método de la vainillina se usa ampliamente para la cuantificación de proantocianidinas (taninos condensados) en frutas y granos. Esta técnica es específica para flavan-3-ol-dihidrochalconas y proantocianinas, las cuales tienen un enlace simple en la posición 2,3 y poseen grupos hidroxilos en la posición meta del anillo B. La catequina es un flavan-3-ol monomérico frecuentemente usado como un estándar en el ensayo de la vainillina. El método se basa en la condensación de la vainillina con proantocianinas en soluciones ácidas. La vainillina protonada es un radical electrofílico débil que reacciona con el anillo del flavonoide en la posición 6 u 8. El producto intermediario de esta reacción se deshidrata rápidamente para dar un producto coloreado de rosa o rojo cereza (Gutiérrez Gailen, Martínez, Varona Torres, y Rodríguez, 2000).

Para la extracción se tomaron 500 μ L de cada extracto y se colocaron en un tubo falcón. Se adicionaron 10 mL de metanol y se agitó en un vórtex a 8000 rpm durante 20 min. Después se centrifugó a 5000 rpm por 5 min y se tomó 1 mL del sobrenadante, se colocó en un tubo de ensaye y se le adicionaron 5 mL de reactivo de vainillina (vainillina 1% en metanol y HCl 8% en metanol en proporción 1:1) recién preparado.

En otro tubo se preparó el factor de corrección con 1 mL del extracto de la muestra y 5 mL de HCl 4 %. Por otro lado se prepararon dos blancos de calibración uno

con 1 mL de metanol y 5 mL de reactivo de vainillina y otro con 1 mL de metanol y 5 mL de HCl 4%. Después, la reacción se llevó a cabo por 20 min a 30 °C. Se leyó cada muestra a una absorbancia de 500 nm en un espectrofotómetro (6405 UV/Vis, JENWAY).

Para la curva estándar de calibración de (+) catequina se elaboró una curva estándar de calibración por triplicado, para ello, se tomó 10 mg de catequina y se disolvió en 10 mL de metanol absoluto; la concentración final fue de 1 mg/mL de esta solución se tomó una alícuota de 5 mL y se llevó a un volumen de 10 mL con metanol absoluto, y así sucesivamente hasta obtener una serie de concentraciones de 1 hasta 0.0039 mg/mL. De cada una de las soluciones se tomó una alícuota de 1 mL y se siguió la técnica de taninos. Se graficó la absorbancia contra la concentración y la ecuación obtenida fue la aplicada en la determinación de taninos. La concentración final se expresó como mg equivalentes de (+) catequina/100 g de muestra (mgEC/100g).

6.4.4 Flavonoides Totales

La extracción de los flavonoides se realizó como lo reportan (Prior, Wu, & Schaich, 2005). Se utilizaron 0.5 g de muestra seca y se le agregaron 10 mL de metanol al 80% (v/v), se le dio 10 min de vortex (Vortex Genie-2), y se sonicó (Sonicador Branson-2510) por 15 min, se centrifugó (Centrifuga Hermle Z-323-K) a 2000 G por 10 min y al residuo se le hizo una segunda extracción bajo las mismas condiciones, se mezclaron ambos sobrenadantes y éste fue el extracto metanólico.

Los flavonoides se cuantificaron del extracto metanólico, se siguió la metodología de Oomah & Mazza, (1996), con una adaptación a microplaca. Brevemente, a 50 µL del extracto metanólico se le adicionaron 180 µL de agua des-ionizada y 20 µL de solución 2-aminoetilidifenilborato al 10 % en metanol. Se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 404 nm en MULTISKAN. Se empleó rutina para la realización de la curva estándar en concentraciones de 0–50 µg/mL, la cual se

preparó en metanol al 80%. La concentración de flavonoides se expresó como mg equivalentes de rutina/100g de muestra seca (mg ER/100 g).

6.4.5 Medición de Fisetina por HPLC

Para el análisis de flavonoides en HPLC se utilizó un cromatógrafo líquido de alta resolución Agilent Technologies 1290 infinity. Para detectar el metabolito fisetina se utilizó una columna Zorbax Eclipse Plus C18 con un tamaño de 2.1 X 50 mm y un tamaño de partícula de 1.8 micrones. Los solventes utilizados fueron: A) Agua 98%-Ácido acético 2% y B) Agua 68%-Acetonitrilo 30%- Ácido acético 2%. El volumen de inyección de la muestra fue de 1 μ L, a una temperatura de 35°C, se leyó a una longitud de onda de 360 nm. El tiempo de retención de la fisetina bajo estas condiciones fue de 10.721 min. En el caso del metabolito pelargonidina, la columna utilizada fue Hypersil Gold con un tamaño de 2.1 X 50 mm y un tamaño de partícula de 1.9 micrones, los solventes utilizados fueron: A) Agua-Ácido acético pH 2.3 y B) Agua 110: Acetonitrilo 50: Ácido acético 40 pH 2.3. El volumen de inyección de la muestra fue de 2 μ L, a una temperatura de 30°C, se leyó a una longitud de onda de 360 nm (Fang, Li, Pan, y Huang, 2004).

6.5 Capacidad antioxidante

6.5.1 Método de FRAP

Se basa en la capacidad de transferencia de un electrón la solución férrica (FARP) en compañía de un compuesto con capacidad reductora (recibir electrones) o antioxidante. La ventaja de este método es su capacidad para determinar cuantitativamente la cantidad total de antioxidantes o reductores en alimentos. Su principio es medir la absorbancia a 593 nm que se desarrollan cuando el complejo TPTZ-Fe⁺³ se reduce a TPTZ-Fe⁺². De esta forma, la capacidad antioxidante que se presentan en los extractos de diferentes frutas y vegetales se mide como capacidad antioxidante reductora del extracto (Benzie y Strain, 1996).

Para las muestras se usó una placa de 96 pozos a la cual se añadió 90µL de agua desionizada, 10 µL de la muestra y 50 µL del radical TPTZ-Fe³⁺ (solución TPTZ 10 mM, Solución FeCl₃·6H₂O 20mM y tampón de acetato 0.3mM, en proporción 1:1:10) se incubó por 4 min a temperatura de 37°C, se leyó en una absorbancia de 593 nm.

Las mediciones se hicieron por triplicado para cada muestra, y el resultado final se expresó en µM equivalentes de Trolox. En el caso de la curva de calibración esta se hizo con Trolox (ácido 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic), donde las concentraciones fueron 399, 359, 323, 290, 261, 209, 167, 134 y 107 µM en metanol-agua 1:1.

6.5.2 Método de DPPH

El principio de este método se basa en calcular la capacidad que tiene un posible antioxidante para neutralizar un radical. El compuesto DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) es un radical estable que presenta una coloración intensa del violeta y que absorbe radiaciones a una longitud de onda de 517 nm. Este radical cuando tiene un electrón desapareado presenta coloración azul-violeta, pero al interaccionar con un compuesto antioxidante la tonalidad vira hacia amarillo pálido, la diferencia por absorbancias permite obtener el porcentaje de captación de radicales libres (Molyneux, 2003).

Para la preparación de la muestra se tomaron 10 µL de cada extracto y se le añadió 200 µL del radical DPPH. En el caso del blanco se utilizó metanol puro, y en el caso del blanco de muestra se usó 300 µL DPPH. Se dejó reposar por 30 min y se leyó la absorbancia a 517nm.

Las mediciones se hicieron por triplicado para cada muestra, y el resultado final se reportó en µM equivalentes de Trolox. En el caso de la curva de calibración se hizo con Trolox (ácido 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic), donde las concentraciones fueron 399, 359, 323, 290, 261, 209, 167, 134 y 107 µM en metanol.

6.6 Evaluación biológica

6.6.1 Curva dosis respuesta

Se emplearan células de la línea MCF-7 (ATCC, Manassas VA, USA) y Nb2 (ECCAC). Las células se sembraron (3×10^4 células por pozo) en placas de 24 pozos, con suero fetal bovino (SFB) al 15% en medio base (DMEM, Gibco BRL, cat. N° 12100-038) suplementado con 1% de anti-anti (mezcla de antibióticos). Las placas se mantuvieron en incubación a 37°C y en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Después de 24 h, se cambió el medio por SFB al 2% en el mismo medio base. Después de 48 h de la siembra, se contaron las células de dos pozos para determinar el número de células al momento del cambio de las condiciones experimentales (Co). Así mismo, al resto de los pozos se les retiró el medio y se les agregaron, por duplicado, los tratamientos disueltos en DMEM suplementado con albumina sérica de bovino (ASB) al 0.5% de la manera siguiente: para las células tratadas con el extracto irradiado de fresa se emplearan dosis de 10, 5, 1, 0.5, 0.1 y 0.01 % de extracto de fresa/mL. Para las células tratadas con extracto de fresa control se emplearon las mismas dosis, y se hizo otro control con fisetina a una concentración de 100µM/mL.

Después de 24 h de incubación se determinó el número de células de cada pozo por recuento al microscopio, previa cosecha de las células con tripsina al 0.15%. El número de células se determinó mediante los siguientes cálculos (García-Gasca y col., 2002):

$$\text{Número total de células} = [N(1 \times 10^4) \times (C)]/V$$

Dónde:

N= número de células contadas

C= número de campos contados en el hemocitómetro,

1×10^4 = factor de dilución del hemocitómetro

V= volumen en mL de la suspensión celular.

La proliferación celular se calculó de acuerdo a la ecuación:

$$\%P = [N. \text{ de células en el tratamiento} \times 100] / N. \text{ de células del control en ASB 0.5\%}$$

La sobrevivencia celular se calculó mediante la ecuación:

$$\%S = [N. \text{ de células en el tratamiento} \times 100] / N. \text{ de células del control inicial}$$

Para obtener la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) y la letal 50 (CL₅₀), se calcularon usando el software GraphPad Prism versión 6.

VII. Análisis estadístico

Para el manejo de datos se utilizó el software SPSS versión 18 y Statistic 6.1; Dentro de los análisis se realizó una ANOVA y una prueba de Tukey ($p < 0.05$) para la caracterización de los extractos. Las curvas dosis-respuesta se analizaron mediante regresión lineal simple. Los datos experimentales de dosis-respuesta y HPLC se analizaron mediante una prueba de t-student para muestras independientes ($p < 0.05$) y la comparación del efecto entre las líneas celulares se evaluó con una ANOVA y una prueba de Dunnett ($p < 0.05$) entre las diferentes concentraciones probadas con respecto al control y una post hoc de Tukey para la diferencia entre CI50 y CL50.

VIII. Resultados y Discusión

La figura 17 muestra las concentraciones de antocianinas en los extractos irradiados. En general se obtuvieron valores más altos de todas las antocianinas determinadas lo que sugiere que las antocianinas son metabolitos foto dependientes como se he postulado en otros estudios (Carrasco-Ríos, 2009).

Al comparar el contenido de cianidina-3-glucósido de la variedad trabajada en este protocolo (*Fragaria x ananassa* Duch) con cuatro variedades españolas cultivadas en el 2002 (Camarosa, Carisma, Eris, Oso Grande y Tudnew) se observa mucha semejanza ya que los contenidos van 11 hasta 28 mg cianidina-3-glucosido/100 g de muestra sec. La única variedad que superó a la variedad estudiada fue la Camarosa con un contenido de 41 mg cianidina-3-glucosido/100 g (Lopes da Silva y col., 2002).

Respecto a la pelargonidina-3-glucósido, al hacer una comparación con las variedades europeas se observó una semejanza en la proporción de este compuesto, ya que la pelargonidina-3-glucósido es la antocianina predominante en las fresas (aproximadamente el 83% del contenido total de antocianinas). Sin embargo, las concentraciones encontradas en el presente estudio fueron menores que las de las variedades Tudnew, Carisma y Camarosa en las que se han reportado valores de 401, 242 y 261, respectivamente (Lopes da Silva y col., 2002).

Otra antocianina presente en las diversas variedades de fresa es la pelargonidina-3-rutósido, y se sabe que aporta aproximadamente del 8-13 % del contenido de antocianinas, lo que fue consistente con todas las muestras estudiadas. Al comparar con muestras europeas de fresa (Camarosa, Carisma, Eris, Oso grande y Tudnew), se observó que la mayoría de las variedades extranjeras presentaron un contenido semejante al de la variedad estudiada. Sin embargo, la variedad Camarosa reporta valores tres veces superiores al contenido para la mayoría de las variedades (43 mg/100 g) (Lopes da Silva y col., 2002).

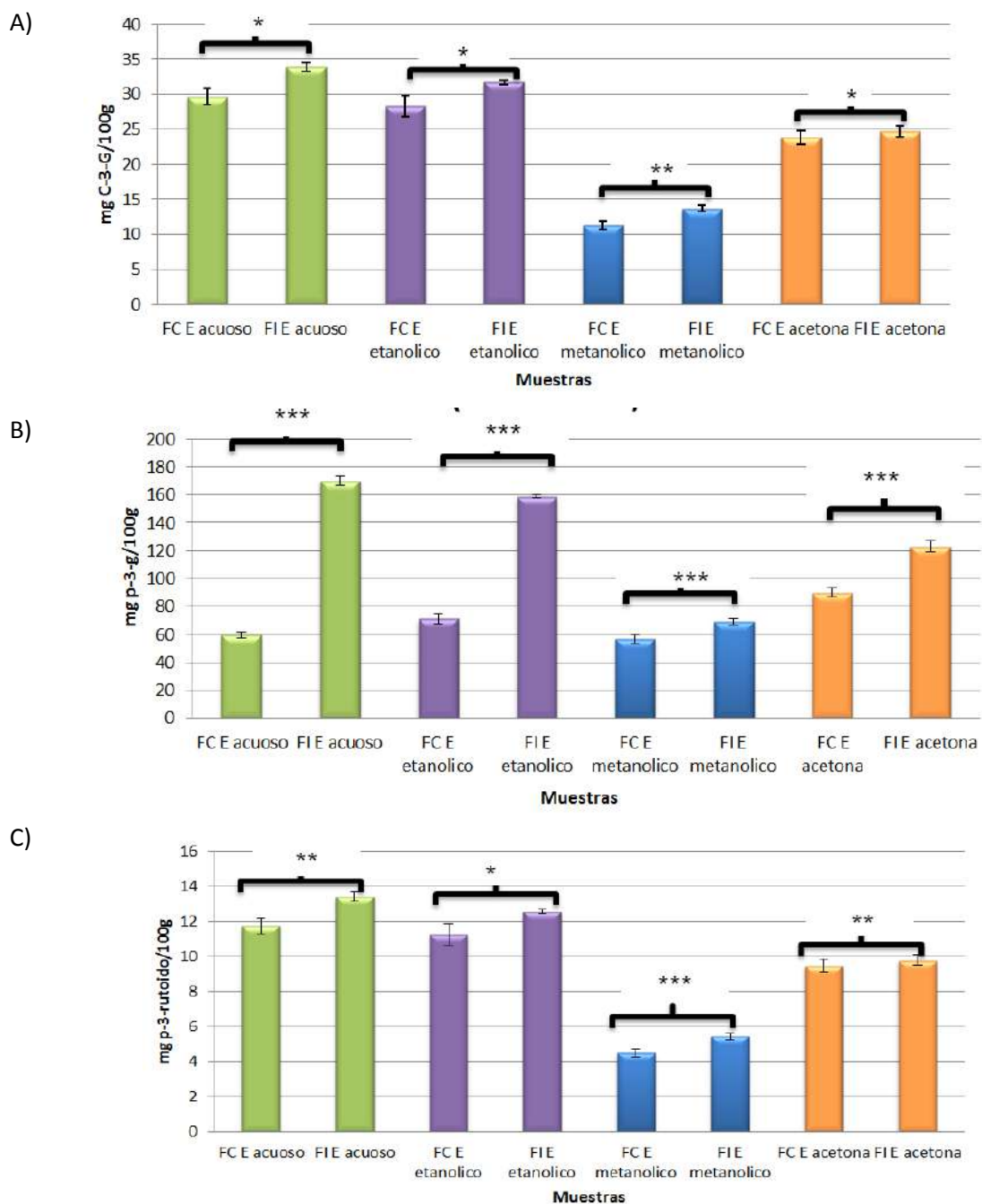


Figura 17. Contenido de Cianinida-3-Glucósido (A), Pelargonidina-3-Glucósido (B) y Pelargonidina-3-rutósido (C) en los diferentes extractos de fresa. Se muestran los extractos irradiados (FIE) y no irradiados (FCE). Prueba de t de student entre los dos tratamientos (* $p < 0.05$, ** $p \leq 0.01$, * $p \leq 0.0001$).**

Al hacer la comparación entre los diferentes solventes (cuadro ocho), se observa que el extracto acuoso irradiado es el que mayor contenido de cianidi-3-glucósido

presenta (33.87 ± 0.65), seguido del etanólico irradiado (31.71 ± 0.28) y el de menor contenido fue el metanólico control (11.31 ± 0.57). Lo anterior sugiere que la irradiación potencia la producción de este metabolito y, además, el efecto de extracción por el disolvente promueve su recuperación ya que las antocianinas son metabolitos polares (Zafra-Stone y col., 2007). La cantidad de pelargonidina-3-glucósido para las muestras irradiadas y con extracto acuoso fue de 170 ± 3.26 , seguida por el etanólico con 159 ± 1.40 . El disolvente que potenció en menor cantidad esta antocianina fue el metanólico, tanto el control como el irradiado. En el caso de la pelargonidina-3-glucósido, las muestras que mayor contenido presentaron fueron las muestras irradiadas con el extracto acuoso y etanólico y, nuevamente, el disolvente metanólico fue el que potenció menos su recuperación.

Cuadro 8. Antocianinas en los diferentes extractos de fresa

Muestra		mg cianidina-3-glucósido/100g ps	mg pelargonidina 3-glucósido/100g ps	mg pelargonidina 3-rutósido/100g ps
Fresa control	Acuoso	29.63 ± 1.12^c	59.50 ± 2.24^f	11.72 ± 0.44^c
	Etanólico	28.35 ± 1.52^c	71.18 ± 3.82^e	11.22 ± 0.60^c
	Metanólico	11.31 ± 0.57^e	56.78 ± 2.86^f	4.47 ± 0.23^f
	Acetona	23.88 ± 0.95^d	89.92 ± 3.59^d	9.45 ± 0.38^d
Fresa irradiada con UV	Acuoso	33.87 ± 0.65^a	170 ± 3.26^a	13.40 ± 0.26^a
	Etanólico	31.71 ± 0.28^b	159 ± 1.40^b	12.55 ± 0.11^b
	Metanólico	13.69 ± 0.45^f	68.73 ± 2.24^e	5.42 ± 0.18^e
	Acetona	24.67 ± 0.77^d	123 ± 3.87^c	9.76 ± 0.30^d

Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de 4 repeticiones. ps= peso seco de la fresa. Las letras minúsculas indican diferencia estadística significativa (Tukey, $p \leq 0.05$).

En resumen, el mejor disolvente para la extracción de antocianinas es el agua, lo que concuerda con las características fisicoquímicas de las antocianinas ya que estas al ser hidrosolubles tendrán mayor afinidad a este solvente (Zafra-Stone y col., 2007) a diferencia de lo que se esperaba con el extracto etanol:agua. Posiblemente esto se deba a la temperatura de precocción ya que se ha visto que

a temperaturas elevadas se obtienen más antocianinas pero menos estables. La temperatura genera mayores fluctuaciones en el pH, lo cual elimina parcialmente las glicaciones de estos cromóforos por lo que se alcanza a potenciar parcialmente el contenido de estos (Paladino y Zuritz, 2011).

En la figura 18 se muestran los resultados para la extracción de fenoles totales. El extracto etanólico fue el que mayormente recuperó estos compuestos fenólicos, mientras que el metanólico mostró las menores concentraciones. Al comparar con fresas cultivadas en China (300 mg equivalentes de ácido galico) se observa que las muestras estudiadas presentaron mayores contenidos (Huang y col., 2012).

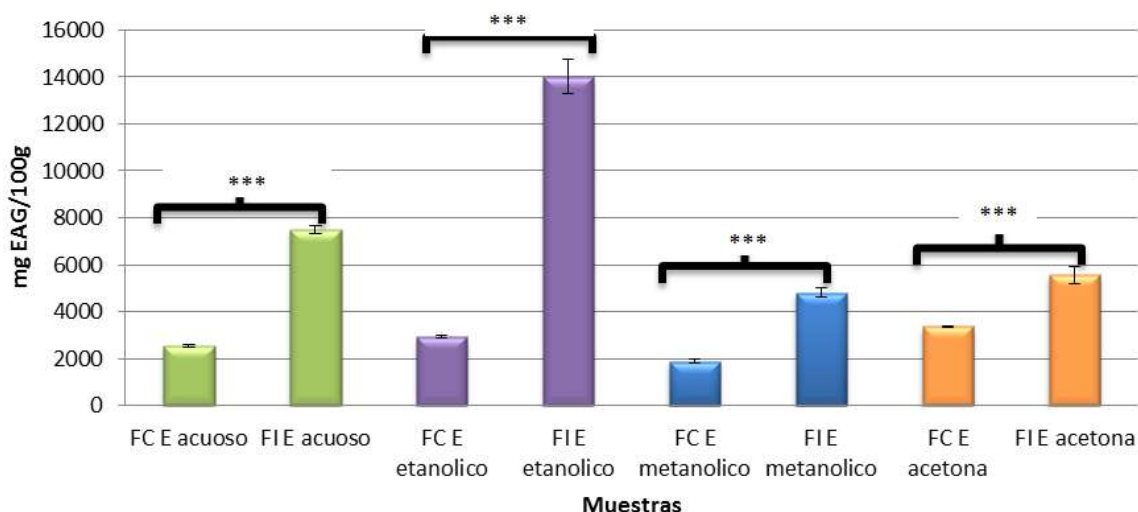


Figura 18. Contenido de Fenoles totales en los diferentes extractos de fresa irradiada y no irradiada. Se muestran los extractos irradiados (FIE) y no irradiados (FCE). Prueba de t de student entre los dos tratamientos (* $p < 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.0001$).

La cuantificación de taninos condensados se muestra en la figura 19. Se observa que el extracto etanólico potenció de mejor manera la recuperación de estos compuestos, seguido por el acuoso irradiado y, en último lugar el extracto acetónico control. La misma variedad cultivada en Oregon, EU y tratadas con oxígeno mostró un menor contenido de taninos condensados (40 mg EC/100 g) que las muestras control estudiadas. Lo anterior puede estar relacionado con la cantidad de luz que pueden recibir en el estado de Oregón y que puede estar

relacionado también con la activación de PAL, ya que ésta no es dependiente de procesos oxidativos, sino más bien de procesos fotoquímicos (Cheng y Breen, 1991).

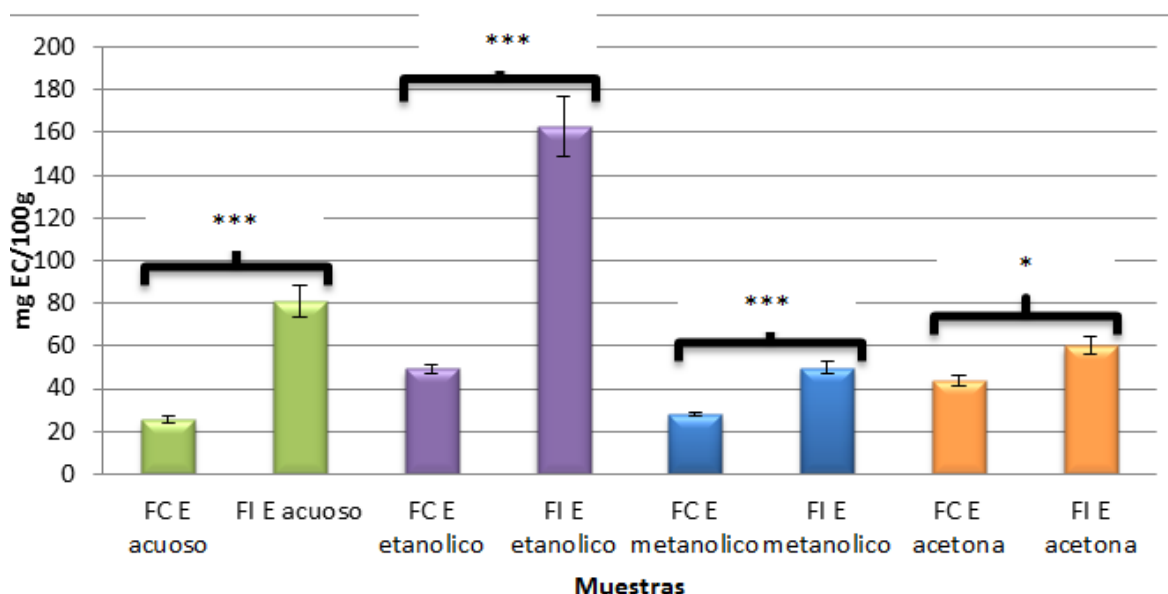


Figura 19. Contenido de Taninos condensados en los diferentes extractos de fresa irradiada y no irradiada. Se muestran los extractos irradiados (FIE) y no irradiados (FCE). Prueba de t de student entre los dos tratamientos (* $p < 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.0001$).

Al evaluar el contenido de fenoles totales mediante ANOVA (cuadro nueve) se observó el mismo patrón de resultados que para antocianinas. Los extractos de fresas irradiadas presentaron contenido superiores de fenoles totales y taninos condensados que los de las fresas control. Lo anterior refuerza la teoría de que la irradiación UV estimula a la enzima PAL, la cual es limitante para la conversión de metabolitos secundarios, es decir la activación de la vía del ácido Shikimico y también se responsabiliza a la luz ultravioleta de la activación transcripcional de la enzima Chalcona deshidrogenasa la cual es la primera enzima para el metabolismo de los fenilpropanoides los cuales comienzan con la síntesis de flavonoides en las plantas (Carrasco-Ríos, 2009).

Cuadro 9. Contenido de fenoles totales y taninos condensados en los diferentes extractos

Muestra		Fenoles totales*	Taninos condensados**
		mg EAG/100 g ps	mg EC/100 g ps
Fresa control	Acuoso	2537±39.16 ^{fg}	25.3±1.67 ^e
	Etanólico	2924±60.03 ^{e^f}	49.3±2.17 ^{cd}
	Metanólico	1884±81.11 ^g	28.0±0.56 ^e
	Acetona	3371±25.43 ^e	43.9±2.54 ^d
Fresa irradiada con UV	Acuoso	7501±151.9 ^b	81.1±7.20 ^b
	Etanólico	14008±712.3 ^a	163±14.19 ^a
	Metanólico	4813±178.9 ^d	49.9±3.08 ^{cd}
	Acetona	5557±362.8 ^c	60.3±4.24 ^c

Los resultados son expresados como la media ± la desviación estándar de 4 repeticiones. ps= peso seco de la fresa. *EAG=equivalentes de ácido gálico, **EC=equivalentes de catequina. Las letras minúsculas indican diferencia estadística significativa (Tukey, $p \leq 0.05$).

Otra evaluación importante es la capacidad antioxidante, la cual es un indicador de su actividad biológica y posible protección a los daños en la membrana lipídica, proteínas y ADN. Lo anterior se ha establecido como un importante factor para desarrollar cáncer y como un mecanismo para sensibilizar a estas células en los tratamientos de radioterapia y quimioterapia

En el caso del contenido de flavonoides, (cuadro 10) se observa un mayor contenido en las muestras irradiadas, se ve que el disolvente que mejor potencia estos compuestos es el etanólico. Al comparar estos resultados con otros estudios en los cuales se ha tratado a la fresa elicitores atmosféricos (nitrógeno, CO₂ y Oxígeno) las concentraciones varían entre los 9 y 11mg/g de flavonoides, los cuales son menores a los obtenidos por nosotros. Por lo cual podríamos confirmar de manera indirecta que efectivamente la luz ultravioleta incrementa las

enzimas PAL y CHS, encargadas de la vía de ácido shikimico y de la vía de los fenil propanoides respectivamente(Mahmood y col., 2012; Creasy 1968).

Cuadro 10. Contenido de flavonoides totales de los diferentes extractos.

Muestra		Mg Eq Rutina/g
Fresa control	Acuoso	9.03±0.84d
	Etanolico	15.85±0.05ab
	Metanolico	11.68±1.03c
	Acetona	11.73±1.77c
Fresa iluminada con UV	Acuoso	13.70±1.04bc
	Etanolico	17.97±0.63a
	Metanolico	13.29±1.10bc
	Acetona	15.31±1.30b

Los resultados son expresados como la media \pm desviación estándar de 3 réplicas. Diferentes letras por columna significan una diferencia estadística.

En cuanto al resultado de la fisetina, podemos observar (Cuadro 11) que el contenido es semejante al reportado por otros estudios el cual se encuentra en un promedio de 160 μ M/g. También se puede ver que el contenido de este metabolito esta incrementado en todos los extractos irradiados con luz ultravioleta y que la más alta concentración se obtiene con el extracto etanólico (Maher, 2009).

Cuadro 11. Contenido de fisetina en los diferentes extractos de fresa, medidas por HPLC

Muestra		Fisetina (μ M de EF/g)
Fresa control	Agua	81.92±0.05 ^{cd}
	Etanol	163.09±0.09 ^b
	Metanol	85.66±0.08 ^{cd}
	Acetona	58.51±0.01 ^d
Fresa Irradiada	Agua	183.73±4.57 ^b
	Etanol	253.31±0.54 ^a
	Metanol	191.66±1.65 ^b
	Acetona	106.06±0.08 ^c

Los resultados son expresados como la media \pm desviación estándar de 3 réplicas. Diferentes letras por columna significan una diferencia estadística. EF= equivalentes de fisetina.

Cuadro 12. Contenido de Flavonoides totales del extracto libre de solvente etanólico.

Muestra	Flavonoides Totales(EC mg/g)	p
Fresa control	45.5 ± 2.51	< 0.0001
Fresa Irradiada	33.2 ± 2.63	

Los resultados son expresados como la media ± desviación estándar de 3 réplicas. Diferentes letras por columna significan una diferencia estadística. EC= equivalentes de catequina.

Al comparar el contenido de flavonoides en nuestro extracto libre de solventes se puede ver que aumenta la concentración de la flavonoides (un aumento de hasta 3 veces el contenido previo) y sigue siendo mayor el contenido en el extracto irradiado en comparación con el control, además sucede lo mismo con la concentración de fisetina (Cuadro 12 y 13) (Wright y col., 2007).

Cuadro 13. Contenido de fisetina de en los extractos etanólicos libres de solvente.

Muestra	Fisetina (µM de EF/g)	p
Fresa control	233.2± 0.205	< 0.0001
Fresa Irradiada	286 ± 1.29	

Los resultados son expresados como la media ± desviación estándar de 3 réplicas en peso seco de extracto de fresa. Diferentes letras por columna significan una diferencia estadística. EF= equivalentes de fisetina.

Como se observa en la figura 20 los extractos irradiados presentaron mayor capacidad antioxidante mediante el método de DPPH,s resultados son mostrados como su porcentaje de inhibición (Absorbancia control- absorbancia de la muestra /absorbancia control x100), como sugiere Orak y col. (2011), se observa que los resultados son semejantes a los encontrados por Bursack para variedades *Fragria x. ananassa* Ducha cultivada en Croacia. El porcentaje de inhibición puede

alcanzar hasta un 90%, pues en la mayoría de las muestras (Figura 17) el porcentaje de inhibición fue superior al 80% (BursaćKovačević y col., 2009). La fresa control, presenta resultados similares a los observados para fresa cultivada en Estados Unidos (capacidad antioxidante de 15 $\mu\text{M/g}$) (Ozgen y col., 2006).

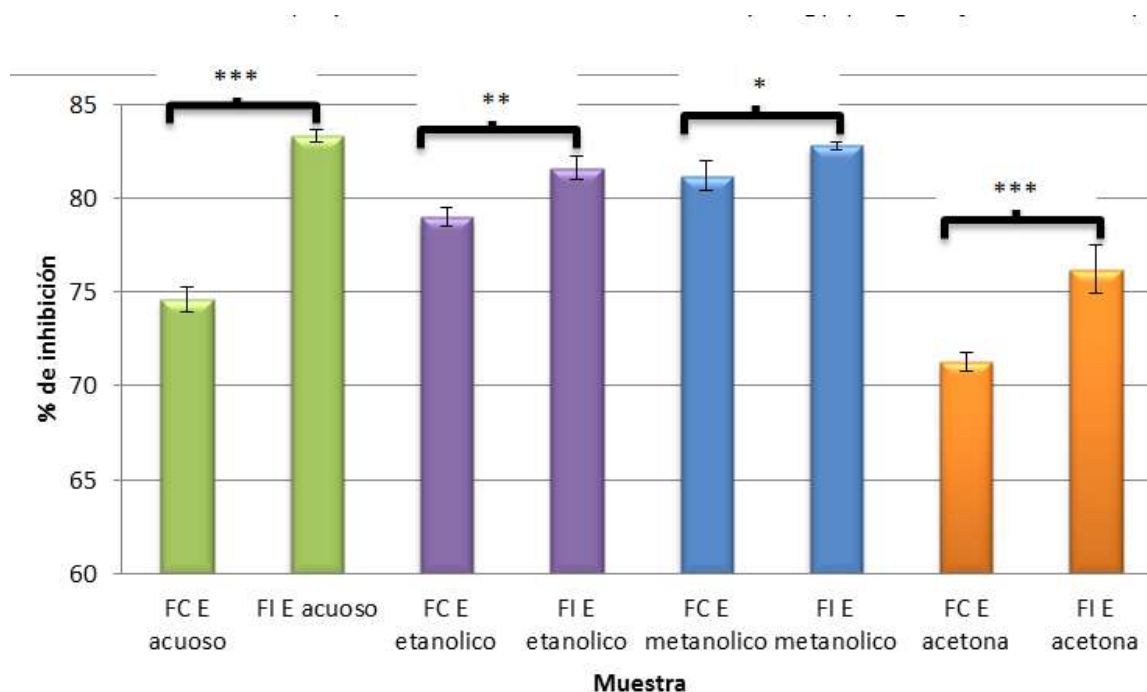


Figura 20. Porcentaje de inhibición de los diferentes extractos de fresa por el método de DPPH. Se muestran los extractos irradiados (FIE) y no irradiados (FCE). Prueba de t de student entre los dos tratamientos (* $p < 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.0001$).

La segunda técnica utilizada para evaluar la capacidad antioxidante fue FRAP (Figura 21). Los extractos de fresas irradiadas mostraron una capacidad antioxidante mayor en comparación con las fresas control. Al comparar los equivalentes de trolox/g reportados para esta variedad de fresa cultivada en los Estados Unidos se tienen valores de 150-200 $\mu\text{M ET/g}$, por lo cual podemos concluir que la irradiación incrementa de manera notable la capacidad antioxidante de la fresa, ya que el rango de nuestros extractos irradiados oscila entre 220 $\mu\text{M ET/g}$ por el aumento de los metabolitos secundarios principalmente de los compuestos fenólicos de este fruto. (BursaćKovačević y col., 2009).

De igual forma, se calcularon los resultados en porcentajes de reducción [$1 - (\text{abscontrol} - \text{abs muestra}) / \text{abs muestra} \times 100$], lo cual permite una mejor apreciación de la capacidad antioxidante de las muestras (Figura 21). Únicamente el extracto con acetona no generó quelación del hierro. Las muestras obtenidas con fresa irradiada mostraron una mayor capacidad de reducción férrica.

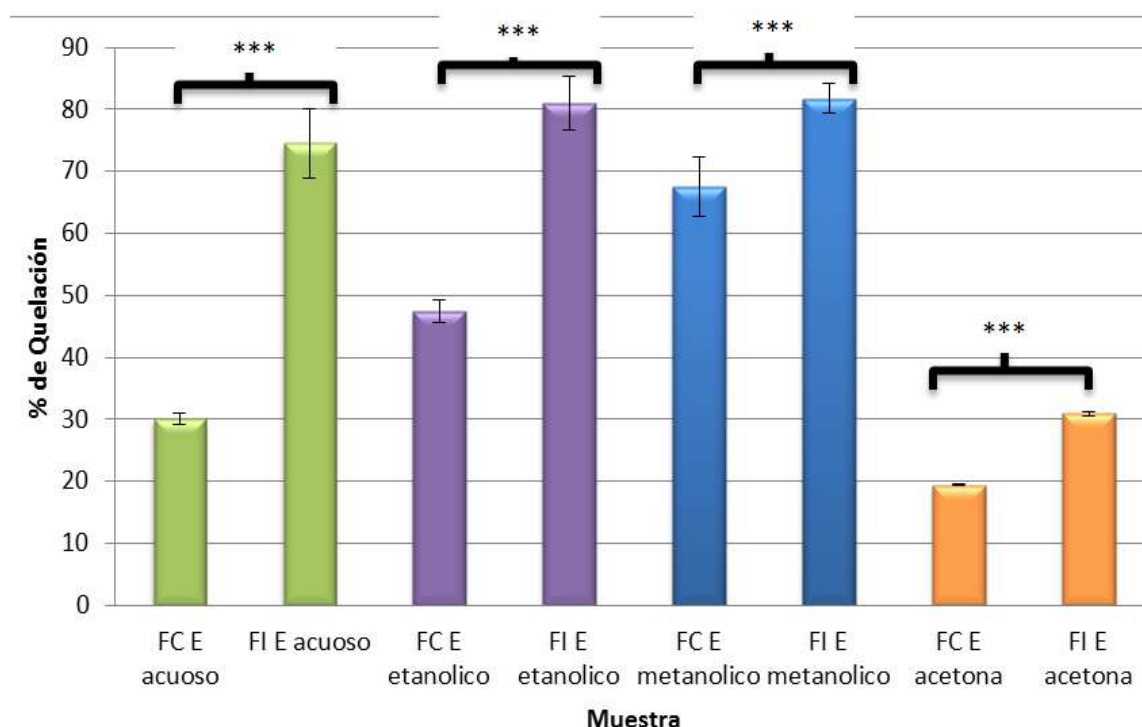


Figura 21. Porcentaje de quelación por el método de FRAP (% de Reducción del TPTZ-Fe³⁺) para los diferentes extractos de fresa. Se muestran los extractos irradiados (FIE) y no irradiados (FCE). Prueba de t de student entre los dos tratamientos (* $p < 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.0001$).

En la figura 22-A, se observa que la respuesta proliferativa es inversamente proporcional a la concentración, es decir a mayor concentración del extracto se puede ver una tendencia hacia la menor proliferación celular. Respecto al efecto sobre la proliferación de células de cáncer (Figura 22-B), el extracto de fresa irradiada en ambas líneas celulares mostró mayor efecto antiproliferativo en comparación por una post hoc de Tukey, con el extracto de fresa no irradiada. Así mismo, se puede ver que la bioactividad para promover efectos antiproliferativos en ambas líneas de cáncer es semejante. Con respecto a la figura 22-C, se

observó una mayor letalidad en las células MCF-7, al igual que una mayor sensibilidad al extracto de fresa por parte de la línea celular de Nb2 independientemente si estaba irradiada o no.

Al comparar nuestros resultados con otro estudio, donde se utiliza fresa elicitada por un sistema de cultivo probada en células de cáncer de mama (MCF-7) reporta una CI_{50} : $3.37 \pm 0,21\%$, lo cual nos sugiere que la luz ultravioleta promueve mayores efectos no solo al aumentar la biodisponibilidad sino que mejora la bioactividad de los componentes del extracto de fresa (D'Evoli y Col., 2010).

.

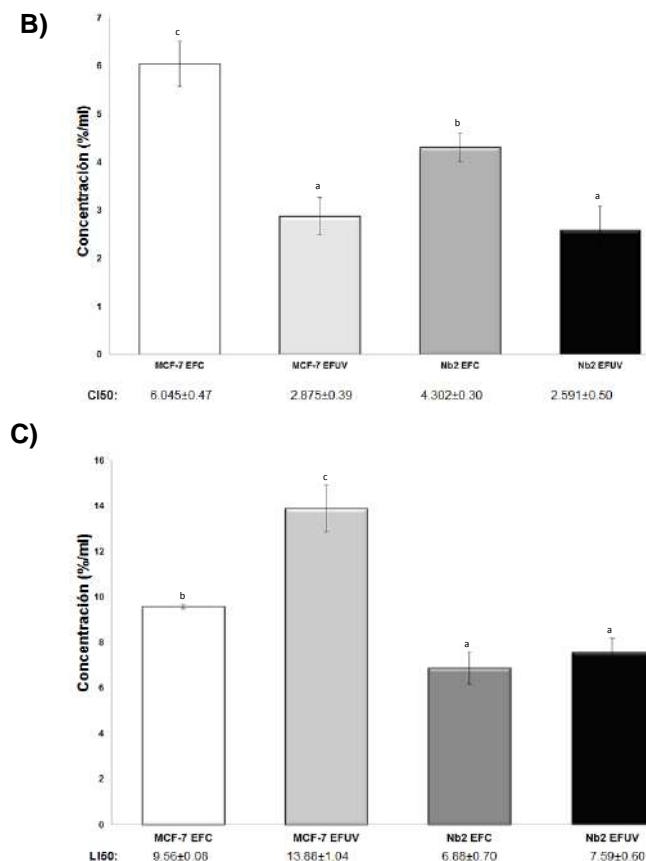
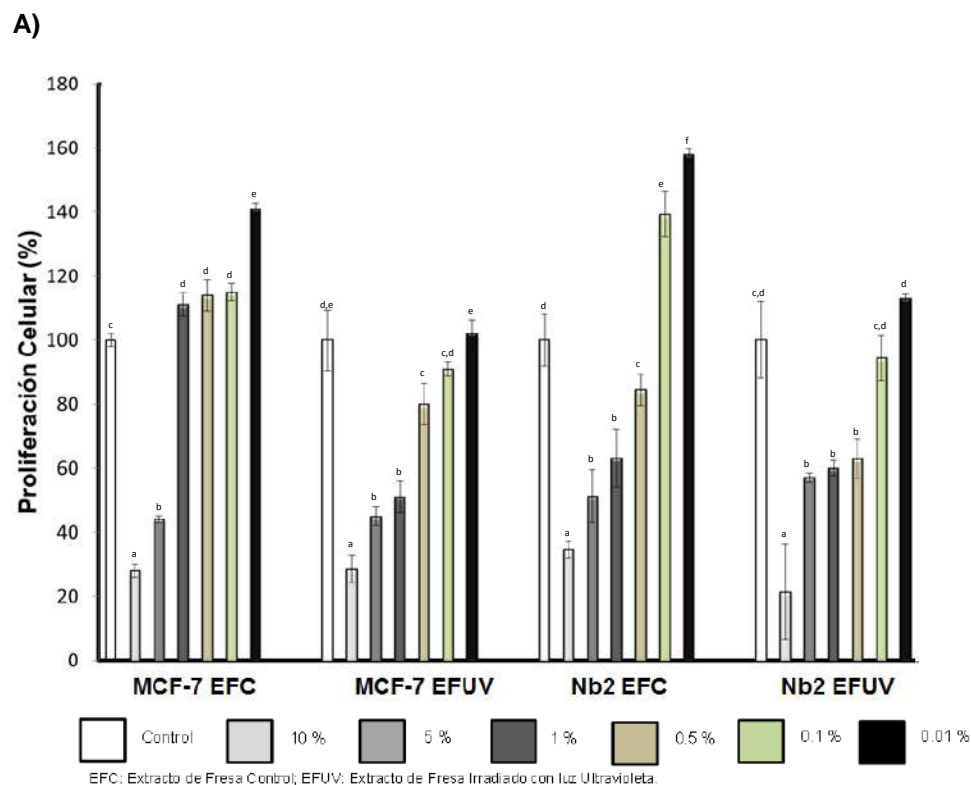


Figura 22. Efecto de los extractos de fresa sobre la proliferación celular en dos líneas de cáncer. A) Curva de dosis-respuesta para 72 hrs de tratamiento con los extractos de fresa en células de cáncer. Las células fueron sembradas (3×10^4 células/pocillo) en placas de 24 pocillos con medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) para las MCF-7 suplementado con 15% de suero fetal bovino con 1% de antibióticos y medio DMEM para Nb2 suplementado con suero de caballo 10%, suero fetal bovino al 10%, 1% de antibióticos y 1% de mercaptoetanol por 250 ml. Después de 48 h, el medio fue retirado y se añadieron las concentraciones de los extractos de fresa a diferentes concentraciones y un control de albúmina (BSA) al 0.5% con medio libre de suero. Después de 72 h, las células se contaron usando un hemocitómetro. Las letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas (Dunnett, $P \leq 0,05$) con respecto a los controles en cada caso. **B):** IC50 para las líneas de células de cancer tratadas con EFC y EFUV. IC50 se calculó por regresión lineal ambos extractos (% extracto/ml de medio). **C)** LC50 para las líneas de células de cancer tratadas con EFC y EFUV. IC50 se calculó por regresión lineal ambos extractos (% extracto/ml de medio). Las letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey, $P \leq 0,05$).

IX. CONCLUSIONES

Por los resultados anteriores, con el presente trabajo se concluye que:

El mejor solvente para extraer los fenoles totales, taninos condensados, flavonoides totales y fisetina fue el etanol, en una proporción etanol: agua de 1:1, es decir a volúmenes de 50:50%.

En el caso de antocianinas y capacidad antioxidante el mejor solvente para hacer la extracción fue el agua, en una proporción del 100%.

La irradiación mejoró el contenido de todos los compuestos fenólicos evaluados (antocianinas, taninos, fenoles y flavonoides, así como capacidad antioxidante) en la fresa.

Al aumentar el contenido de metabolitos secundarios por la irradiación se observó un aumento de la capacidad antioxidante así como su potencial anti proliferativo de la fresa en células de cáncer de mama (MCF-7) y linfoma de rata (Nb2-11). La irradiación genera una mayor bioactividad de los compuestos fenólicos provenientes de la fresa. Es importante notar que en ambos modelos de cáncer en el estudio, el extracto etanólico irradiado mostró necesitar una menor cantidad de extracto para inhibir la proliferación celular y por lo tanto una mayor letalidad en comparación con el extracto etanólico de fresa sin ser tratada.

X. PERSPECTIVAS

Es necesaria la realización de futuros estudios para profundizar los mecanismos de acción de los compuestos fenólicos provenientes de la fresa en sistemas biológicos.

Será necesario hacer énfasis en la determinación del efecto apoptótico así como el efecto de la actividad antioxidante que podría generar el incremento de metabolitos secundarios.

XI. REFERENCIAS

- Adhami, V. M., Syed, D. N., Khan, N., & Mukhtar, H. (2012). Dietary flavonoid fisetin: a novel dual inhibitor of PI3K/Akt and mTOR for prostate cancer management. *Biochemical Pharmacology*, 84(10), 1277–81.
- Almeida, R. D., Manadas, B. J., Melo, C. V, Gomes, J. R., Mendes, C. S., Grãos, M. M., Duarte, C. B. (2005). Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell death is mediated by ERK and PI3-kinase pathways. *Cell Death and Differentiation*, 12(10), 1329–43.
- Alvarez-Suarez, J. M., Dekanski, D., Ristić, S., Radonjić, N. V, Petronijević, N. D., Giampieri, F., Battino, M. (2011). Strawberry polyphenols attenuate ethanol-induced gastric lesions in rats by activation of antioxidant enzymes and attenuation of MDA increase. *PloS One*, 6(10), e25878.
- Arai, Y., Watanabe, S., Kimira, M., Shimoi, K., Mochizuki, R., & Kinae, N. (2000). Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration. *The Journal of nutrition*, 130(9), 2243–2250.
- Arróniz, C. (1945). El cultivo de la fresa en Aranjuez.
- Arteaga, C. (2003). Targeting HER1/EGFR: a molecular approach to cancer therapy. *In Seminars in oncology*, 30(3 Suppl 7), 3–14.
- Atalay, M., Gordillo, G., Roy, S., Rovin, B., Bagchi, D., Bagchi, M., & Sen, C. K. (2003). Anti-angiogenic property of edible berry in a model of hemangioma. *FEBS Letters*, 544(1), 252–257.
- Avila-Arce, A., & González-Milán, D. de J. (2012). La competitividad de las fresas (*Fragaria spp.*) mexicanas en el mercado nacional, regional y de Estados Unidos. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*, 9(1), 17–27.

- Badui Dergal, S. (2006). Química de los Alimentos. *México*: Alhambra Mexicana.
- Basu, A., Nguyen, A., Betts, N. M., & Lyons, T. J. (2014). Strawberry as a functional food: An evidence-based review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 54(6), 790–806.
- Becerra, L. V., Pimienta, H. J. (2009). Apoptosis neuronal: la diversidad de señales y de tipos celulares. *Colombia Médica*, 40(1), 124–133.
- Benedetti, S., Primiterra, M., Tagliamonte, M. C., Carnevali, A., Gianotti, A., Bordoni, A., & Canestrari, F. (2012). Counteraction of oxidative damage in the rat liver by an ancient grain (Kamut brand khorasan wheat). *Nutrition*, 28(4), 436–41.
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70–6.
- Bhat, T. a, Nambiar, D., Pal, A., Agarwal, R., & Singh, R. P. (2011). Fisetin inhibits various attributes of angiogenesis in vitro and in vivo-implications for angioprevention. *Carcinogenesis*, 33(2), 385–93.
- Brandan, M. E., & Villaseñor Navarro, Y. (2006). Detección del cáncer de mama: estado de la mamografía en México. *Cancerología*, 1(3):147– 162.
- BursaćKovačević, D., Levaj, B., & Dragovi-Uzelac, V. (2009). Free Radical scavenging activity and phenolic content in strawberry fruit and Jam. *Agriculturae Conspectus Scientificus (ACS)*, 74(3), 155–159.
- Cantos, E., Espin, J. C., Fernandez, M. J., Oliva, J., & Tomás-Barberán, F.A. (2003). Postharvest UV-C-irradiated grapes as a potential source for producing stilbene-enriched red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1208–1214.

- Carmona, R. A. (2009). *Fresa Fragaria ananassa*. Bogotá.
- Carrasco-Ríos, L. (2009). Efecto de la radiación ultravioleta-B en plantas. *Idesia(Arica)*, 27(3), 59–76.
- Chen, G., & Luo, J. (2010). Anthocyanins: are they beneficial in treating ethanol neurotoxicity? *Neurotoxicity research*, 17(1), 91–101.
- Chen, W.-S., Lee, Y.-J., Yu, Y.-C., Hsiao, C.-H., Yen, J.-H., Yu, S.-H. & Chiu, S.-J. (2010). Enhancement of p53-mutant human colorectal cancer cells radiosensitivity by flavonoid fisetin. *International Journal of Radiation Oncology, *Biology* Physics*, 77(5), 1527–35.
- Cheng, G. W, & Breen, P. J. (1991). Activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and concentrations of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit. *Journal of the American Society Horticultura Science*, 116(9476), 865–869.
- Chien, C.-S., Shen, K.-H., Huang, J.-S., Ko, S.-C., & Shih, Y.-W. (2010). Antimetastatic potential of fisetin involves inactivation of the PI3K/Akt and JNK signaling pathways with downregulation of MMP-2/9 expressions in prostate cancer PC-3 cells. *Molecular and cellular biochemistry*, 333(1-2), 169–80.
- Cho, H.-Y., Gladwell, W., Wang, X., Chorley, B., Bell, D., Reddy, S. P., & Kleeberger, S. R. (2010). Nrf2-regulated PPAR γ expression is critical to protection against acute lung injury in mice. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 182(2), 170–82.
- Chou, R.-H., Hsieh, S.-C., Yu, Y.-L., Huang, M.-H., Huang, Y.-C., & Hsieh, Y.-H. (2013). Fisetin inhibits migration and invasion of human cervical cancer cells by down-regulating urokinase plasminogen activator expression through suppressing the p38 MAPK-dependent NF- κ B signaling pathway. *PloS one*, 8(8), e71983.

CINVESTAV, (2013). Métodos para incrementar el contenido nutraceutico de frutos perocederos. MX/E/2013/069030.

Colin, D. J., Hain, K. O., Allan, L. A., Clarke, P. R., & Clarke, P. R. (2015). Cellular responses to a prolonged delay in mitosis are determined by a DNA damage response controlled by Bcl-2 family proteins. *Open biology.*, 5(3),140156.

Consejo Nacional de La Fresa (CONAFRE). (2012). *Plan rector Nacional 2012*.Michoacan.

Consejo de Salud Ocupacional (cso).(2006). *Cultivo N. 15: Fresas*. San Pedro de Poás.

Cornejo, S., Arriaga, A., Cambiasso, J., & Martinez, D. (2012). Etapas de desarrollo de cancer. Cordoba: Biologiacelular.

Cox, T., & Sinclear, J. (1998). *Biología Molecular en Medicina*. Panamericana, Ed.3ª.Madrid, España.

Creasy, L. L. (1968). The increase in phenylalanine ammonia-lyase activity in strawberry leaf disks and its correlation with flavonoid synthesis. *Phytochemistry*, 7(3), 441–446.

D'Evoli, L., Tarozzi, A., Hrelia, P., Lucarini, M., Cocchiola, M., Gabrielli, P., Lombardi-Boccia, G. (2010). Influence of cultivation system on bioactive molecules synthesis in strawberries: Spin-off on antioxidant and antiproliferative activity. *Journal of Food Science*, 75(1), C94–99.

Deeba, N. S., Vaqar, M. A., Mohammad, I. K., & Hasan, M. (2013). Inhibition of Akt/mTOR Signaling by the Dietary Flavonoid Fisetin. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry.*, 13(7), 995–1001.

- Deighton, N., Brennan, R., Finn, C., & Davies, H. V. (2000). Antioxidant properties of domesticated and wild Rubus species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(9), 1307–1313.
- Denzoin Vulcano, L. A., Soraci, A. L., & Tapia, M. O. (2013). Homeostasis del glutatión. *Bioquímica Clínica*, 47(3), 529–39.
- Deshpande, S. S., & Cheryan, M. (1987). Determination of Phenolic Compounds of dry beans using vainillin, redox and precipitation assays. *Journal of Food Science*, 52, 332–334.
- Dirzo, R. (1985). Metabolitos secundarios en plantas. *Ciencia*, 36, 137–145.
- Dominí, A. K. (2012). Mejora genética de la fresa(*Fragaria ananassa* Duch .), a través de métodos biotecnológicos. *Cultivos Tropicales*, 33(3), 34–41.
- Donley, N., & Thayer, M. J. (2012). DNA Replication timing, genome stability and cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 29(6), 997–1003.
- Doré, S. (2005). Unique properties of polyphenol stilbenes in the brain: more than direct antioxidant actions; gene/protein regulatory activity. *Neuro-Signals*, 14(1-2), 61–70.
- Duan, B., Liu, D.-S., Huang, Y., Zeng, W.-Z., Wang, X., Yu, H., Xu, T.-L. (2012). PI3-kinase/Akt pathway-regulated membrane insertion of acid-sensing ion channel 1a underlies BDNF-induced pain hypersensitivity. *The Journal of Neuroscience*, 32(18), 6351–63.
- Duthie, G. G., Gardner, P. T., & Kyle, J. M. (2003). Plant polyphenols: are they the new magic bullet? *The Proceedings of the Nutrition Society*, 62(3), 599–603.
- Ehren, J. L., & Maher, P. (2013). Concurrent regulation of the transcription factors Nrf2 and ATF4 mediates the enhancement of glutathione levels by the flavonoid fisetin. *Biochemical Pharmacology*, 85(12), 1816–26.

- Eichholz, I., Huyskens-Keil, S., Keller, A., Ulrich, D., Kroh, L. W., & Rohn, S. (2011). UV-B-induced changes of volatile metabolites and phenolic compounds in blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Food Chemistry*, 126(1), 60–64.
- Escribano-Díaz, C., Orthwein, A., Fradet-Turcotte, A., Xing, M., Young, J. T. F., Tkáč, J., Durocher, D. (2013). A Cell Cycle-Dependent Regulatory Circuit Composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP Controls DNA Repair pathway choice. *Molecular Cell*, 49(5), 872–883.
- Estrada-reyes, R., Ubaldo-suárez, D., & Araujo-escalona, A. G. (2012). Los flavonoides y el Sistema Nervioso Central. *Salud Mental*, 35(5), 375–384.
- Ezquieta, B., Santomé, J. L., Carcavilla, A., Guillén-Navarro, E., Pérez-Aytés, A., Sánchez del Pozo, J., Galbis, L. (2012). Alteraciones de los genes de la vía RAS-MAPK en 200 pacientes españoles con síndrome de Noonan y otros síndromes neurocardiofaciocutáneos. Genotipo y cardiopatía. *Revista Española de Cardiología*, 65(5), 447–455.
- Fang, F., Li, J., Pan, Q., & Huang, W. (2004). Determination of red wine flavonoids by HPLC and effect of aging. *Food Science and Nutritional of China*, 1(12), 1–15.
- Fidler, I. J. (1978). Tumor Heterogeneity and the Biology of Cancer Invasion and Metastasis Tumor Heterogeneity and the Biology of Cancer Invasion and Metastasis1. *Cancer Research*, 38(September), 2651–2660.
- Fidler, I. J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nature reviews. Cancer*, 3(6), 453–458.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2013). FAOSTAT production. Recuperado a partir de <http://faostat3.fao.org/wds/rest/table/excel>

- Fortalezas, S., Tavares, L., Pimpão, R., Tyagi, M., Pontes, V., Alves, P. M. & Santos, C. N. (2010). Antioxidant properties and neuroprotective capacity of strawberry tree fruit (*Arbutus unedo*). *Nutrients*, 2(2), 214–29.
- García-Gasca, T., Salazar-olivo, L., Mendiola-olaya, E., & Blanco-labra, A. (2002). The effects of a protease inhibitor fraction from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) on in vitro cell proliferation and cell adhesion of transformed cells. *Toxicology in Vitro*, 16, 229–233.
- Giampieri, F., Alvarez-suarez, J. M., Battino, M., Agrarie, S., Ambientali, A., Politecnica, U., & Ranieri, V. (2014). Strawberry and Human Health : Effects beyond Antioxidant Activity. *Journald of agricultural and food chemistry*.62(18), 3867-76.
- Giampieri, F., Alvarez-suarez, J. M., Tulipani, S., Gonza, A. M., Santos-buelga, C., Bompadre, S., & Battino, M. (2012). Photoprotective potential of strawberry (*Fragaria x ananassa*) extract against UV-A irradiation damage on Human Fibroblasts. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 60, 2322–2327.
- Giampieri, F., Tulipani, S., Alvarez-Suarez, J. M., Quiles, J. L., Mezzetti, B., & Battino, M. (2012). The strawberry: composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 28(1), 9–19.
- Giansanti, V., Torriglia, A., & Scovassi, a. I. (2011). Conversation between apoptosis and autophagy: Is it your turn or mine? *Apoptosis*, 16(4), 321–333.
- González-Gallego, J., Sánchez-Campos, S., & Tuñón, M. J. (2007). Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutrición Hospitalaria*, 22(3), 287–93.
- Guevara, J. (2010). Los flavonoides: mecanismo de acción, neuroprotección y efectos farmacológicos. *Mensaje Bioquímico*, 34: 143–154.

- Gutiérrez Gailen, Y., Martínez, M. M., Varona Torres, N., & Rodríguez, A. T. (2000). Validación de dos métodos espectrofotométricos para la cuantificación de Taninos y Flavonoides (Quercetina) en *Psidium Guajaba* L. *Rev Cubana Farm*, 34(1), 50–55.
- Haddad, a Q., Venkateswaran, V., Viswanathan, L., Teahan, S. J., Fleshner, N. E., & Klotz, L. H. (2006). Novel antiproliferative flavonoids induce cell cycle arrest in human prostate cancer cell lines. *Prostate cancer and prostatic diseases*, 9(1), 68–76.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57–70.
- Hanneken, A., Lin, F.-F., Johnson, J., & Maher, P. (2006). Flavonoids protect human retinal pigment epithelial cells from oxidative-stress-induced death. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 47(7), 3164–77.
- Hayes, J. D., & Pulford, D. J. (1995). The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 30(6), 445–600.
- Higa, S., Hirano, T., Kotani, M., Matsumoto, M., Fujita, A., Suemura, M., & Tanaka, T. (2003). Fisetin, a flavonol, inhibits TH2-type cytokine production by activated human basophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111(6), 1299–1306.
- Hou, D., Fukuda, M., Jhonson, J., Miyamori, K., Ushikai, M., & Fujii, M. (2001). Fisetin induces transcription of NADPH: quinone oxidoreductase gene through an antioxidant responsive element-involved activation. *Oncology*, 18, 1175–1179.
- Huang, W., Zhang, H., Liu, W., & Li, C. (2012). Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 13(2), 94–102.

- Joseph, B., Schubert, D., & Maher, P. (2009). Glutathione production is regulated via distinct pathways in stressed and non-stressed Cortical. *Brain Res.*, 4, 12–22.
- Kanazawa, K., Hashimoto, T., Yoshida, S., Sungwon, P., & Fukuda, S. (2012). Short photoirradiation induces flavonoid synthesis and increases its production in postharvest vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(17), 4359–4368.
- Kasahara, A., & Scorrano, L. (2014). Mitochondria: from cell death executioners to regulators of cell differentiation. *Trends in Cell Biology*, 1–10.
- Khan, N., Afaq, F., Khusro, F. H., Mustafa Adhami, V., Suh, Y., & Mukhtar, H. (2012). Dual inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mammalian target of rapamycin signaling in human nonsmall cell lung cancer cells by a dietary flavonoid fisetin. *International Journal of Cancer*.130(7), 1695–705.
- Khan, N., Afaq, F., Syed, D. N., & Mukhtar, H. (2008). Fisetin, a novel dietary flavonoid, causes apoptosis and cell cycle arrest in human prostate cancer LNCaP cells. *Carcinogenesis*, 29(5), 1049–1056.
- Khan, N., Afaq, F., Syed, D. N., & Mukhtar, H. (2008). Fisetin, a novel dietary flavonoid, causes apoptosis and cell cycle arrest in human prostate cancer LNCaP cells. *Carcinogenesis*, 29(5), 1049–56.
- Khan, N., Asim, M., Afaq, F., Abu Zaid, M., & Mukhtar, H. (2008). A novel dietary flavonoid fisetin inhibits androgen receptor signaling and tumor growth in athymic nude mice. *Cancer Research*, 68(20), 8555–8563.
- Khan, N., Syed, D. N., Ahmad, N., & Mukhtar, H. (2013). Fisetin: a dietary antioxidant for health promotion. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(2), 151–62.

- Kim, S.-J., Park, Y. S., Paik, H.-D., & Chang, H. I. (2011). Effect of anthocyanins on expression of matrix metalloproteinase-2 in naproxen-induced gastric ulcers. *The British Journal of Nutrition*, 106(12), 1792–801.
- Kovacsova, M., Barta, A., Parohova, J., Vrankova, S., & Pechanova, O. (2010). Neuroprotective Mechanisms of Natural Polyphenolic Compounds. *Act. Nerv Super Rediviva*, 52(3), 181–186.
- Kuntz, S., Wenzel, U., & Daniel, H. (1999). Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *European Journal of Nutrition*, 38(3), 133–142.
- Lakhani, S. a, Masud, A., Kuida, K., Porter, G. a, Booth, C. J., Mehal, W. Z., & Flavell, R. a. (2006). Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science (New York, N.Y.)*, 311(5762), 847–851.
- Lawton, M. a., Dean, S. M., Dron, M., Kooter, J. M., Kragh, K. M., Harrison, M. J., & Lamb, C. J. (1991). Silencer region of a chalcone synthase promoter contains multiple binding sites for a factor, SBF-1, closely related to GT-1. *Plant Molecular Biology*, 16(2), 235–249.
- Lee, S. E., Jeong, S. II, Yang, H., Park, C.-S., Jin, Y.-H., & Park, Y. S. (2011). Fisetin induces Nrf2-mediated HO-1 expression through PKC- δ and p38 in human umbilical vein endothelial cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112(9), 2352–60.
- Lee, W. R., Shen, S. C., Lin, H. Y., Hou, W. C., Yang, L. L., & Chen, Y. C. (2002). Wogonin and fisetin induce apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by a decrease of reactive oxygen species, and activation of caspase 3 and Ca²⁺-dependent endonuclease. *Biochemical Pharmacology*, 63(2), 225–36.

- Letenneur, L., Proust-Lima, C., Le Gouge, a, Dartigues, J. F., & Barberger-Gateau, P. (2007). Flavonoid intake and cognitive decline over a 10-year period. *American Journal of Epidemiology*, 165(12), 1364–71.
- Li, J., Cheng, Y., Qu, W., Sun, Y., Wang, Z., Wang, H., & Tian, B. (2011). Fisetin, a dietary flavonoid, induces cell cycle arrest and apoptosis through activation of p53 and inhibition of NF-kappa B pathways in bladder cancer cells. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 108(2), 84–93.
- Li, J., Zhang, D., Stoner, G. D., & Huang, C. (2013). Differential Effects of Black Raspberry and Strawberry Extracts on BaPDE-Induced Activation of Transcription Factors and Their Target Genes. *NIH Public Access*, 47(4), 286–294.
- Liao, Y.-C., Shih, Y.-W., Chao, C.-H., Lee, X.-Y., & Chiang, T.-A. (2009). Involvement of the ERK signaling pathway in fisetin reduces invasion and migration in the Human Lung Cancer Cell line A549. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(19), 8933–41.
- Lim, D. Y., & Park, J. H. Y. (2009). Induction of p53 contributes to apoptosis of HCT-116 human colon cancer cells induced by the dietary compound fisetin. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 296(5), G1060–8.
- Link, A., Balaguer, F., Shen, Y., Lozano, J. J., Leung, H.-C. E., Boland, C. R., & Goel, A. (2013). Curcumin modulates DNA methylation in colorectal cancer cells. *PloS one*, 8(2), e57709.
- Lopes da Silva, F., Escribano-bailo, M. T., Pérez Alonso, J. J., Rivas-gonzalo, J. C., & Santos-buelga, C. (2002). Anthocyanin pigments in strawberry. *European Food Research and Technology*, 214, 248–253.

- López-Lázaro, M., Willmore, E., & Austin, C. a. (2010). The dietary flavonoids myricetin and fisetin act as dual inhibitors of DNA topoisomerases I and II in cells. *Mutation Research*, 696(1), 41–7.
- Lozoya-Gloria, E., & Ayala, E. (2012). Incremento de flavonoides nutraceuticos de fresa por factores físicos. *Latinoamericana de Química*, 39, 1–383.
- Lu, X., Cho, H. J., Lee, H. S., Chun, H. S., Kwon, D. Y., & Park, Y. (2005). Fisetin inhibits the activities of cyclin-dependent kinases leading to Cell cycle arrest in HT-29 Human Colon Cancer Cells . *The Journald of Nutrition*,135(12), 2884–2890.
- Maher, P. (2009). Modulation of multiple pathways involved in the maintenance of neuronal function during aging by fisetin. *Genes & Nutrition*, 4(4), 297–307.
- Maher, P., Dargusch, R., Bodai, L., Gerard, P. E., Purcell, J. M., & Marsh, J. L. (2011). ERK activation by the polyphenols fisetin and resveratrol provides neuroprotection in multiple models of Huntington's disease. *Human Molecular Genetics*, 20(2), 261–70.
- Mähler, A., Mandel, S., Lorenz, M., Ruegg, U., Wanker, E. E., Boschmann, M., & Paul, F. (2013). Epigallocatechin-3-gallate: a useful, effective and safe clinical approach for targeted prevention and individualised treatment of neurological diseases. *The Epma j*, 4(1), 5.
- Mahmood, T., Anwar, F., Abbas, M., & Saari, N. (2012). Effect of maturity on phenolics (Phenolic acids and flavonoids) profile of strawberry cultivars and mulberry species from Pakistan. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(4), 4591–4607.
- Mareel, M., & Leroy, A. (2003). Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. *Physiological Reviews*, 83(2), 337–376.

- Maza, E. M., Moressi, M. B., Fernández, H., & Zon, M. A. (2012). Electrochemical oxidation of fisetin: Studies related to its adsorption on glassy carbon electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 675, 11–17.
- McIlwain, D. R., Berger, T., & Mak, T. W. (2013). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(4), 1–28.
- Melo, A., Monteiro, L., Lima, R. M. F., Oliveira, D. M. De, Cerqueira, M. D. De, & El-Bachá, R. S. (2011). Oxidative stress in neurodegenerative diseases: mechanisms and therapeutic perspectives. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2011, 467180.
- Menendez, D., Shatz, M., & Resnick, M. a. (2013). Interactions between the tumor suppressor p53 and immune responses. *Current Opinion in Oncology*, 25(1), 85–92.
- Miyashita, T., & Reed, J. C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, 80(2), 293–299.
- Mohar, A., Frías-Mendivil, M., Suchil-Bernal, L., Mora-Macías, T., & Garza, J. G. D. La. (1997). Epidemiología descriptiva de cáncer en el Instituto Nacional de Cancerología de México. *Salud Pública de México*, 39(4).
- Molyneux, P. (2003). The use of the stable free radical diphenylpicryl- hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journal Science Technol*, 50(12), 211–219.
- Moyano, E., Caballero, J. L., & Mun, J. (2001). Short communication a fruit-specific and developmentally regulated endopolygalacturonase gene from strawberry (*Fragaria x ananassa* cv . Chandler). *Journal of Experiental Botany*, 52(362), 1941–1945.
- Murray, N. R., Davidson, L. a, Chapkin, R. S., Clay Gustafson, W., Schattenberg, D. G., & Fields, a P. (1999). Overexpression of protein kinase C betall induces

colonic hyperproliferation and increased sensitivity to colon carcinogenesis. *The Journal of Cell Biology*, 145(4), 699–711.

Murtaza, I., Mustafa, V. adhami, Bilal, B. H., Salemm, M., & Hasan, M. (2009). Fisetin, a natural flavonoid, targets chemoresistant human pancreatic cancer AsPC-1 cells through DR3-mediated inhibition of NF-kappa B. *Int J Cancer*, 125(10), 2465–2473.

Na, H.-K., & Surh, Y.-J. (2008). Modulation of Nrf2-mediated antioxidant and detoxifying enzyme induction by the green tea polyphenol EGCG. *Food and Chemical Toxicology*, 46(4), 1271–8.

Nagai, K., Takahashi, Y., Mikami, I., Fukusima, T., Oike, H., & Kobori, M. (2009). The hydroxyflavone, fisetin, suppresses mast cell activation induced by interaction with activated T cell membranes. *British Journal of Pharmacology*, 158(3), 907–19.

Nigro, F., Ippolito, A., Lattanzio, V., Venere, D. Di, & Salerno, M. (2000). Effect of ultraviolet- C-light on postharvest decay of strawberry. *Journald of Plant Pathology*, 82(1), 29–37.

Olaharski, a J., Mondrala, S. T., & Eastmond, D. a. (2005). Chromosomal malsegregation and micronucleus induction in vitro by the DNA topoisomerase II inhibitor fisetin. *Mutation Research*, 582(1-2), 79–86.

OMS.(2013). *Cáncer*. 279. USA.Recuperado a partir de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>

OMS.(2014). *World Cancer Report*. Recuperado a partir de: <http://apps.who.int/bookorders/anglais/detart1.jsp?codlan=1&codcol=76&codch=31>

Oomah, B. D., & Mazza, G. (1996). Flavonoids and Antioxidative Activities in Buckwheat. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44(5), 1746–1750.

- Orak, H. H., Aktas, T., Yagar, H., Isbilir, S. S., Ekinci, N., & Shanin, F. H. (2011). Antioxidant activity, some nutritional and colour properties of vacuum dried strawberry tree (*Arbutus.unedo L*) fruit. *Acta Scientiarum. Polonorum*, 10(3), 327–338.
- Ozgen, M., Neil Reese, N., Tulio Jr., A. Z., SCheerens, J. C., & Miller, R. A. (2006). Modified 2 , 2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2 , 2 ' -diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(4), 1151–1157.
- Pal, H. C., Sharma, S., Elmetts, C. a, Athar, M., & Afaq, F. (2013). Fisetin inhibits growth, induces G₂ /M arrest and apoptosis of human epidermoid carcinoma A431 cells: role of mitochondrial membrane potential disruption and consequent caspases activation. *Experimental Dermatology*, 22(7), 470–5.
- Paladino, S. C., & Zuritz, C. A. (2011). Extracto de semillas de vid (*Vitis Vinifera L*) con actividad antioxidante : eficiencia de diferentes solventes en el proceso de extracción. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 43(1), 187–199.
- Pastore, S., Lulli, D., Fidanza, P., Potapovich, A. I., Kostyuk, V. a, De Luca, C., &Korkina, L. G. (2012). Plant polyphenols regulate chemokine expression and tissue repair in human keratinocytes through interaction with cytoplasmic and nuclear components of epidermal growth factor receptor system. *Antioxidants & Redox Signaling*, 16(4), 314–28.
- Pastore, S., Lulli, D., Potapovich, A. I., Fidanza, P., Kostyuk, V. a, Dellambra, E., &Korkina, L. G. (2011). Differential modulation of stress-inflammation responses by plant polyphenols in cultured normal human keratinocytes and immortalized HaCaT cells. *Journal of Dermatological Science*, 63(2), 104–14.

- Peintner, L., Dorstyn, L., Kumar, S., Aneichyk, T., Villunger, a, & Manzl, C. (2015). The tumor-modulatory effects of Caspase-2 and Pidd1 do not require the scaffold protein Raidd. *Cell Death and Differentiation*, 1–9.
- Pimentel, A. a., & Benaim, G. (2012). El Ca^{2+} y los esfingolipidos como moduladores de la apoptosis y el cáncer. *Investigacion Clinica*, 53(1), 84–110.
- Pluemsamran, T., Onkoksoong, T., & Panich, U. (2012). Caffeic acid and ferulic acid inhibit UV-A-induced matrix metalloproteinase-1 through regulation of antioxidant defense system in keratinocyte HaCaT cells. *Photochemistry and Photobiology*, 88(4), 961–8.
- Prior, R., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Agriculture Food Chemistry*, 4290–4302.
- Raha, P., Thomas, S., Thurn, K. T., Park, J., & Munster, P. N. (2015). Combined histone deacetylase inhibition and tamoxifen induces apoptosis in tamoxifen-resistant breast cancer models, by reversing Bcl-2 overexpression. *Breast Cancer Research*, 17(1), 1–16.
- Rámirez Padron, L. C. (2010). *Producción de Fresa en Zamora, Michoacán*. Colegio de Postgraduados. Recuperado a partir de [http://www.biblio.colpos.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/10521/368/Ramirez Padron_LC_MC_Economia_2010.pdf?sequence=1](http://www.biblio.colpos.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/10521/368/Ramirez_Padron_LC_MC_Economia_2010.pdf?sequence=1)
- Ravichandran, N., Suresh, G., Ramesh, B., & Siva, G. V. (2011). Fisetin, a novel flavonol attenuates benzo(a)pyrene-induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice. *Food and Chemical Toxicology*, 49(5), 1141–7.
- Reynoso-Noverón, N., & Mohar, A. (2014). El cáncer en México : propuestas para su control. *Salud Publica de Mexico*, 56(5), 2010–2012.

- Rhodes, L. E., Darby, G., Massey, K. a, Clarke, K. a, Dew, T. P., Farrar, M. D., & Nicolaou, A. (2013). Oral green tea catechin metabolites are incorporated into human skin and protect against UV radiation-induced cutaneous inflammation in association with reduced production of pro-inflammatory eicosanoid 12-hydroxyeicosatetraenoic acid. *British Journal of Nutrition*, 110(5), 891–900.
- Ruiz-García, Y., & Gómez-Plaza, E. (2013). Elicitors: A Tool for Improving Fruit Phenolic Content. *Agriculture*, 3(1), 33–52.
- Salmela, A.-L., Pouwels, J., Varis, A., Kukkonen, A. M., Toivonen, P., Halonen, P. K., & Kallio, M. J. (2009). Dietary flavonoid fisetin induces a forced exit from mitosis by targeting the mitotic spindle checkpoint. *Carcinogenesis*, 30(6),
- Sang U, H., Kelley, P., & Wen-Hwa, L. (1988). Abnormalities of the human growth hormone gene and protooncogenes in some human pituitary adenomas. *Molecular Endocrinology*, 2(1), 85–89.
- Sautter, C. K., Storck, L., Rizzatti, M. R., Mallmann, C. A., & Brackmann, A. (2008). Síntese de trans-resveratrol e controle de podridão em maçãs com uso de elicitores em pós-colheita. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43(9), 1097–1103.
- Scalbert, A., Andres-Lacueva, C., Arita, M., Kroon, P., Manach, C., Urpi-Sarda, M., & Wishart, D. (2011). Databases on food phytochemicals and their health promoting effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 4331–4348.
- Schreckinger, M. E., Lotton, J., Ann Lila, M., & Gonzalez de Mejia, E. (2010). Berries from South America: A Comprehensive Review on Chemistry, Health Potential and Commercialization. *Journal of Medicinal Food*, 13(2), 233–246.
- Sengupta, B., Banerjee, A., & Sengupta, P. K. (2004). Investigations on the binding and antioxidant properties of the plant flavonoid fisetin in model biomembranes. *FEBS letters*, 570(1-3), 77–81.

- Sengupta, B., Pahari, B., Blackmon, L., & Sengupta, P. K. (2013). Prospect of bioflavonoid fisetin as a quadruplex DNA ligand: a biophysical approach. *PloS one*, 8(6), e65383.
- Serasinghe, M. N., Missert, D. J., Ascioffa, J. J., Podgrabinska, S., Wieder, S. Y., Izadmehr, S., & Chipuk, J. E. (2014). Anti-apoptotic BCL-2 proteins govern cellular outcome following B-RAF(V600E) inhibition and can be targeted to reduce resistance. *Oncogene*, 1, 1–11.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera México. (2013). Resumen Nacional de la producción Agrícola. Recuperado a partir de http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=197
- Silvestre-Donat, F. J., & Puente Sandoval, a. (2008). Efectos adversos del tratamiento del cáncer oral. *Avances en Odontoestomatología*, 24(1), 111–21.
- Society, A. C. (2014). Cáncer de Seno (mama).
- Somasagara, R. R., Hegde, M., Chiruvella, K. K., Musini, A., Choudhary, B., & Raghavan, S. C. (2012). Extracts of strawberry fruits induce intrinsic pathway of apoptosis in breast cancer cells and inhibits tumor progression in mice. *PloS one*, 7(10), e47021.
- Soobrattee, M. a, Neergheen, V. S., Luximon-Ramma, a, Aruoma, O. I., & Bahorun, T. (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutation Research*, 579(1-2), 200–13.
- Spencer, J. P. E. (2008). Flavonoids: modulators of brain function? *British Journal of Nutrition*, 99 (E S1), ES60–77.
- Steeg, P. S. (2003). Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. *Nature reviews. Cancer*, 3(1), 55–63.

- Stoner, G. D., Wang, L.-S., & Casto, B. C. (2008). Laboratory and clinical studies of cancer chemoprevention by antioxidants in berries. *Carcinogenesis*, 29(9), 1665–74.
- Suh, Y., Afaq, F., Johnson, J. J., & Mukhtar, H. (2009). A plant flavonoid fisetin induces apoptosis in colon cancer cells by inhibition of COX2 and Wnt/EGFR/NF-kappaB-signaling pathways. *Carcinogenesis*, 30(2), 300–7.
- Suzuki, C., Takahashi, K., Hayama, S., Ishikawa, N., Kato, T., Ito, T., ... Daigo, Y. (2007). Identification of Myc-associated protein with JmjC domain as a novel therapeutic target oncogene for lung cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(2), 542–51.
- Syed, D. N., Afaq, F., Maddodi, N., Johnson, J. J., Sarfaraz, S., Ahmad, A., ... Mukhtar, H. (2011). Inhibition of human melanoma cell growth by the dietary flavonoid fisetin is associated with disruption of Wnt/ β -catenin signaling and decreased Mitf levels. *Journal of Investigative Dermatology*, 131(6), 1291–9.
- Tabas, I., & Ron, D. (2011). Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nature Cell Biology*, 13(3), 184–190.
- Teiten, M.-H., Gaascht, F., Dicato, M., & Diederich, M. (2012). Targeting the wingless signaling pathway with natural compounds as chemopreventive or chemotherapeutic agents. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13(1), 245–54.
- Tomás-Barberán, F. A. (2003). Los polifenoles de los alimentos y la salud. *Alimentación Nutrición y Salud*, 10(2), 41–53.
- Torres-Sánchez, L. E., Rojas-Martínez, R., Escamilla-Núñez, C., Vara-Salazar, E. D. L., & Lazcano-Ponce, E. (2014). Cancer mortality trends in Mexico, 1980-2011. *Salud Pública de México*, 56(5), 473-491.

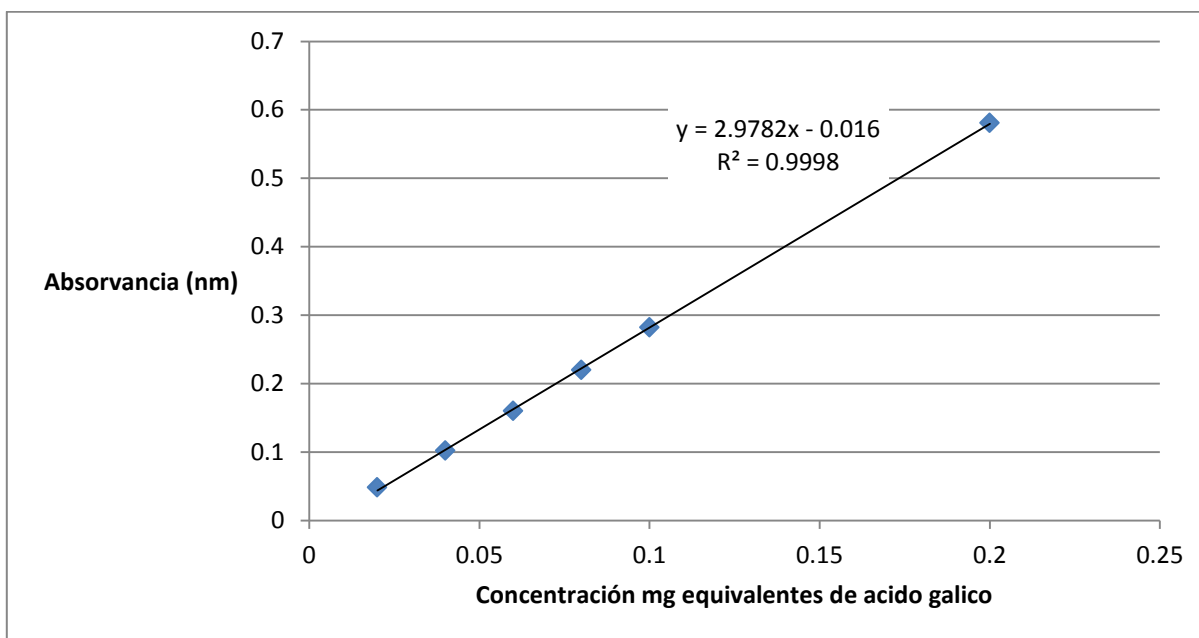
- Torroella, M., & Villa, T. S. (1998). *Bases Genéticas del Cáncer*. (Fondo de Cultura Económica, Ed.) (1^a ed.). México D.F.
- Touil, Y. S., Seguin, J., Scherman, D., & Chabot, G. G. (2011). Improved antiangiogenic and antitumour activity of the combination of the natural flavonoid fisetin and cyclophosphamide in Lewis lung carcinoma-bearing mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 68(2), 445–55.
- Townsend, D. M., & Tew, K. D. (2003). The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*, 22(47), 7369–7375.
- Vauzour, D., Rodriguez-Mateos, A., Corona, G., Oruna-Concha, M. J., & Spencer, J. P. E. (2010). Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients*, 2(11), 1106–31.
- Wang, L., Jin, F., Qin, A., Hao, Y., Dong, Y., Ge, S., & Dai, K. (2014). Targeting Notch1 signaling pathway positively affects the sensitivity of osteosarcoma to cisplatin by regulating the expression and/or activity of Caspase family. *Molecular cancer*, 13(1), 139.
- Wang, L.-S., Kuo, C.-T., Cho, S.-J., Seguin, C., Siddiqui, J., Stoner, K., & Huang, Y.-W. (2013). Black raspberry-derived anthocyanins demethylate tumor suppressor genes through the inhibition of DNMT1 and DNMT3B in colon cancer cells. *Nutrition and Cancer*, 65(1), 118–25.
- Wei, X., Li, Q., Han, Z., Lin, D., & Yu, P. (2015). Differences in caspase-8 and -9 activity and sperm motility in infertile males of Li nationality in China. *Int J Clin Exp Med*, 8(3), 4721–4726.
- Weinberg, R. a. (1991). Tumor Suppressor Genes: A Brief History of Tumor Suppressors. *Science*, 254(5035), 1130–1146.

- Wolf, B. B., & Green, D. R. (1999). Suicidal tendencies: Apoptotic cell death by caspase family proteinases. *Journal of Biological Chemistry*, 274(29), 20049–20052.
- Wright, M. E., Virtamo, J., Hartman, A. M., Pietinen, P., Edwards, B. K., Taylor, P. R., & Albanes, D. (2007). Effects of alpha-tocopherol and beta-carotene supplementation on upper aerodigestive tract cancers in a large, randomized controlled trial. *Cancer*, 109(5), 891–8.
- Yang, P.-M., Tseng, H.-H., Peng, C.-W., Chen, W.-S., & Chiu, S.-J. (2012). Dietary flavonoid fisetin targets caspase-3-deficient human breast cancer MCF-7 cells by induction of caspase-7-associated apoptosis and inhibition of autophagy. *International Journal of Oncology*, 40(2), 469–78.
- Yin, Y., Li, W., Son, Y., Sun, L., Lu, J., Kim, D., & Luo, J. (2014). Quercitrin Protects Skin from UV-B induced oxidative demange. *NIH Public Access*, 269(2), 89–99.
- Yoon, H. H., Sukov, W. R., Shi, Q., Sattler, C. a., Wiktor, A. E., Diasio, R. B., & Sinicrope, F. a. (2014). HER-2/neu gene amplification in relation to expression of HER2 and HER3 proteins in patients with esophageal adenocarcinoma. *Cancer*, 120(3), 415–424.
- Yu, S.-H., Yang, P.-M., Peng, C.-W., Yu, Y.-C., & Chiu, S.-J. (2011). Securin depletion sensitizes human colon cancer cells to fisetin-induced apoptosis. *Cancer Letters*, 300(1), 96–104.
- Zafra-Stone, S., Yasmin, T., Bagchi, M., Chatterjee, A., Vinson, J. a, & Bagchi, D. (2007). Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(6), 675–83.
- Zhang, J., Benavente, C. a., McEvoy, J., Flores-Otero, J., Ding, L., Chen, X., & Dyer, M. a. (2012). A novel retinoblastoma therapy from genomic and epigenetic analyses. *Nature*, 481(7381), 329–334.

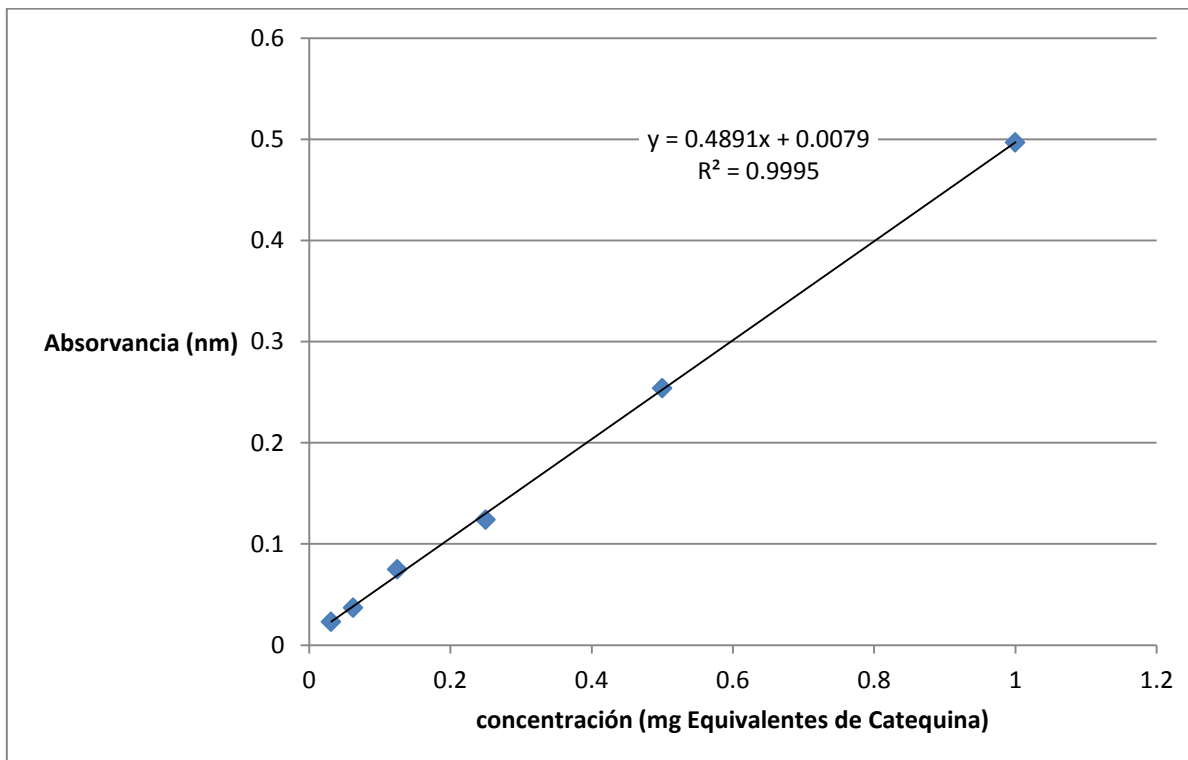
Zoratti, L., Karppinen, K., Luengo Escobar, A., Häggman, H., & Jaakola, L. (2014).
Light-controlled flavonoid biosynthesis in fruits. *Frontiers in Plant Science*, 5,
1–16.

X.II Anexos

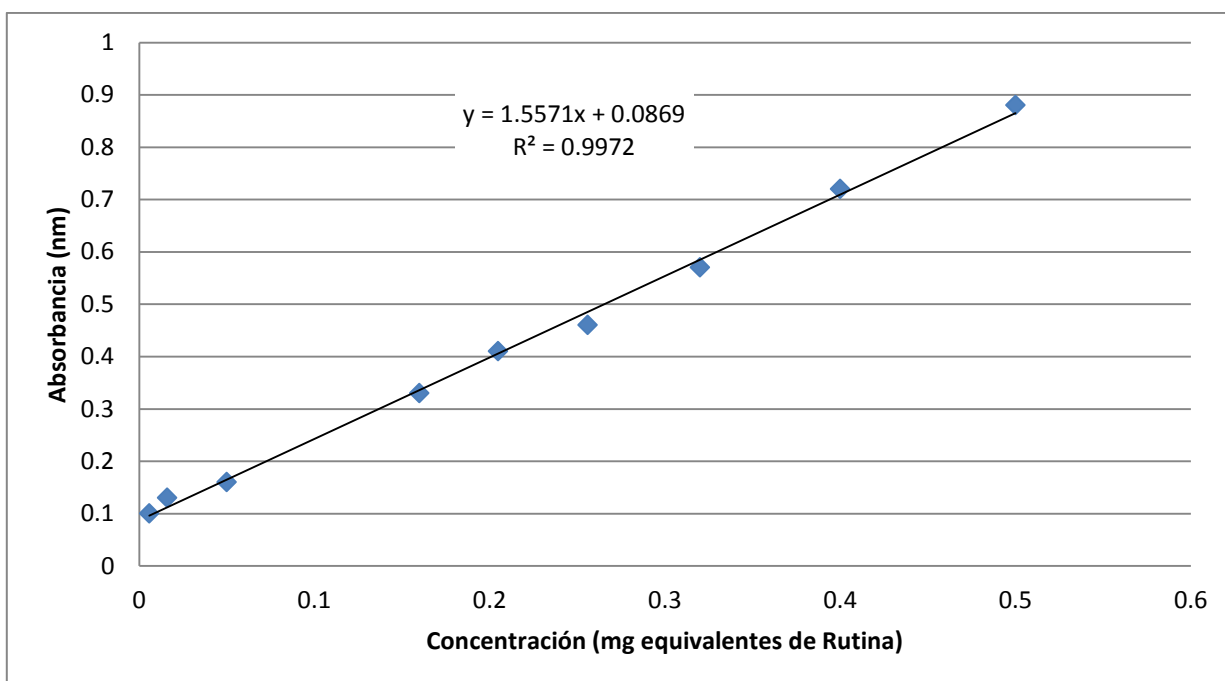
11.1.1 Curva de equivalentes de ácido gálico, para determinación de fenoles totales



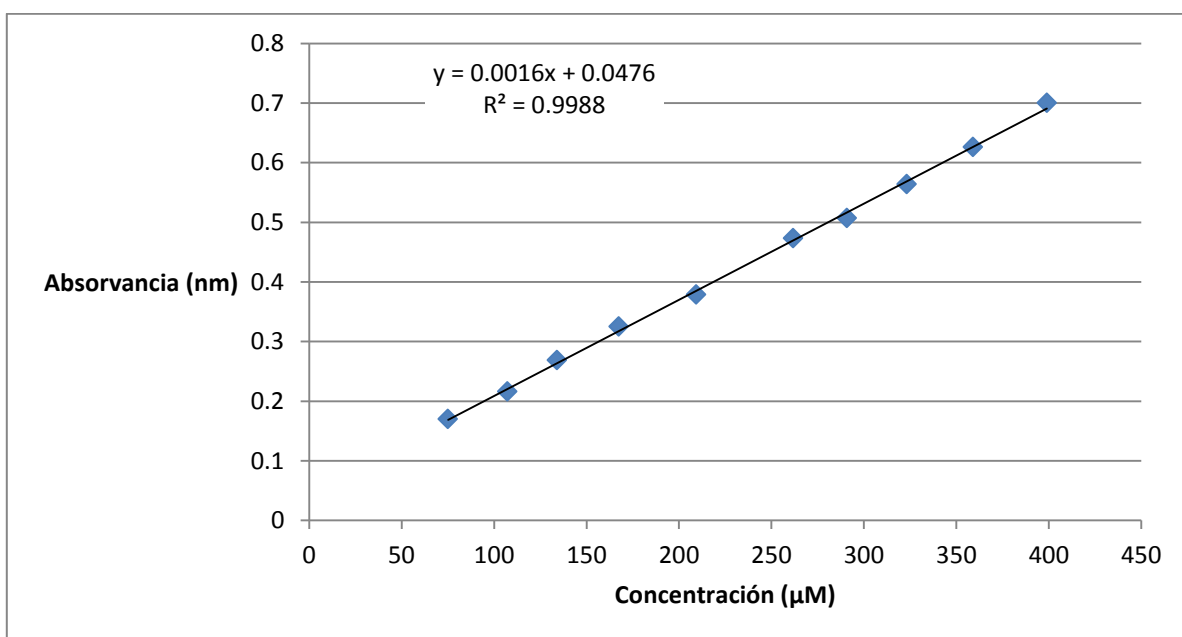
11.1.2 Curva de equivalentes de ácido catequina, para determinación de taninos condensados



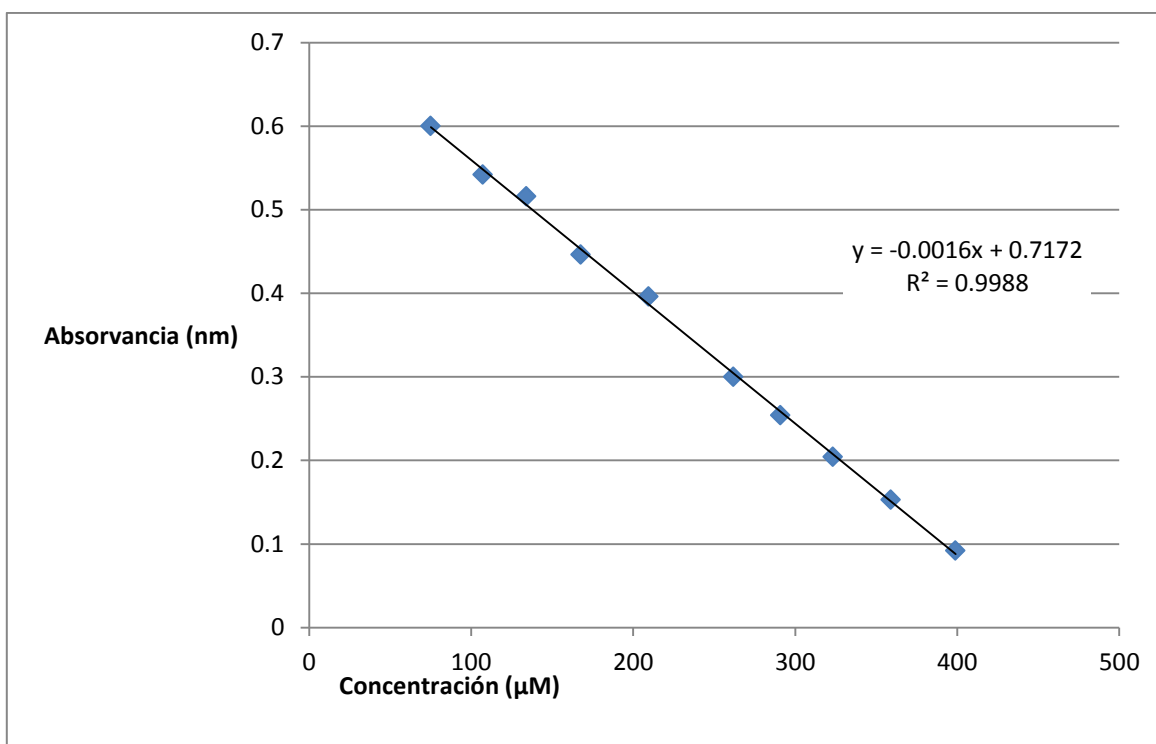
11.1.3 Curva de equivalentes de Rutina, para método de flavonoides totales



11.1.4 Curva de equivalente de Trolox, para método de FRAP



11.1.5 Curva de equivalente de Trolox, para método de DPPH.



11.2. Curva de HPLC para fisetina

