

2018 Efecto antiproliferativo de un extracto de
pasto de cebada (*Hordeum vulgare*) en modelos de
cáncer *in vitro* Paulina Jacobo Aispuro



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales

Efecto antiproliferativo de un extracto de pasto de
cebada (*Hordeum vulgare*) en modelos de cáncer *in vitro*

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencias de la Nutrición Humana

Presenta

Paulina Jacobo Aispuro

Dirigido por

Dr. Roberto Augusto Ferriz Martínez

Querétaro, Qro.

Octubre, 2018



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

Efecto antiproliferativo de un extracto de pasto de cebada (*Hordeum vulgare*) en modelos de cáncer *in vitro*

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
 Maestro en Ciencias de la Nutrición Humana

Presenta:
 Paulina Jacobo Aispuro

Dirigido por:
 Dr. Roberto Augusto Ferriz Martínez

SINODALES

Dr. Roberto Augusto Ferriz Martínez
 Presidente

Dr. Jorge Luis Chávez Servín
 Secretario

Dra. Jesica Esther Escobar Cabrera
 Vocal

Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez
 Suplente

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez
 Suplente

[Firma]
 Firma

Jorge Chávez
 Firma

[Firma]
 Firma

[Firma]
 Firma

[Firma]
 Firma

[Firma]
 Dra. Juana Elizabeth Elton Puente
 Directora de la Facultad

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

Centro Universitario
 Querétaro, Qro.
 Octubre 2018
 México

Resumen

En la actualidad se han realizado extensos estudios clínicos que han reportado las propiedades benéficas del pasto de cebada como infusión o en polvo seco, entre estos se destaca su efecto antiinflamatorio, inmunoestimulador, antioxidante y recientemente su efecto antiproliferativo. El presente trabajo desarrolla el perfil citotóxico de un extracto de pasto de cebada (EPC), de la variedad Esmeralda en células transformadas de cáncer de mama y próstata. Se realizó un extracto metanólico y liofilizado de pasto de cebada, el cual fue utilizado para la determinación de la concentración inhibitoria 50 (CI50) que fue de 100 µg/ml del liofilizado. Para el estudio de citotoxicidad se utilizaron las siguientes líneas celulares: línea celular de cáncer de próstata (PC-3), línea celular de cáncer mama (MCF-7 y MDA-MB 231), y fibroblastos humanos. Se realizó citometría de flujo de la línea celular de cáncer de próstata (PC-3) y de fibroblastos humanos con el objetivo de analizar la vía de muerte de cada una. Los resultados indican que la muerte celular es de carácter apoptótico con arresto del ciclo celular en fase S en fibroblastos humanos y G0/G1 en cáncer de próstata (PC-3), así como un alto porcentaje de activación de caspasas. Por los hallazgos descritos en este trabajo es de suma importancia para el área de investigación y desarrollo alimentario, ampliar esta evidencia *in vitro* con la finalidad de continuar con estos estudios y proveer información a escala molecular que permita entender los mecanismos utilizados por EPC y de manera futura ampliar las opciones de consumo de fitoquímicos que están disponibles y, a través de su estudio, promover la utilización y consumo óptimo de estos en forma de alimentos funcionales.

Palabras clave: Pasto de cebada, fitoquímicos, efecto antiproliferativo, cáncer, apoptosis.

Summary

Nowadays, extensive clinical studies have been carried out that have reported the beneficial properties of barley grass as an infusion or dry powder, among these its anti-inflammatory, immunostimulatory, antioxidant and recently its antiproliferative effect. The present work develops the cytotoxic profile of an extract of barley grass (EPC), of the Esmeralda variety in cells transformed from breast and prostate cancer. A methanolic and lyophilized extract of barley grass was made, which was used for the determination of the inhibitory concentration 50 (IC 50) which was 100 µg / ml of the lyophilisate. For the study of cytotoxicity, the following cell lines were used: prostate cancer cell line (PC-3), breast cancer cell line (MCF-7 and MDA-MB 231), and human fibroblasts. Flow cytometry of the prostate cancer cell line (PC-3) and human fibroblasts was performed in order to analyze the pathway of death of each one. The results indicate that cell death is apoptotic with arrest of the cell cycle in S phase in human fibroblasts and G0 / G1 in prostate cancer (PC-3), as well as a high percentage of caspase activation. Due to the findings described in this work, it is very important for the area of food research and development to expand this in vitro evidence in order to continue with these studies and provide information on a molecular scale that allows us to understand the mechanisms used by EPC and in a future, expand the options of consumption of phytochemicals that are available, and, through their study, promote the use and optimal consumption of these in the form of functional foods.

Key words: Barley grass, phytochemicals, antiproliferative effect, cancer, apoptosis.

Dedicatorias

Dedico esta tesis a Dios primeramente, ya que sin Él no estaría aquí.

A mi esposo Guillermo Peña, que con su cariño y apoyo incondicional, me ha dado la fortaleza de seguir adelante en los proyectos personales y académicos que hemos emprendido, te amo por siempre.

A mis padres José Jacobo y Reyna Aispuro, el amor que durante toda una vida me han brindado rinde frutos con este trabajo, parto de sus enseñanzas y de no soltar mi mano durante este camino.

A mis hermanos Néstor y Liliana, por su respaldo como mejores amigos y guías, ejemplos de vida, quienes me han aconsejado con sabiduría por sobre todas las cosas.

Agradecimientos

Al H. Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo brindado durante la maestría.

A mi asesor, Dr. Roberto Ferríz, que confió en mi con este proyecto y en quien encontré a un asesor, un amigo y un mentor que merece toda mi admiración y respeto.

Al equipo de laboratorio de Unidad de Investigación Genética de la Facultad de Química, en especial a la Dra. Jesica Escobar, por su valioso entrenamiento en cultivo celular y su gran calidad como persona.

Al Laboratorio de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Naturales, Dr. Jorge Luis Chávez gracias por dirigirme académicamente.

M en C Josué López, gracias por apoyarme y estar siempre al pendiente del desarrollo dentro del Laboratorio de Biología Celular.

Gracias a Ulisses Moreno por su tiempo y dirección en la etapa final de esta investigación.

A mis sinodales, por sus aportaciones durante este proyecto y durante mi desarrollo profesional.

A mis maestros, porque con cada clase me enriquecieron con su experiencia y conocimiento.

A mis compañeros de maestría, por llenar este camino con su presencia y hacerlo tiempo de calidad en todos los sentidos.

Índice

Resumen	3
Summary	4
Agradecimientos	6
Índice	7
Índice de Tablas	9
Índice de Figuras	10
I. INTRODUCCIÓN	11
II. ANTECEDENTES	12
2.1. Alimentos Funcionales	12
2.1.1. Nutracéuticos	13
2.1.2. Fitoquímicos	14
2.2. Pasto de cebada	15
2.2.1 Fitoquímicos en pasto de cebada	16
2.2.2. Usos y consumo del pasto de cebada	16
2.2.3. Antioxidantes y pasto de cebada	16
2.2.4. Actividad antioxidante en extractos naturales de origen vegetal	18
2.2.5. Capacidad antioxidante de pasto de cebada	18
2.2.6. Evaluación de efectos del pasto de cebada en la salud humana	19
3.1. Cáncer	20
3.1.1. Prevalencia de cáncer a nivel mundial.....	20
3.1.2. Prevalencia de cáncer en México	21
3.2. Definición de cáncer	23

3.2.2. Carcinogénesis	25
3.2.3. Iniciación	25
3.2.4. Promoción	26
3.2.5. Progresión.....	26
3.2.6. Tratamientos más utilizados	26
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
IV. JUSTIFICACIÓN.....	29
V. HIPÓTESIS	30
VI. OBJETIVOS.....	30
6.1. Objetivo general.....	30
6.2. Objetivos específicos	30
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
7.1. Obtención de la muestra.....	31
7.2. Extracto metanólico	31
7.3 Curva dosis-respuesta	32
7.4. Citometría de flujo.....	32
VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	33
IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
VIII. CONCLUSIONES	46
IX. LITERATURA CITADA	48

Índice de Tablas

Tabla 1. Ejemplo de clasificación de tumores de acuerdo al origen del tejido.....	24
Tabla 2. Ejemplos de clasificación de tumores de acuerdo a su origen	24
Tabla 3. Descripción de variables	34

Índice de Figuras

Figura 1. Distribución mundial de cáncer.	21
Figura 2. Distribución de mortalidad cáncer.....	22
Figura 3. Incidencia de cáncer en México.....	23
Figura 4. Descripción de variables.....	34
Figura 5. Curva dosis-respuesta sobre fibroblastos humanos, tratados con diferentes concentraciones de EPC.....	36
Figura 6. Curva dosis-respuesta sobre células PC-3, tratadas con diferentes concentraciones de EPC.....	37
Figura 7. Curva dosis- respuesta sobre células MCF-7 tratadas con diferentes concentraciones de EPC.....	37
Figura 8. Curva dosis-respuesta sobre células MDA-MB 231 tratadas con diferentes concentraciones de EPC.....	38
Figura 9. Análisis de muerte celular por apoptosis en fibroblastos humanos.....	40
Figura 10. Análisis de muerte celular por apoptosis en células PC-3.....	40
Figura 11. Análisis de ciclo celular en fibroblastos humanos.....	42
Figura 12. Análisis de ciclo celular en células PC-3.....	42
Figura 13. Análisis de activación de caspasas en fibroblastos humanos.....	43

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad la población mundial ha considerado tratamientos alternativos como una opción para prevenir o tratar algunas enfermedades crónicas no transmisibles. La fitoterapia ha adquirido gran importancia debido a la amplia utilización de plantas medicinales a lo largo de la historia; promoviendo su desarrollo e investigación clínica. El desarrollo, implementación, utilización e innovación de plantas, germinados, frutas, semillas, entre otros productos naturales con el uso sugerido por organismos internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS) a partir de la década de los noventa es ahora una estrategia para regular el uso de estos productos.

Actualmente, los efectos de los fitoquímicos en la salud humana están siendo, estudiados ampliamente debido a su presencia en los alimentos, así mismo la evidencia científica prueba en ellos un alto potencial terapéutico en distintas enfermedades crónico degenerativas, como diabetes mellitus, hipertensión, cáncer, entre otras. (Cencic y Chingwaru, 2010).

El cáncer es una enfermedad con un índice de mortalidad muy elevado, la literatura clásica define el cáncer como una enfermedad crónica no transmisible producida por alteraciones en la proliferación, diferenciación y muerte de las células. 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). Los tratamientos más utilizados para el tratamiento de cáncer se clasifican en inmunoterapias, radioterapias y quimioterapias; siendo esta última la más agresiva con mayores efectos secundarios, es por ello que la investigación actual se enfoca en desarrollar tratamientos de origen natural que si bien, no sustituyen la terapia farmacológica o química, proveen una alternativa para disminuir la aparición, síntomas, o la evolución del cáncer (Ishihara y col., 2016).

La finalidad del presente trabajo es proyectar el perfil citotóxico del pasto de cebada (*Hordeum vulgare*), de la variedad Esmeralda, ya que se han reportado propiedades nutraceuticas que abarcan mecanismos antiinflamatorios, antioxidantes y

antiproliferativos (Razo-Castro y col., 2013). Los beneficios se han presentado por Robles-Escajeda y colaboradores (2013), quienes estudiaron el pasto de cebada en forma de infusión y en extracto liofilizado, los resultados mostraron que el pasto de cebada posee actividad antiproliferativa preferencial en un panel de líneas celulares de linfoma y leucemia humana maligna en comparación con células no cancerosas. Por lo anterior, para el área de investigación y desarrollo es de suma importancia ampliar opciones de consumo de alimentos funcionales a través de su estudio, ya permite promover la utilización y consumo seguro de fitoquímicos con efectos importantes en el área de la salud.

II. ANTECEDENTES

2.1. Alimentos Funcionales

Este término fue introducido en Japón a mediados de 1980, y hace referencia a alimentos procesados que contienen ingredientes que aportan beneficios adicionales en funciones fisiológicas específicas (Nicoletti, 2012). Los alimentos funcionales son similares en aspecto a los alimentos convencionales; y se consumen como parte de la dieta normal. En contraste con los alimentos comunes, han demostrado beneficios fisiológicos y pueden reducir el riesgo de enfermedad crónica más allá de las funciones nutricias básicas, incluyendo el mantenimiento de la salud integral. Por lo tanto, los alimentos funcionales proporcionan al cuerpo la cantidad necesaria de vitaminas, lípidos, proteínas, hidratos de carbono, vitaminas, minerales o compuestos bioactivos, necesarios para una supervivencia saludable (FAO, 2007).

Entre algunos ejemplos de alimentos funcionales, destacan los alimentos que contienen determinados minerales, vitaminas, ácidos grasos o fibra alimenticia, así como alimentos a los que se han añadido sustancias biológicamente activas, como los fitoquímicos u otros antioxidantes, y los probióticos, que tienen cultivos vivos de microorganismos beneficiosos (Hernández y Hurtado, 2000).

Los alimentos funcionales pueden considerarse como alimentos o ingredientes alimentarios que tienen la salud adicional o beneficios fisiológicos por encima del valor nutricional normal que proporcionan, sin embargo, el punto central es que los nutraceuticos, productos botánicos y otros remedios herbales, incluyendo la entrada de nuevos alimentos funcionales, son importantes debido a su aceptación como forma moderna de beneficiarse de las sustancias naturales (Nicoletti, 2012).

2.1.1. Nutraceuticos

Un compuesto nutraceutico se puede definir como un suplemento dietético, presentado en una matriz no alimenticia (píldoras, cápsulas, polvo, etc.), de una sustancia natural bioactiva concentrada, presente usualmente en los alimentos y que, tomada en dosis superior a la existente en esos alimentos, presumiblemente, tiene un efecto favorable sobre la salud mayor que el que podría tener el alimento normal (Sociedad Española de Cardiología, 2000). El término "nutraceutico" fue acuñado a partir de las palabras "nutrición" y "farmaceutico" en 1989 por el Dr. Stephen De Felice, fundador y presidente de la Fundación para la Innovación en Medicina, Cranford, New Jersey. Varias sustancias de los alimentos de origen natural han sido estudiadas en terapias contra el cáncer. La vitamina E, selenio, vitamina D, el té verde, soya, y licopeno son ejemplos de nutraceuticos ampliamente estudiados en la salud humana. Así mismo, se ha encontrado que muchos de estos compuestos "naturales" tienen un alto potencial terapéutico (Cencic y Chingwaru, 2010).

Las plantas medicinales han jugado un papel importante en el área de los nutraceuticos, ya que son fuente de compuestos bioactivos que se han utilizado desde épocas ancestrales, y se siguen utilizando por el alto valor terapéutico que poseen (Lahouar y col., 2015).

El área científica que integra la genómica en la ciencia de la nutrición es la nutrigenómica. Utiliza herramientas de genómica funcional para la identificación los genes que están influenciados por componentes de los alimentos, lo que resulta en alteraciones en vías homeostáticas en un sistema biológico. Las técnicas cuantitativas para el estudio integrado o independiente de los nutrientes sobre los

cambios sutiles en la expresión génica (transcriptómica), proteínas (proteómica), o metabolitos (metabolómica) en una sola célula, así como todo el organismo han aumentado el conocimiento sobre la interacción de nutrientes-gen para ampliar la investigación nutricional profundamente (Kummar y col., 2016).

Los alimentos funcionales no dejan de ser alimentos y deben demostrar sus efectos en las cantidades que se consideren normales para su consumo en la dieta. Aunque en algunos casos, si se consumen regularmente pueden aportar la protección deseada (Hernández y Hurtado, 2000).

2.1.2. Fitoquímicos

En la década de los sesenta, la OMS como organismo rector de la salud mundial, comenzó a desarrollar conocimiento científico sobre la medicina tradicional y natural con el objetivo de alcanzar la salud para todos en el año 2000, y con esta finalidad, legalizó la medicina tradicional como principal fuente promotora de salud. Así nace el desarrollo de plantas potencialmente medicinales con técnicas de análisis a través de la Fitoquímica, estableciendo la relación estructura-actividad (Álvarez y Serrano, 2012). La presencia de fitoquímicos, ha sido considerada de crucial importancia nutricional en la prevención de enfermedades crónico-degenerativas. Los principales fitoquímicos con actividad antioxidante comprobada son: los polifenoles, los ginkólidos y los compuestos organosulfurados (Sánchez y Mendoza, 2003).

Compuestos naturales contenidos en los alimentos clasificados como fitoquímicos pueden tener propiedades anticarcinogénicas y otros beneficios referidos como quimiopreventivos. Uno de sus mecanismos predominantes en esta acción es su actividad antioxidante y, por tanto, su capacidad para estabilizar radicales libres. Los compuestos más estudiados a los que se atribuye esta actividad son vitaminas contenidas en alimentos, polifenoles de las plantas y pigmentos de los carotenoides (Yahia, 2010).

Frutas y vegetales históricamente han sido considerados fuentes de fibras y nutrientes importantes, y en los últimos años, se han reconocido como fuente de

fitoquímicos que aportan un beneficio a la salud ya sea ingeridos individualmente, o en conjunto (Stavric, 1994).

Este término también se refiere a un extracto estandarizado que es producido para contener un nivel constante de uno o más constituyentes fitoquímicos que son extraídos del producto natural que contiene un compuesto específico, todo ello, para lograr la calidad en los productos herbarios, para esto es necesario:

- Controlar el nivel de componentes bioactivos a través de la identificación y cuantificación de estos en un medicamento herbario.

- Determinar el nivel de efectividad de cada componente del fitofármaco a través de un ensayo específico.

- Asegurar que los componentes estén presentes en la cantidad deseada o estandarizada en cada producción de este fitofármaco (Asociación Norteamericana de Productores de Fitofármacos, 2012).

Los fitoquímicos en frutas y verduras pueden tener mecanismos complementarios de agentes oxidantes, la estimulación del sistema inmune, la regulación de la expresión génica en la proliferación celular y la apoptosis, metabolismo de las hormonas, y los efectos antibacterianos y antivirales (Sun y col., 2002).

2.2. Pasto de cebada

El pasto de cebada es un cereal que pertenece a la familia de las gramíneas, se le denomina pasto o hierba joven cuando su altura es de 20 a 28 cm, es el cuarto cereal más cultivado del mundo encontrándose por debajo del trigo, arroz y maíz. El 65% del cereal cultivado es utilizado como forraje, el 33% como materia prima en la elaboración de cerveza (malta) y el 2% es destinado al consumo humano (Idehen y col., 2016). Para su desarrollo óptimo basta sembrarlo con una profundidad de 30 cm, posee alta tolerancia a la salinidad y alcalinidad del suelo y se desarrolla con un pH de 6.5 a 8. El rendimiento de este cultivo es sumamente óptimo en climas semiráridos. En nuestro país, la siembra de este cereal se practica en 23 estados, y su producción en los últimos años se ha incrementado debido a las demandas nacionales e internacionales que abarca este mercado (Beltrán y col., 2011).

2.2.1 Fitoquímicos en pasto de cebada

Debido a que los fitoquímicos son metabolitos secundarios producidos por alimentos como frutas, verduras o cereales, cabe señalar que los metabolitos primarios son aquellos que están presentes en los alimentos, como hidratos de carbono, proteínas, lípidos, fibra soluble e insoluble (Sawicki y col., 2016). Los fitoquímicos que se han encontrado en el pasto de cebada pueden estar presente en tres formas: libre, conjugada y unida por medio de enlaces. Dentro de los más de 6,500 fitoquímicos identificados en extractos naturales, el pasto de cebada posee flavonoides, lignanos, ácidos fenólicos, fitoesteroles, tocoles (tocoferoles y tocotrienoles) y folatos respectivamente. La finalidad de mantener estos fitoquímicos y aumentar la biodisponibilidad de sus constituyentes es en parte, para que una vez absorbidos se metabolicen y puedan contribuir de manera sinérgica a través de vías directas mejorando efectos antiinflamatorios, antioxidantes o de antiproliferación principalmente (Okarter y Liu, 2010).

2.2.2. Usos y consumo del pasto de cebada

Está documentado que la utilización del pasto de cebada como alimento básico se remonta aproximadamente 8000 años ac., siendo utilizados por los griegos, romanos, egipcios y chinos. Esta utilización ha sido debido a sus características positivas como sustento de energía y nutrientes primarios (vitaminas, minerales, fibra, etc.). Despertando así, un especial interés en su investigación (Lahouar y col., 2015). De acuerdo a sus usos, el 65% de la producción mundial se utiliza como alimento para animales (forraje), el 33% se utiliza como materia prima en la producción de cerveza, únicamente el 2% es destinado al consumo alimentario humano (Idehen y col., 2017).

2.2.3. Antioxidantes y pasto de cebada

Los radicales libres son moléculas altamente inestables producidas en la respiración aerobia. Un radical libre se define como especie química de existencia independiente, que posee uno o más electrones desapareados en su orbital exterior

capaz de oxidar moléculas biológicas importantes como carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, infligiendo un daño importante y produciendo un desequilibrio en la cadena de transporte de electrones (Pham-Huy y col., 2008). A esta oxidación se le denomina estrés oxidativo, y puede potenciarse por factores ambientales y fisiológicos que contribuyen a aumentar la cantidad de oxidantes. Algunos ejemplos son: contaminación, radiación, consumo de ciertas drogas, humo de cigarrillos, consumo excesivo de alcohol, isquemia, infecciones, estrés físico o mental y envejecimiento (Galano y col., 2016).

Las especies reactivas son tanto de oxígeno como de nitrógeno y pueden ser producto del estrés del retículo endoplásmico, el plegamiento de proteínas y la degradación mediada por proteasoma. Las mitocondrias son poderosas máquinas de reacciones redox; por lo tanto, pueden producir compuestos tóxicos (como ácido sulfhídrico, peroxinitrito y nitrato). (Bjørklund y Chirumbolo, 2016)

Los antioxidantes pueden ser producidos endógenamente o adquiridos a partir de alimentos, o suplementos dietéticos. Algunos ejemplos de antioxidantes químicos endógenos son melatonina, coenzima Q10, glutatión y ácidos lipoicos; sin embargo, algunos de ellos también pueden estar involucrados en el sistema de defensa enzimática. Los antioxidantes químicos exógenos vienen de numerosas fuentes, que pueden ser clasificadas como naturales o sintéticas dependiendo de cómo se producen. Los antioxidantes químicos son especies que ofrecen protección contra el estrés oxidativo por métodos no enzimáticos y han demostrado ser útiles en la prevención y el tratamiento de numerosos trastornos de salud (Galano y col., 2016). El pasto de cebada se promueve como fuente de antioxidantes, reconociéndose entre estos la o-glicosil isovitexina, la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la vitamina E, la vitamina C y los carotenoides (Paulíčková y col., 2007). Contiene cantidades significativas de calcio, cobre, hierro, magnesio, potasio, zinc, β -caroteno, folato, ácido pantoténico, vitaminas B1, B2, B6, C, E y clorofila. Sin embargo, el contenido de nutrientes de todas las variedades de cebada depende del lugar de cultivo, de la calidad del suelo, de la precipitación media y de la técnica de cosecha (Droushiotis, 1984).

Los antioxidantes exógenos proporcionados por la dieta habitual, son una fuente muy utilizada por la población actualmente, puesto que proveen la capacidad de neutralizar radicales libres, sin embargo, el sistema de radicales libres no debe eliminarse completamente, pues es necesario en pasos intermedios de reacciones bioquímicas metabólicas (Mejía, 2010).

2.2.4. Actividad antioxidante en extractos naturales de origen vegetal

Estudios preclínicos y epidemiológicos han encontrado una asociación inversa entre efectos protectores de plantas sobre diversas complicaciones y estas plantas son ricas en fitoquímicos con actividad antioxidante como los polifenoles (Nasri y col., 2014). Los métodos de determinación de la actividad antioxidante se basan en comprobar que un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable, daño que es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante. Esta inhibición es proporcional a la actividad antioxidante del compuesto o muestra. Los distintos métodos difieren en el agente oxidante, en el sustrato empleado y la técnica utilizada, así como en las posibles interacciones de la muestra con el medio de reacción (Frankel and Meyer, 2000). El mecanismo por el cual los antioxidantes naturales pueden contribuir a prevenir enfermedades relacionadas con estrés oxidativo no es muy claro, sin embargo este efecto funciona como parte de redes elaboradas de actividad sinérgica entre ellos, lo que puede mejorar la respuesta al tratamiento en pacientes con enfermedades crónicas existentes (Rafeian y col., 2013).

2.2.5. Capacidad antioxidante de pasto de cebada

La capacidad antioxidante se define como uno o más sistemas que retrasan la autoxidación inhibiendo la formación de radicales libres o interrumpiendo la propagación del radical libre por uno o más mecanismos, principalmente por medio de especies depuradoras que inician la peroxidación, o mediante metales quelantes. Estos son capaces de extinguir la oxidación de O₂, prevenir la formación de peróxidos, romper la reacción en cadena oxidativa o reducir las concentraciones de O₂ localizadas (Brewer, 2011).

Ejemplos de radicales libres de oxígeno, conocidos como especies reactivas de oxígeno (ROS), incluyen iones superóxido (O_2^-), hidroxilo (OH^-), peroxilo (ROO^-), alcoxilo (RO^-) y óxido nítrico (NO). Los radicales hidroxilos (vida media 10^{-9} s) y alcoxilo (semivida de segundos) son muy reactivos y atacan rápidamente las moléculas en células cercanas. Probablemente el daño causado por ellas es inevitable y es tratado por reparación. Además de esos radicales, en los organismos vivos hay otros no radicales, tales como el oxígeno (O_2), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y ácido hipocloroso (HOCl) (Murray y col., 2015).

La actividad antioxidante se lleva a cabo mediante una transición redox, a través de la cual la molécula antioxidante libera un átomo de hidrógeno que puede ser captado por un radical libre, o permitiendo la formación de ligandos que faciliten la quelación de iones metálicos (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) y la interacción con enzimas. Los flavonoides y ácidos fenólicos tienen la propiedad de interceptar y reaccionar con agentes oxidantes como enzimas, metales y radicales libres (Vargas y col. 2013).

Las especies reactivas de oxígeno y otros radicales libres se producen en el metabolismo aeróbico en las células de manera natural, sin embargo, un balance redox intracelular es de suma importancia para asegurar la viabilidad, el crecimiento y las funciones celulares (Ugartondo, 2009).

La capacidad antioxidante evaluada *in vitro* puede usarse como un indicador indirecto de la actividad *in vivo*. La mayoría de los métodos para determinar capacidad antioxidante consisten en acelerar la oxidación en un sistema biológico. En un producto alimenticio, esta capacidad está determinada por interacciones entre diferentes compuestos con diferentes mecanismos de acción. Por esto mismo, la determinación de la capacidad antioxidante de extractos complejos se lleva a cabo usualmente por diferentes métodos complementarios, que evalúen diversos mecanismos de acción (Mercado y col., 2013).

2.2.6. Evaluación de efectos del pasto de cebada en la salud humana

El cultivo celular se ha establecido para estandarizar e implementar procedimientos que permitan entender mecanismos celulares. Tiene como finalidad seguir rigurosamente un método estandarizado para conocer las condiciones bajo las

cuales actúa un compuesto de interés, representando así, el punto de partida para aplicaciones técnico-científicas en el área de la salud (Salazar, 2009).

El pasto de cebada y sus compuestos bioactivos incluyen actividades antioxidantes e inmunomoduladoras que se asocian con la prevención de aparición de cáncer. La mayoría de los estudios sobre la quimioprevención de la carcinogénesis por la cebada han sido en un modelo *in vitro* y han involucrado principalmente el efecto de la fibra contenida en el cereal, especialmente el β -glucano (Idehen y col., 2017).

El β -glucano es la fibra soluble más abundante que se ha encontrado en avena y cebada, también se han encontrado compuestos fenólicos, tocoles, esteroides, todos ellos compuestos bioactivos a los que se les ha atribuido un efecto cooperativo entre esta fibra y estos fitoquímicos. Los fitoquímicos que se metabolizan en el cuerpo pueden contribuir a través de vías directas y sinérgicas para impactar en la salud a través de efectos antiinflamatorios, antioxidantes y antiproliferativos (Sawick y col., 2016). Después de identificar y comprobar que los fitoquímicos tienen efectos reguladores sobre el ciclo celular de un proceso tumoral, cada vez existe más aceptación de que las plantas son recursos importantes para la síntesis de fármacos anticancerígenos, puesto que las especies de plantas han sido utilizados desde tiempos antiguos y hoy en día es una tendencia la evaluación de sus efectos debido al aumento de la incidencia de cáncer (Bahmani y col., 2017).

3.1. Cáncer

3.1.1. Prevalencia de cáncer a nivel mundial

La estadística actual del cáncer, representa y describe lo que ocurre en grandes grupos de personas y ofrece una imagen a través del tiempo de una tendencia para medir y controlar factores que permitan ampliar su estudio.

Según National Cancer Institute, se prevé que, en este año, los cánceres con más incidencia a nivel mundial sean: cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de colon y recto, cáncer de vejiga, melanoma de piel, linfoma no Hodgkin, cáncer de tiroides, cáncer de riñón y pelvis renal, leucemia, cáncer de endometrio y cáncer de páncreas. De acuerdo a esta tendencia, el número de casos

nuevos aumentará a 22 millones en las siguientes 2 décadas, ya que no es una enfermedad exclusiva del adulto. En 2014, se estimó que 15,780 niños y adolescentes de 0 a 19 años recibieron un diagnóstico de cáncer y 1960 murieron por la enfermedad solamente en Estados Unidos (National Cancer Institute, 2015) Siguiendo datos de la OMS en el Informe mundial sobre el cáncer en 2014, los cánceres diagnosticados con más frecuencia en hombres fueron los de pulmón, próstata, colon y recto, estómago e hígado; y en mujeres fueron los de mama, colon y recto, pulmón, cuello uterino y estómago. Más del 60% de los nuevos casos anuales totales del mundo se producen en África, Asia, América Central y Sudamérica y estas regiones representan el 70% de las muertes por cáncer en el mundo (OMS, 2014).

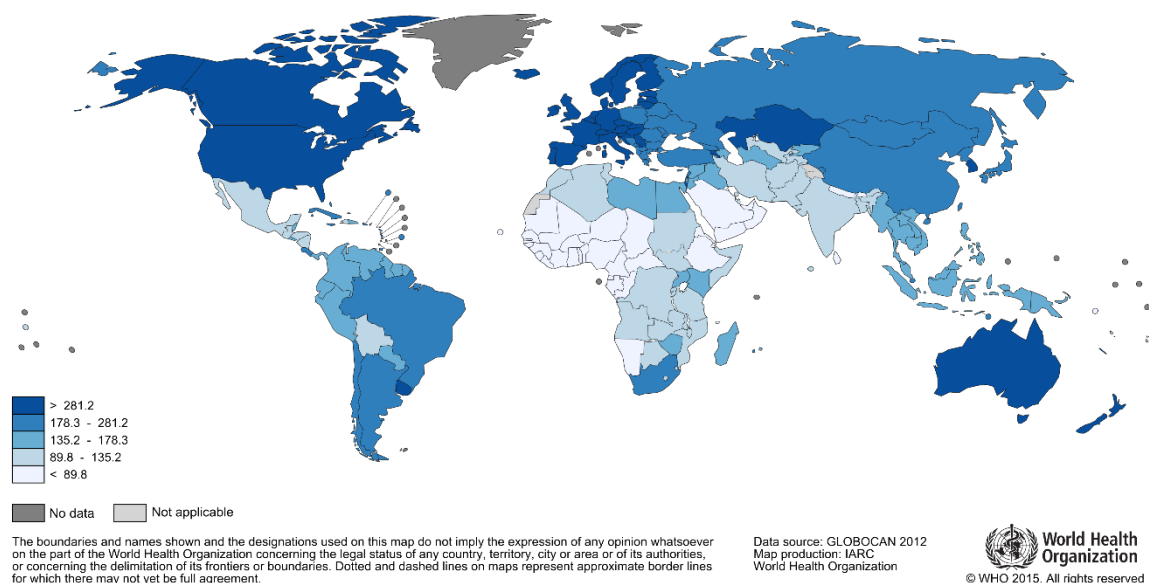


Figura 1. Distribución mundial de cáncer.

Fuente: Globocan, 2012.

3.1.2. Prevalencia de cáncer en México

En la región americana se registraron 2.8 millones de casos nuevos y 1,3 millones de muertes a consecuencia del cáncer, en el 2012. Las proyecciones indican que el número de muertes por cáncer en América aumentará de 1,3 millones en el 2012

hasta 2,1 millones en el 2030. Este aumento se debe principalmente al crecimiento y envejecimiento de la población y al cambio en los estilos de vida. Los países de bajos y medianos ingresos serán los que sufran un mayor aumento de los casos de cáncer si no se reduce la exposición a los factores de riesgo. Entre el 2012 y el 2030, se espera que el número de casos nuevos de cáncer se incremente en un 67% en América Latina y el Caribe, aumento superior al esperado en Norteamérica (41%). El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres en Norteamérica, mientras que el cáncer cervicouterino es uno de los tipos de cáncer con una mayor mortalidad en mujeres en Centroamérica; el cáncer de estómago es la quinta causa de mortalidad por cáncer en ambos sexos en América Latina y el Caribe, mientras que en Norteamérica este no figura entre las primeras 15 causas de mortalidad por cáncer (Portal for International Cancer Research: Cancer Epidemiology and Genetic Database, 2012).

En los Estados Unidos Mexicanos, la incidencia de cáncer sigue el patrón internacional y según el Centro Internacional de Investigadores sobre el Cáncer, la supervivencia a este padecimiento difiere alrededor del mundo, sin embargo, se observa el aumento significativo de tal cifra en países

México

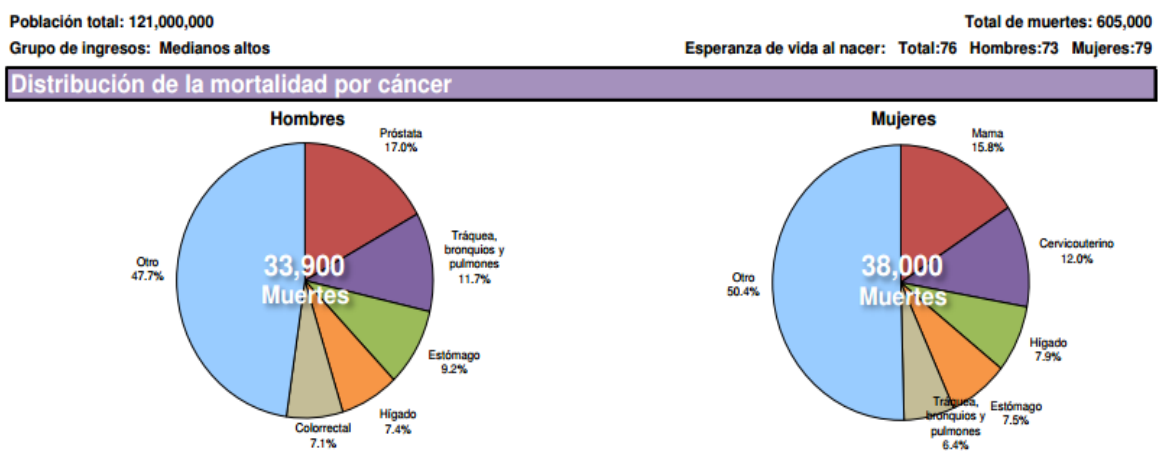


Figura 2. Distribución de mortalidad por cáncer. Perfiles Oncológicos de la OMS, 2012.

Incidencia de cáncer

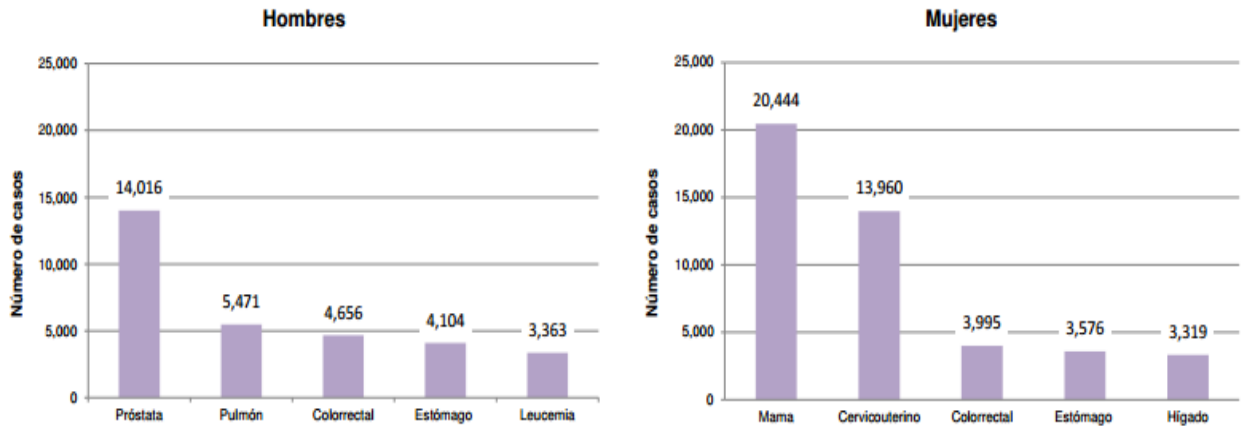


Figura 3. Incidencia de cáncer en México. Perfiles Oncológicos de la OMS, 2012.

3.2. Definición de cáncer

El cáncer se define como una enfermedad crónica 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 Sinclair, 1998). El cáncer es un conjunto de enfermedades crónicas no transmisibles, que se caracteriza por alcanzar una alta concentración celular, y aun cuando su causa no pueda ser identificada precisamente, todavía resulta posible deducir que el proceso de carcinogénesis se extiende sobre determinados periodos de tiempo. Así mismo, esta multiplicación celular descontrolada de células anormales tienen velocidades de crecimiento más rápidas, razón por la cual, puede avanzar desde un tumor localizado confinado a su zona de origen, por invasión directa o por metástasis a través del sistema linfático. El cáncer puede comenzar casi en cualquier tejido, incluida la sangre, y solamente el diagnóstico precoz aumenta las posibilidades de mejorar el pronóstico (Encyclopaedia Britannica of Cancer, 2011).

3.2.1. Clasificación de cáncer

Los tumores se dividen en dos grupos principales según su comportamiento: benignos y malignos, y, esta clasificación depende de tres características básicas: que el tumor se mantenga localizado, que la extirpación pueda realizarse con cirugía local, y, por último, su capacidad de diseminación (Robbins y col., 2015).

Según el origen y el comportamiento biológico del tumor, así como su histogénesis, se citan algunos ejemplos de clasificación y nomenclatura de tumores:

Tabla 1. Ejemplo de clasificación de tumores de acuerdo al origen del tejido.
Adaptado de: Zicre 2012.

Célula o Tejido de origen	Benigno (sufijo oma)	Maligno (sufijo sarcoma)
Tejido Fibroso	Fibroma	Fibrosarcoma
Tejido Adiposo	Lipoma	Liposarcoma
Tejido Cartilaginoso	Condroma	Condrosarcoma
Tejido Óseo	Osteoma	Osteosarcoma
Tejido Muscular Liso	Leiomioma	Leiomiomasarcoma
Tejido Muscular Estriado	Rabdomioma	Rabdomiosarcoma
Vasos Sanguíneos	Angioma	Angiosarcoma
Vasos Linfáticos	Linfangioma	Linfangiosarcoma

Tabla 2. Ejemplos de clasificación de tumores de acuerdo a su origen
Adaptado de: Zicre 2012.

Origen	Benigno	Maligno
Glándula Tiroides	Adenoma	Adenocarcinoma
Epitelio Gástrico	Adenoma	Adenocarcinoma
Epitelio Esofágico	Papiloma escamoso	Carcinoma escamoso
Epitelio Vesical	Papiloma transicional	Carcinoma transicional
Células Hepáticas	Adenoma	Carcinoma hepatocelular
Melanocitos	Nevus	Melanoma

3.2.2. Carcinogénesis

La estructura de las células tumorales es extremadamente variable, y la consecuencia es un desequilibrio entre la masiva división celular no compensada por la pérdida o la muerte celular, que da lugar a la aparición de masas de células que dañan los tejidos y órganos del hospedador, conociéndose esto como carcinogénesis (Planas y col., 2010).

Este mecanismo se desencadena cuando ocurre un estímulo anómalo hacia la célula (DNA), que produce cambios en los genes y consiguiente activación de oncogenes ya sea por radiación ionizante (rayos X, gamma), por radiación no ionizante (rayos UV), agentes químicos exógenos (agentes alquilantes, bleomicina) y agentes químicos endógenos (especies reactivas de oxígeno). Estos procesos dan como resultado un producto anormal del gen (oncoproteína), y comienza la producción inapropiada de proteínas estructuralmente normales promotoras del crecimiento (Villaseñor y Martínez, 2009).

La carcinogénesis un proceso dinámico en el que intervienen un gran número de variables y se divide en distintos estadios temporales y espaciales. Este proceso se divide en tres etapas principales denominadas: iniciación, promoción y progresión (Planas y col., 2010).

El proceso de carcinogénesis requiere eventos específicos y cruciales tales como inestabilidad genómica, desregulación del ciclo celular, inducción de mecanismos de mantenimiento de longitud de telómeros, entre otros (Burnworth y col., 2007). Consta de 3 etapas principalmente: iniciación, promoción y progresión, que se describen a continuación.

3.2.3. Iniciación

Proceso por el cual el daño crítico del ADN en la célula se vuelve permanente, debido a que esta se divide antes de su reparación, o bien, por un fallo en este proceso (Rubin y col, 2003). Ocurre a nivel del genoma y las alteraciones pueden darse en los tumores benignos y malignos. Los agentes que

actúan en la primera etapa pueden ser físicos, químicos o virales (Instituto Nacional de Salud Pública, 2011).

3.2.4. Promoción

Si sobre las células iniciadas actúan de nuevo y de forma repetida los agentes carcinógenos, la multiplicación celular comienza a ser más rápida y la probabilidad de que se produzcan nuevas mutaciones aumenta (Asociación Española Contra el Cáncer, 2016). Esta etapa representa el crecimiento tisular con la formación del tumor. Participan los factores de crecimiento y los receptores a estos factores de crecimiento, así como también la angiogénesis y degradación de las matrices extracelulares (Instituto Nacional de Salud Pública, 2011).

3.2.5. Progresión

Por último, las células iniciadas y promocionadas sufren nuevas mutaciones y cada vez se hacen más anómalas en su crecimiento y comportamiento. Adquieren la capacidad de invasión, tanto a nivel local infiltrando los tejidos de alrededor, como a distancia, originando las metástasis. La progresión implica la capacidad de invadir tejidos vecinos o a distancia, por parte de la célula tumoral maligna. Esa capacidad está codificada también en los genes de la misma con modificaciones estructurales y funcionales (Instituto Nacional de Salud Pública, 2011).

3.2.6. Tratamientos más utilizados

Dentro de los tratamientos para tratar el cáncer se requieren consideraciones específicas de acuerdo al estadio y tipo del neoplasia. Cuando esta se encuentra localizada y es de tamaño pequeño la cirugía combinada con radioterapia es de buen pronóstico. Por otra parte, la quimioterapia puede ser eficaz si se aplica desde con diagnóstico oportuno, es por ello que se selecciona de manera cuidadosa el tratamiento principal, que abarca la cirugía, radioterapia y el tratamiento sistémico respectivamente (National Cancer Institute, 2016).

Con base a ejemplos bien estudiados, cada clase de carcinógeno actúa acelerando algunos de los pasos en la producción celular (Cairns y col., 1991).

Un tumor o conjunto de tumores que se adhieren a cualquier parte donde crecen de forma pertinaz; pueden invadir y destruir estructuras adyacentes, así como extenderse a zonas alejadas (metástasis). Por otro lado, los trastornos hematológicos malignos (leucemia) ocurren cuando la proliferación y desarrollo anormal de leucocitos, sus precursores en la sangre y la médula ósea comprometen a cualquiera de los subgrupos de leucocitos, a los leucocitos polimorfonucleares, a los linfocitos o a los monocitos; y la hematopoyesis normal se encuentra suprimida. Causando un daño en la médula ósea y disminuyendo el recuento de células sanguíneas (Lindhe y col., 2008).

Las células de los tejidos de los organismos vivos usualmente se dividen con cierto ritmo característico sustituyendo a las células que mueren, manteniendo así un equilibrio. En el caso de los tumores, las células escapan a la acción de los factores que controlan la mitosis, reproduciéndose en exceso y ocasionando un daño orgánico. Los tumores se diferencian entre sí no solo por la histogénesis, sino también por la estructura, modo de crecimiento y grado de patogenicidad, sin embargo, comparten algunas características comunes como la proveniencia de células preexistentes en el organismo o crecimiento atípico y sin causa aparente; y una de las características más importantes del cáncer es la capacidad para una proliferación celular aumentada. Esta propiedad puede ser causada por factores físicos, químicos, genéticos o biológicos. Existen distintas formas en que se presenta la enfermedad, pero su fisiopatología básica comprende alteraciones en cualquier punto de la maquinaria molecular que gobierna al ciclo celular (Golias y col., 2004). Para utilizar un tratamiento específico se requiere una evaluación sobre el tumor o tipo de cáncer y posteriormente la elección de un tratamiento, la radiación consiste en la destrucción o daño a las células cancerosas para impedir su crecimiento. Actualmente existen implantes radioactivos que se colocan en el interior del cuerpo en pequeños contenedores dentro o cerca del tumor, lo cual minimiza el área de radiación a la cual puede aplicarse menor dosis. La quimioterapia es otro mecanismo en el cual de manera intravenosa se administra uno o más medicamentos para alcanzar de manera sistémica las células con cáncer

o bien, reducir el tamaño del tumor ya existente. Por último, otra alternativa para tratar el cáncer es la terapia biológica o inmunoterapia, la cual consiste en utilizar el sistema inmunológico para potenciar el efecto de la terapia seleccionada y así disminuir los efectos secundarios (American cancer society, 2015).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La muerte celular es esencial para el desarrollo, la homeostasis de los tejidos y la inmunidad. Poca apoptosis puede promover cáncer y enfermedades autoinmunes; demasiada apoptosis puede aumentar las condiciones isquémicas y conducir la neurodegeneración (Czabotar y col., 2014). Es por ello que las proteínas pro y anti apoptóticas en un sistema biológico, están especialmente equilibradas, pero existen numerosos agentes o factores que alteran este equilibrio, por lo que, uno de los principales objetivos del tratamiento del cáncer, es inducir a las células cancerosas a apoptosis y, por tanto, disminuir la masa tumoral o su propia progresión (Cunningham y You., 2015). Con base a lo anterior, se han descrito beneficios que el pasto de cebada tiene en el campo de la medicina tradicional o naturista como quimiopreventivo, sin embargo, se requieren estudios que sustenten con pruebas científicas la efectividad como tratamiento coadyuvante en el tratamiento de enfermedades crónicas no transmisibles, así como el mecanismo de acción de este producto en enfermedades tales como el cáncer. Los estudios que existen en la actualidad sobre el efecto del pasto de cebada en esta patología son escasos y poco descritos, por ello la importancia de ampliar esta evidencia y conocimiento sobre los efectos de este en la salud humana y la importancia que puede adquirir su avance en ciencia básica.

IV. JUSTIFICACIÓN

Debido a la importancia que ha adquirido el conocimiento de las funciones e implicaciones de los fitoquímicos contenidos en alimentos vegetales y sus efectos positivos en enfermedades crónicas no transmisibles, el caso del pasto de cebada no es excepción, puesto que los hallazgos apuntan hacia un efecto de citotoxicidad que se desea comprobar. El trabajo que antecede esta investigación en el que Soto y colaboradores (2017) arrojan como resultado que el extracto metanólico liofilizado de pasto de cebada exhibe una alta concentración de flavonoides (12.11 μg de equiv. Rutina/g) con respecto a fenoles totales (0.41 mg equiv. Ác. Gálico/g de muestra) y taninos (0.06 mg equiv.(+) catequina/g de muestra). En este mismo trabajo, el extracto no tuvo capacidad antioxidante elevada, no obstante, es importante resaltar que los resultados dan pauta para estudiar el alto contenido de flavonoides antes mencionado y su relación en procesos carcinogénicos; puesto que la evidencia apunta su implicación en efectos antiproliferativos mediante diversos mecanismos de acción como inducción de apoptosis, arresto de ciclo celular, modulación de vías de señalización de muerte o aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno mitocondrial. En otro trabajo realizado por Razo y colaboradores (2013) se demostró que un extracto de pasto de cebada (*Hordeum vulgare*) (EPC) de la variedad Esmeralda, afectó la proliferación y la sobrevivencia de una líneas celular de cáncer de mama (MCF-7). Por lo anterior, se requiere realizar pruebas de citotoxicidad *in vitro* en diferentes líneas celulares para conocer el aspecto diferencial, así como poner las bases que permitan entender el mecanismo por el cual se produce la disminución en la proliferación celular, que actualmente no se ha revisado a fondo para la variedad Esmeralda.

Es fundamental establecer sustento científico y conocimiento sobre los efectos del extracto de pasto de cebada como alimento funcional, este proceso incluye la sensibilidad hacia líneas celulares transformadas y no transformadas, así como la vía de muerte inducida de manera diferencial.

V. HIPÓTESIS

El extracto de pasto de cebada (EPC) variedad Esmeralda tendrá un efecto anti-proliferativo por medio de actividad apoptótica y arresto del ciclo celular en modelos de cáncer *in vitro*.

VI. OBJETIVOS

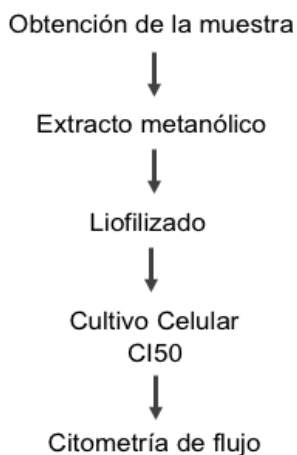
6.1. Objetivo general

Evaluar el perfil citotóxico del extracto de pasto de cebada (*Hordeum vulgare*) en líneas celulares transformadas de cáncer de mama (MCF-7, MDA-MB 231), cáncer de próstata (PC-3) y fibroblastos humanos, así como la vía de muerte expresada en línea celular sana y con cáncer.

6.2. Objetivos específicos

1. Determinar la concentración mínima con efectos anti-proliferativos y citotóxicos de EPC en células transformadas de cáncer de mama (MCF-7, MDA-MB), cáncer de próstata (PC-3) y fibroblastos humanos.
2. Evaluar el efecto de EPC en la muerte celular por apoptosis y arresto del ciclo celular en una línea celular sana y otra con cáncer.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS



7.1. Obtención de la muestra

La semilla de pasto de cebada (*Hordeum vulgare*) de la variedad esmeralda, fue obtenida en INIFAP Celaya.

En la Facultad de Ingeniería, Campus Arroyo Seco, Querétaro se cultivó el pasto de cebada de la variedad esmeralda; esta región presenta un clima semi-seco, lo cual favorece el crecimiento y desarrollo del pasto de cebada, ya que un exceso de humedad disminuye la tasa de crecimiento del vegetal.

El pasto de cebada fue podado al alcanzar una altura de 11 a 12 pulgadas (28 a 30 cm). Las muestras fueron secadas en una estufa (Shel lab 1375 Fx, USA) a una temperatura de 40°C por 24 horas, posteriormente fue pulverizado en un molino (Thomas Scientific Model 4 Wiley, USA) con una criba de 0.5 mm y así se obtuvo una harina del pasto de cebada. Se realizaron muestras compuestas y se almacenaron a una temperatura de -70°C hasta su utilización.

7.2. Extracto metanólico

Para la obtención del extracto del pasto de cebada (EPC) se tomaron 20 g de muestra compuesta del pasto de cebada molido y se agregaron 200 ml de metanol/agua (80:20 v/v). Se colocó en agitación constante y en ausencia de luz por 24 horas. El extracto metanólico-acuoso fue filtrado a través de un papel filtro

(Whatman 541) y la solución roto-evaporada a una temperatura de 40° C y con una presión de vacío de 400 mmHg. El residuo fue liofilizado y almacenado en frascos ámbar a temperatura de refrigeración.

7.3 Curva dosis-respuesta

Se emplearon tres líneas de diferente origen tumoral humano y crecimiento adherente en monocapa: carcinoma de próstata (PC-3) y adenocarcinoma de mama (MCF-7 y MDA-MB 231) así como la línea celular no transformada de fibroblastos humanos, todas provenientes de ATCC.

Para el análisis de la curva dosis respuesta, se sembraron 1×10^5 células por pozo, en placas de 24 pozos con medio de cultivo (DMEM / F12-K) con 10% de suero fetal bovino (SFB), en volumen de 500 μ L bajo condiciones de 37°C y 5% de CO₂. Cuando las células se encontraron bajo confluencia del 80% (48 h), se cambiaron las condiciones con medio al 2% de SFB por un periodo de 24 h para llevar sincronización del ciclo celular. Pasado este tiempo, se cambiaron las condiciones de todos los pozos, sustituyendo el grupo control con albúmina sérica bovina (ASB) al 0.5%. Los grupos de tratamiento con el EPC serán preparados en concentraciones exponenciales (1, 10, 100, 200, 300 y 500 μ g/mL) en medio con ASB al 0.5% durante un periodo de 24h. Pasado este tiempo se colectaron las células con enzima Tripsina 0.15% en volumen 0.5 ml, después de 5 min se inactivaron con 0.2 ml de medio completo para ser colectadas en tubos de eppendorf en un volumen de solución madre de 1 ml. Se contaron en cámara de Neubauer, para posteriormente pasar al análisis citométrico.

7.4. Citometría de flujo

Para el análisis de apoptosis y ciclo celular, se utilizó el analizador celular Muse, MerckMillipore, USA, en el cual se utilizarán kits específicos para apoptosis (MCH100105, Muse Annexin V) y para análisis del ciclo celular (MCH100106, Muse Cell Cycle Assay).

Anexina V detecta la externalización de fosfatidilserina en las células apoptóticas utilizando un recombinante conjugado con células de tinte fluorescente verde - FITC y 7 aminoactinomicina (7 ADD), un intercalante celular se incorpora a la cadena de ADN una vez que la membrana celular ha perdido su integridad. Después del tratamiento con ambas sondas, las células apoptóticas muestran fluorescencia, y células vivas muestran poca o ninguna fluorescencia (Engreen Biosystem, 2016). Para llevar a cabo el análisis de ciclo celular se emplea una población de referencia, con un contenido de ADN conocido. Se determina la fase del ciclo celular que represente la cantidad de ADN en un histograma. Ambas técnicas emplean fluorocromos para poder relacionar directamente la cantidad de fluorescencia medida con el contenido celular de ADN (Sainz, 2005).

VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de los resultados de obtuvieron mediante comparación de medias de los conteos celulares por medio de un análisis de varianza (ANOVA) con *pos hoc* Tukey realizado con el paquete estadístico SPSS v23. El porcentaje de sobrevivencia fue calculado con base a la media de los conteos de control inicial y el porcentaje de proliferación, a partir de la media de los conteos de control negativo (vehículo). Se realizarán regresiones simples de cada tratamiento, utilizando las medias de 3 experimentos independientes desarrollados con células de distintas transferencias, para determinar en cada caso la concentración inhibitoria 50 (CI50).

Tabla 3. Descripción de variables

Variables			
Nombre	Descripción	Escala	Rol
Concentraciones de EPC	Las células son tratadas con EPC en concentraciones exponenciales, utilizando albúmina sérica bovina como control (vehículo)	Continua	Independiente
Viabilidad Celular	Se realiza un conteo de células vivas y muertas, utilizando el promedio de las células vivas, factor de dilución y factor de la cámara de Neubauer para evaluar viabilidad	Continua	Dependiente
Muerte Celular por Apoptosis	Por medio de citometría de flujo. Técnica cuantitativa y cualitativa de análisis y separación de partículas, el resultado es arrojado por medio de fluorescencia	Continua	Informativa
Arresto de Ciclo Celular	Por medio de citometría de flujo. Técnica cuantitativa y cualitativa de análisis y separación de partículas, el resultado es arrojado por medio de fluorescencia	Continua	Informativa

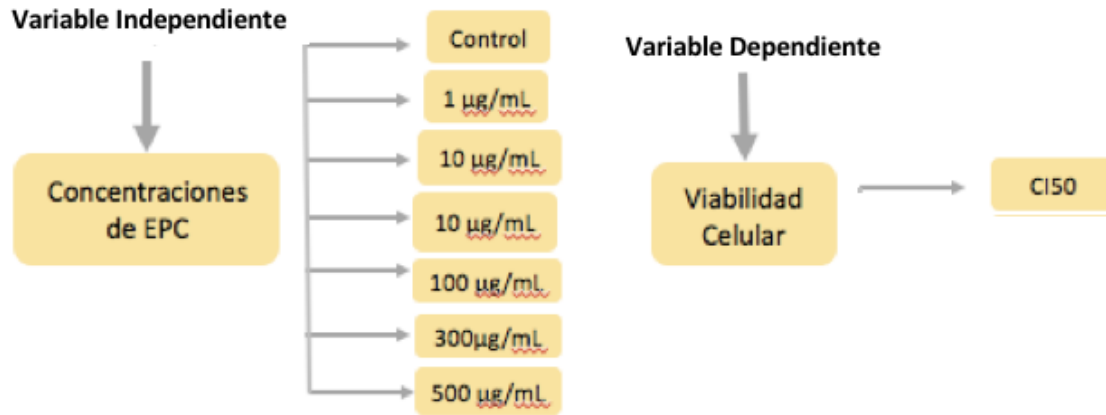


Figura 4. Descripción de variables

IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó la sensibilidad de cuatro líneas celulares distintas para determinar la concentración inhibitoria 50 (CI50), la cual se obtuvo mediante la reducción de la población celular en un 50% de manera estadística. Se observó que la concentración de 100 µg/ml es la que muestra este efecto inhibitorio y se presenta en tres líneas celulares: fibroblastos humanos, célula predominante de tejido conectivo utilizada como referencia de línea celular sana, células de adenocarcinoma de próstata PC-3 y células de adenocarcinoma de mama MCF-7 de tipo luminal, hormona-receptor positivos a través de receptores citoplásmicos de estrógenos y, MDA-MB 231 hormona-receptor negativos. A pesar de que las dos últimas son líneas celulares de cáncer de mama, MDA-MB 231 es de tipo basal y triple negativo (estrógenos, progesterona y HER2 negativos) y puede tener distinta sensibilidad a agentes citotóxicos. De las cuatro líneas celulares consideradas, en tres se expresó el mismo efecto bajo la misma concentración a las 24 horas respectivamente (Figuras 5, 6 y 7). Ensayos clínicos relacionados con las propiedades nutraceuticas de este pasto (*Hordeum vulgare*) le atribuyen efectos como disminución de estrés oxidativo en obesidad, mejora de presión arterial en enfermedades coronarias, disminución niveles de colesterol en hipercolesterolemia, una mejor captación de glucosa en diabetes, y recientemente un efecto antiproliferativo que ha llegado hasta modelos *in vivo*, demostrando así, la correlación entre los fitoquímicos que contiene y el consumo de pasto de cebada frente a estas patologías (Lahouar y col., 2014).

En la variedad Esmeralda se ha reportado un elevado contenido de vitaminas como D y E (tocolos y tocotrienoles); así como minerales, y antioxidantes (fenoles) principalmente, que, destacan dentro de los tratamientos naturales de origen vegetal de manera preventiva en enfermedades crónicas no transmisibles, todas ellas, caracterizadas principalmente por estrés oxidativo aumentado (Castillo y col., 2012). Todos estos fitoquímicos que contiene pueden conferirle las propiedades antes mencionadas y que recientemente demuestra disminución de viabilidad

celular en modelos *in vitro*. Kubatka y colaboradores (2016) realizaron un estudio de pasto de cebada en células de cáncer de mama MCF-7, obteniendo como resultado por medio del ensayo MTT que el extracto de cebada aplicado a la concentración de 1 mg/ml disminuyó la proliferación de células de cáncer de mama MCF-7 al 37,93% después de 72 horas de tratamiento, y sugiere que la cebada joven (pasto) podría prevenir la progresión del ciclo celular y conducir la inhibición de la proliferación en células cancerígenas. Otro trabajo realizado por Razo-Castro y colaboradores pertenecientes al equipo de nuestra investigación en 2015 observaron que un extracto liofilizado de pasto de cebada afectó la proliferación en un 94% y sobrevivencia en un 66% de células MCF-7 en función de la concentración y a través del tiempo respectivamente, concluyendo que la CI50 es de 100 $\mu\text{g/ml}$ y la proliferación continúa disminuyendo conforme el tiempo pasa, ocurriendo en 0.2, 0.07, 0.018 y 0.016 $\mu\text{g/ml}$ del extracto de pasto de cebada a las 2, 8, 12 y 24 horas.

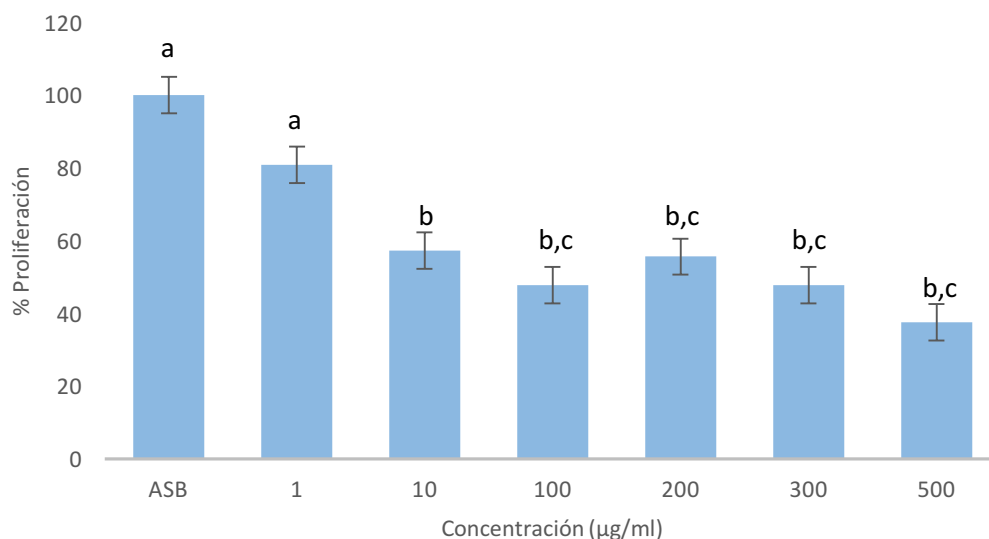


Figura 5. Curva dosis-respuesta sobre fibroblastos humanos, tratados con diferentes concentraciones de EPC. Se muestra el promedio de al menos 3 experimentos independientes. Las letras minúsculas representan diferencias estadísticas entre grupos (Tukey, $p < 0.05$). EPC afecta la proliferación celular de manera significativa a partir de la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$. CI50 pertenece a 100 $\mu\text{g/ml}$.

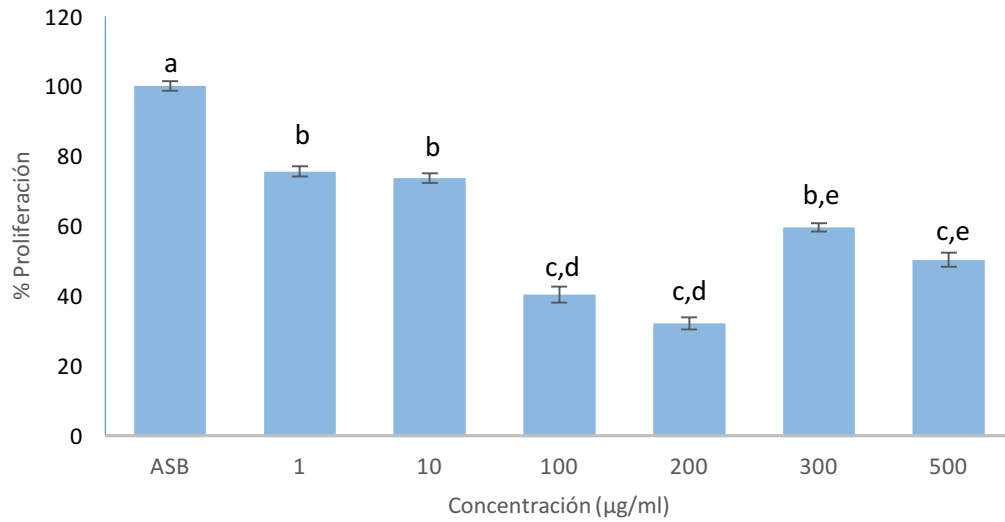


Figura 6. Curva dosis-respuesta sobre células de cáncer de próstata PC-3, tratadas con diferentes concentraciones de EPC. Se muestra el promedio de al menos 3 experimentos independientes. Las letras minúsculas representan diferencias estadísticas entre grupos (Tukey, $p < 0.05$). EPC afecta la proliferación celular a partir de la concentración de 1 µg/ml. CI50 pertenece a 100 µg/ml.

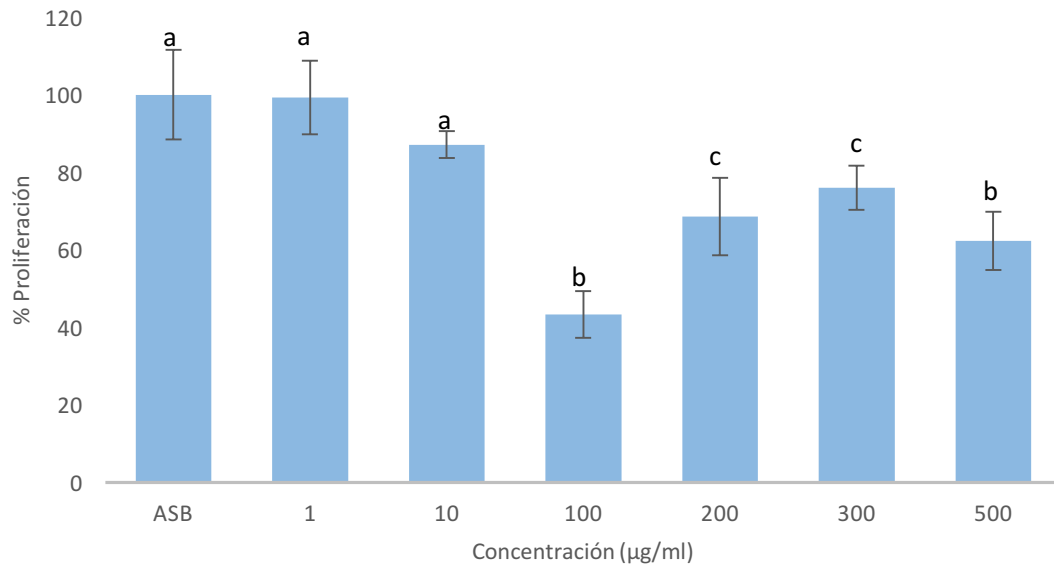


Figura 7. Curva dosis-respuesta sobre células de cáncer de mama MCF-7, tratadas con diferentes concentraciones de EPC. Se muestra el promedio de al menos 3 experimentos independientes. Las letras minúsculas representan diferencias estadísticas entre grupos (Tukey, $p < 0.05$). EPC afecta la proliferación celular a partir de la concentración de 1 µg/ml. CI50 pertenece a 100 µg/ml.

En el caso de las células de cáncer de mama independiente de hormonas MDA-MB 231, la disminución significativa de la proliferación se observa a partir de la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$, lo que indica mayor sensibilidad al extracto bajo menor concentración en esta línea celular únicamente (Figura 8). Esto puede deberse a que el cáncer de mama triple negativo de tipo basal es muy sensible a agentes citotóxicos por su incapacidad de reparación de ADN debido a la mutación del gen BRCA o *p53*.

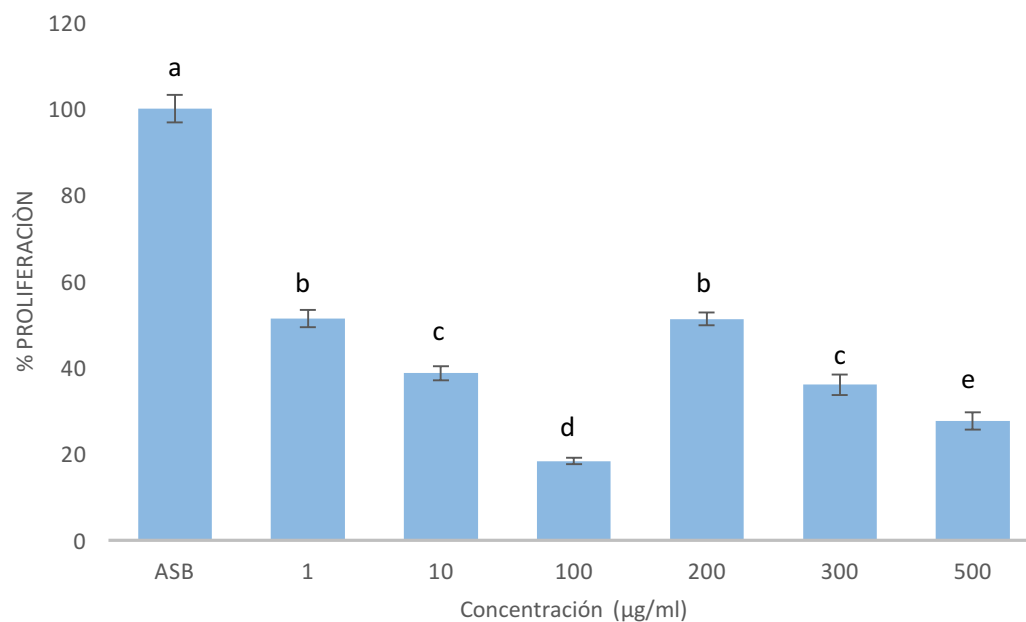


Figura 8. Curva dosis-respuesta sobre células de cáncer de mama MDA-MB 231, tratadas con diferentes concentraciones de EPC. Se muestra el promedio de al menos 3 experimentos independientes. Las letras minúsculas representan diferencias estadísticas entre grupos (Tukey, $p < 0.05$). EPC afecta la proliferación celular a partir de la concentración de $1 \mu\text{g/ml}$. CI50 pertenece a $100 \mu\text{g/ml}$.

Este mismo grupo de trabajo reportado por Kubatka y colaboradores, contrasta sus resultados con un estudio *in vivo*, en el que la cebada señala un efecto antitumoral de manera independiente de la dosis, no obstante, esto debe concluirse por medio de distintos modelos de cáncer, en el que los hallazgos se complementen con estudios clínicos en los que el pasto de cebada demuestre claramente los efectos positivos que se le han conferido.

Sang Mi Woo y colaboradores en 2017 proveen evidencia reciente de que el pasto de cebada tiene un efecto antiproliferativo por medio de apoptosis en líneas celulares de cáncer de próstata y mama, continuando con esta línea de investigación, obtuvimos una CI50 de 100 µg/ml en línea celular sana (fibroblastos humanos), de cáncer de próstata PC-3, y cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB 231. Puesto que nuestra investigación se enfoca en el efecto antiproliferativo *in vitro*, la concentración inhibitoria coincide con la de nuestro equipo de trabajo en la que, de igual forma, está observándose disminución significativa de la proliferación celular bajo la concentración de 100 µg/ml de este extracto (EPC).

Por otro lado, se complementó el estudio de sensibilidad *in vitro* del pasto de cebada al contrastarlo con pruebas de citometría de flujo, técnica que permitió evaluar la muerte celular por apoptosis y arresto de ciclo celular para línea celular sana (fibroblastos humanos) y con cáncer de próstata (PC-3), así como activación de caspasas en línea celular sana. El ensayo de apoptosis, se llevó a cabo a través de marcaje con fluorescencia (Anexina V) y la traslocación de fosfatidilserina que, mostraron la activación de muerte celular vía apoptosis en un 23.6% en fibroblastos humanos bajo tratamiento con EPC (Figura 9) en comparación al 46.7% de muerte celular por apoptosis en la línea de cáncer (Figura 10), doblando este porcentaje de muerte en la línea celular de cáncer de próstata PC-3.

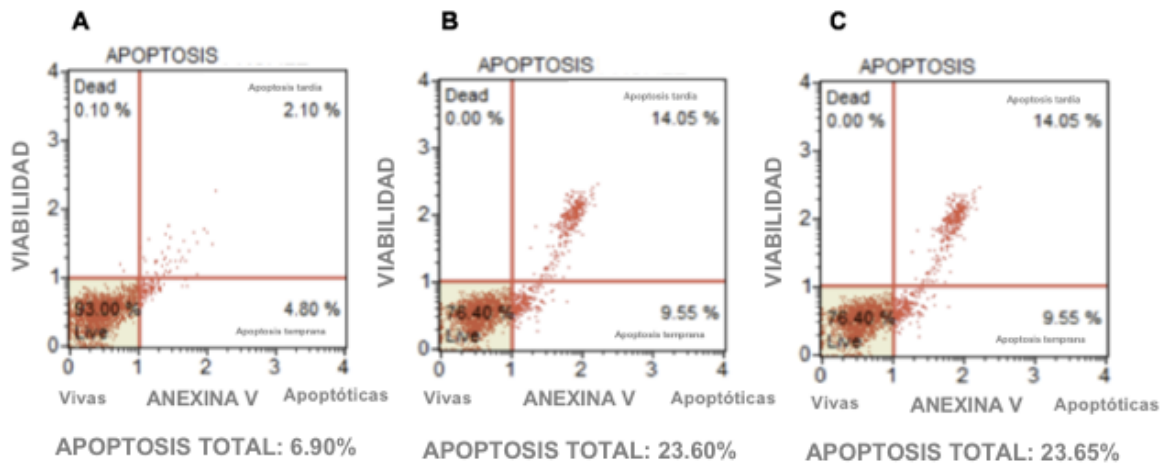


Figura 9. Análisis de muerte celular por apoptosis en fibroblastos humanos. (A) Control negativo de células con 0.05% de ASB en medio completo. (B) Análisis de células con tratamiento de EPC bajo la concentración de 100 µg/ml. (C) Análisis del control positivo de células tratadas con 5 µM de Camptotecina b. La cuantificación de llevó a cabo a las 24 horas. Las células se sometieron a isotiocianato de anexina V-fluoresceína y a tinción con 7-AAD

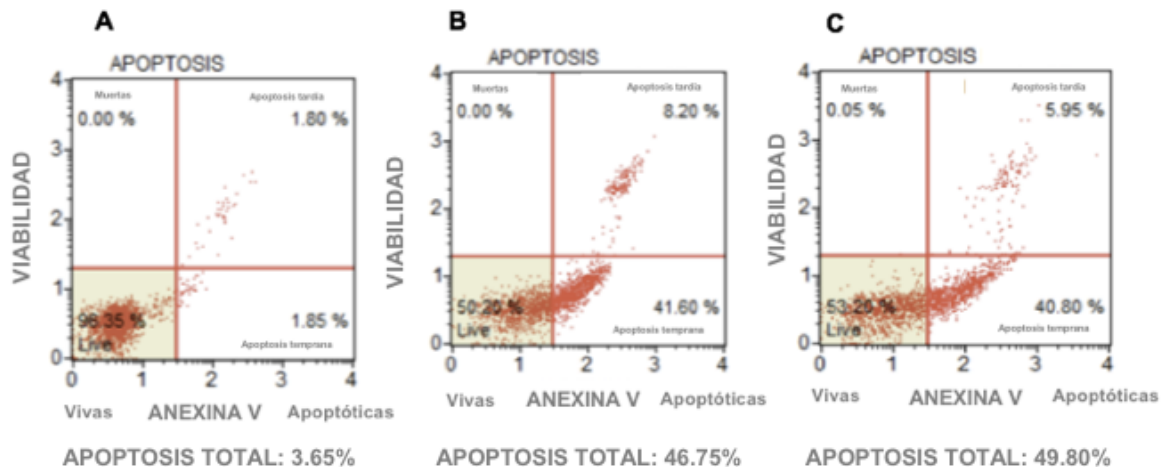


Figura 10. Análisis de muerte celular por apoptosis en células de cáncer de próstata PC-3. (A) Control negativo de células con 0.05% de ASB en medio completo. (B) Análisis del tratamiento de EPC en células PC-3 bajo la concentración de 100 µg/ml. (C) Análisis del control positivo de células tratadas con 5 µM de Camptotecina b. La cuantificación de llevó a cabo a las 24 horas. Las células se sometieron a isotiocianato de anexina V-fluoresceína y a tinción con 7-AAD.

En este sentido, Sang Mi Woo y colaboradores también proveen evidencia de que el pasto de cebada induce muerte celular apoptótica en línea celular de cáncer de mama y próstata por medio del aumento de especies reactivas de oxígeno intracelular. De igual manera, la investigación basada en el efecto de jugo de extracto de cebada de Czerwonka y colaboradores (2017), concluye puntualmente una notable actividad antioxidante, inhibición de la proliferación celular en carcinoma de colon e inducción de necrosis, así como una toxicidad nula hacia células epiteliales normales de colon. Estos estudios también respaldan el potencial citotóxico del pasto de cebada frente a líneas celulares y probable selectividad hacia células de cáncer, justificando una mayor investigación en los sistemas de modelos animales.

Respecto a la vía de muerte que presentan las dos líneas celulares (fibroblastos y cáncer de próstata PC-3) en las cuales la progresión del ciclo celular está regulada de manera secuencial por la activación ordenada de complejos enzimáticos que permiten el avance de fase G1 a S principalmente, mecanismo cuantificado mediante el contenido de ADN del ciclo celular. Los resultados fueron positivos en un 45% de células en fase S para fibroblastos humanos (Figura 11), siendo la segunda fase del ciclo, en la que se produce la replicación o síntesis del ADN y como resultado cada cromosoma se duplica quedando formado por dos cromátidas idénticas. Para el caso de las células de cáncer de próstata PC-3 presenta mayor contenido de células en fase G0/G1 con un 57.1% (Figura 12), esta fase también llamada fase del primer intervalo, en donde la célula crece físicamente, copia los organelos y hace componentes moleculares que necesitará en etapas posteriores. Lo anterior indica que el tratamiento con EPC tiene mayor efectividad por medio de arresto de ciclo celular al encontrarse mayor porcentaje en fase G0/G1 en la línea celular con cáncer.

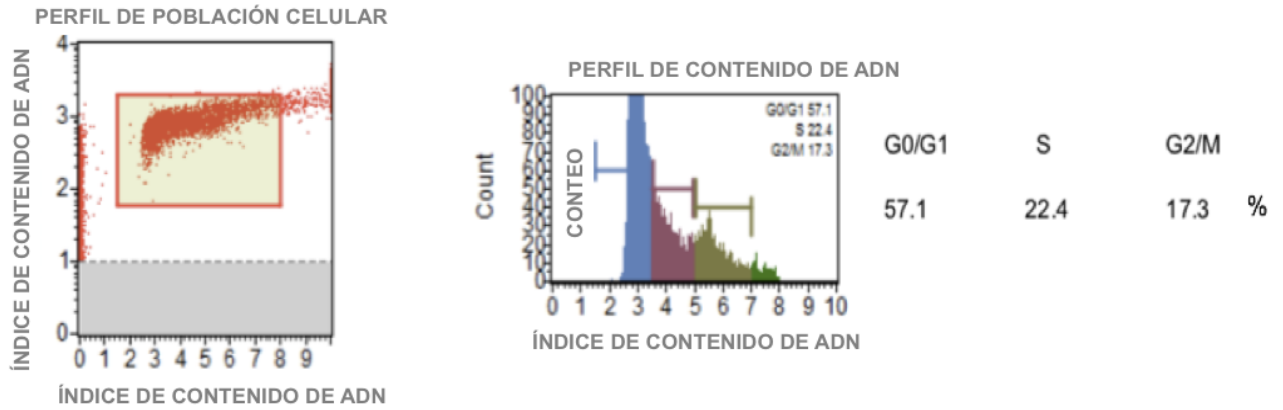


Figura 11. Análisis de ciclo celular en fibroblastos humanos. Las células fueron tratadas con 100 µg/ml de EPC durante 24 horas. EPC induce mayor porcentaje de arresto de ciclo celular en fase S con 43.7% de células en esta fase.

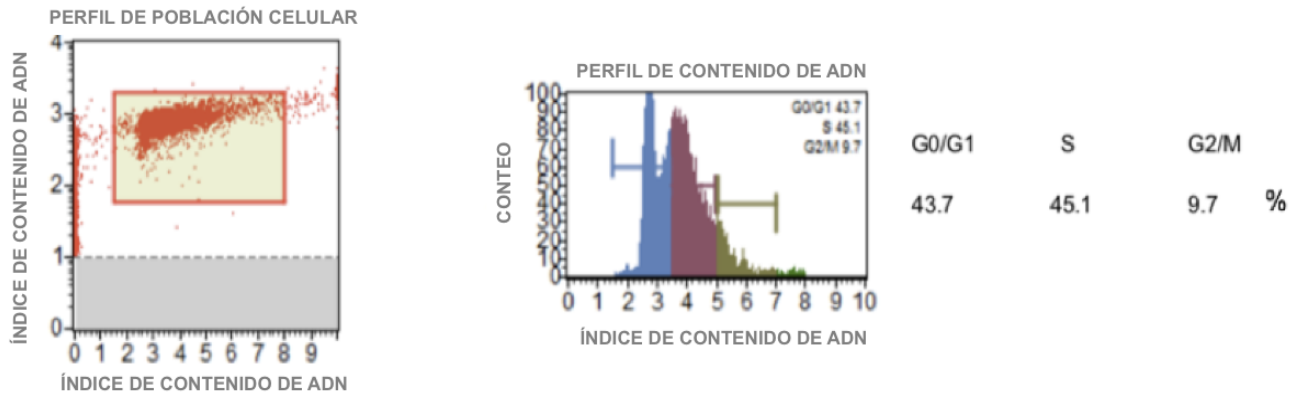


Figura 12. Análisis de ciclo celular en células de cáncer de próstata PC-3. Las células fueron tratadas con 100 µg/ml de EPC durante 24 horas. EPC induce mayor porcentaje de arresto de ciclo celular en fase G0/G1 con 57.1% de células en esta fase.

Por último, se realizó citometría de flujo para detección de múltiples caspasas (caspasa 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9). Este ensayo determina simultáneamente el recuento y el porcentaje de células con actividad enzimática, en combinación con un colorante de células muertas (7AAD). Esta prueba se hizo para fibroblastos únicamente, con la finalidad de percibir si existe una activación elevada, arrojando como resultado un porcentaje total de activación de 74.9% bajo la concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ de EPC contra un 22.25% de activación de caspasas en fibroblastos sin tratamiento, el control positivo son células tratadas con Camptotecina b, un inductor de muerte celular que mostró un porcentaje de 78.1% de activación total de caspasas. Los resultados prueban que existe inducción de caspasas sin especificar cuáles son activadas, sin embargo esto es indicador de que existe una cascada de activación de estas enzimas que culmina en muerte celular (Figura 13).

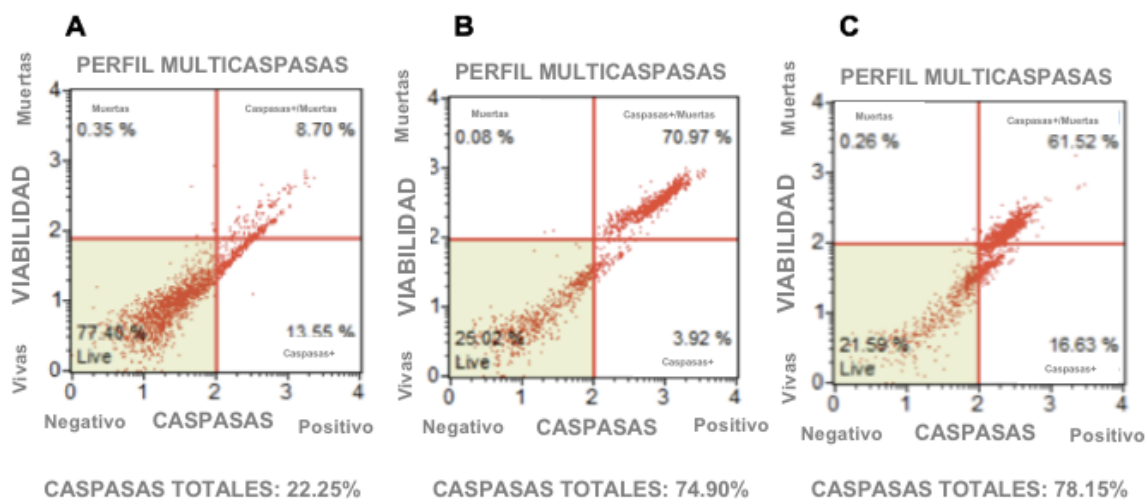


Figura 13. Análisis de activación de caspasas en fibroblastos humanos. (A) Control negativo de células con 0.05% de ASB en medio completo. (B) Análisis de células con tratamiento de EPC bajo la concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$. (C) Análisis del control positivo de células tratadas con 5 μM de Camptotecina b. La cuantificación de llevó a cabo a las 24 horas. Las células se sometieron a isotiocianato de anexina V-fluoresceína y a tinción con 7-AAD.

Esto sugiere que también existe una activación secuencial de estos complejos enzimáticos, sin embargo se requieren estudios que señalen específicamente cuáles caspasas son y bajo que condiciones se expresan, ya que Robles-Escajeda y colaboradores (2013) concluyen en su estudio que el pasto de cebada condujo a la muerte celular inducida por apoptosis a través de actividades de caspasa-8 y caspasa-3, liberación de TNF- α , división de PARP-1, translocación de fosfatidilserina y fragmentación de ADN asociada al ciclo celular en leucemia y linfoma *in vitro*.

La acción antiproliferativa que se observa puede deberse a la alta cantidad de compuestos antioxidantes y compuestos bioactivos que le confieren de manera sinérgica propiedades que disminuyen la viabilidad celular, sin embargo, es fundamental proveer bases científicas dentro de esta investigación para continuar estableciendo conocimiento sobre los efectos del extracto de pasto de cebada; proceso conlleva a la necesidad de evaluar sus distintas propiedades de manera molecular.

VIII. CONCLUSIONES

- El extracto de pasto de cebada (EPC) induce un efecto antiproliferativo en este modelo *in vitro*, debido a una reducción de la proliferación de manera significativa se demuestra sensibilidad en cuatro líneas celulares distintas
- Tanto la línea celular sana de fibroblastos humanos como de cáncer de próstata PC-3 y mama MCF-7 exhibe este efecto al extracto bajo las concentración inhibitoria (CI50) de 100 µg/ml. MDA-MB 231 lo hace a partir de 10 µg/ml.
- La proliferación de las células no se vio afectada en todo el rango de concentraciones, observándose un aumento significativo en 300 µg/ml para células de cáncer de próstata PC-3 y de 200 µg/ml en cáncer de mama MDA-MB 231 respectivamente. Al aumentar la dosis del extracto se observa que el efecto antiproliferativo no es de manera dosis-dependiente.
- Con base a porcentajes, la disminución de la proliferación se produce dos veces más en una línea celular de cáncer que en una línea celular sana, teniendo lugar a través de inducción de apoptosis y arresto de ciclo celular.
- En fibroblastos humanos existe activación de caspasas elevada que culmina en muerte celular.
- Son necesarios más estudios moleculares que corroboren que, el efecto antiproliferativo puede estar presente también en sistemas *in vivo*; sin embargo, con estos resultados se proveen bases científicas que permitirán esclarecer en un futuro el mecanismo por el cual se observan estos hallazgos.
- A pesar de los resultados mostrados en este estudio, el desarrollo puntual del efecto antiproliferativo no ha sido elucidado y, por tanto, el siguiente paso de la investigación es hacer un uso completo de las técnicas de biología molecular para revelar el mecanismo de EPC, que juega un papel importante en la patología del cáncer, puesto que es de gran trascendencia en la

búsqueda de métodos efectivos de prevención y eficacia en el tratamiento de esta enfermedad.

- El conjunto de toda esta evidencia, es trascendente para el área de investigación y desarrollo de extractos naturales de origen vegetal, pues esto puede ampliar las opciones de consumo, ya que, permite promover la utilización segura de fitoquímicos contenidos en ellos y, que pueden tener efectos importantes en el área de la salud.

IX. LITERATURA CITADA

- Andersson, A. A., Lampi, A. M., Nyström, L., Piironen, V., Li, L., Ward, J. L., & Fras, A. (2008). Phytochemical and dietary fiber components in barley varieties in the HEALTHGRAIN diversity screen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(21), 9767-9776.
- Alvarez Cruz N., & Bagué Serrano Ana J. (2012). *Tecnología Farmacéutica*. España.
- American Cancer Society, Medical Review. 2015
- American Cancer Society, Cancer Facts & Figures. 2016
- Asociación Española Contra el Cáncer. (2016).
- Bahmani, M., Shizard, H., Shanifard, N., Sheivandi, L., & Rafieian-Kopaei, M. (2017). Cancer phytotherapy: Recent views on the role of antioxidant and angiogenesis activities. *Journal of evidence-based complementary & alternative medicine*. 22(2), 299-309.
- Beltrán López, S., Loredó Osti, C., & Zamora Díaz M. (2011). Manejo integrado del cultivo de cebada en condiciones de temporal en San Luis Potosí (No. 633.16097244 B4M3).
- Bjørklund G, Chirumbolo S, Role of oxidative stress and anti-oxidants in daily nutrition and human health. Which suggestion may come from current literature? *Nutrition* (2016), doi: 10.1016/j.nut.2016.07.018.
- Brewer, M. S. (2011). Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(4), 221-247.
- Burnworth, B., Arendt, S., Muffler, S., Steinkraus, V., Bröcker, E. B., Birek, C., & Boukamp, P. (2007). The multi-step process of human skin carcinogenesis: a role for p53, cyclin D1, hTERT, p16 and TSP-1. *European journal of cell biology*, 86 (11-12), 763-780.
- Cáncer en las Américas: perfiles de país 2013 (GLOBOCAN)

- Cencic, A., & Chingwaru, W. (2010). The role of functional foods, nutraceuticals, and food supplements in intestinal health. *Nutrients*, 2(6), 611-625.
- Cox T, Sinclear J. (1998). *Biología Molecular en Medicina*. Editorial Panamericana. 3º edición. Madrid, España. 158.
- Cunningham, D., & You, Z. (2015). In vitro and in vivo model systems used in prostate cancer research. *Journal of biological methods*, 2(1).
- Czerwonka, A., Kawka, K., Cykier, K., Lemieszek, M. K., & Rzeski, W. (2017). Evaluation of anticancer activity of water and juice extracts of young *Hordeum vulgare* in human cancer cell lines HT-29 and A549. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 24(2), 345-349.
- Droushiotis, D. N. (1984). The effect of variety and harvesting stage on forage production of barley in a low-rainfall environment. *The Journal of Agricultural Science*, 102(02), 289-293.
- Encyclopaedia Britannica Inc. (2011). *Britannica Book of the Year 2011: Events of 2007* (Vol. 33). Encyclopaedia britannica.
- Engreen Biosystem home page: www.engreen.co.nz
- Enrique Blázquez Fernández. (2007). *Fundamentos Moleculares de la Medicina II* (Real Academia Nacional de Medicina).
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), authors Report on Functional Foods, Food Quality and Standards Service (AGNS) 2007.
- Frías, J. C. M. (2012). Propagación y técnicas de cultivo de la Cebada en grano (*Hordeum vulgare*). *Revista Vinculando*.
- Galano, A., Castañeda-Arriaga, R., Pérez-González, A., Tan, D. X., & Reiter, R. J. (2016). Phenolic Melatonin-Related Compounds: Their Role as Chemical Protectors against Oxidative Stress. *Molecules*, 21(11), 1442.
- Golias C, Charalabopoulos A, Charalabopoulos K. (2004). Cell Proliferation and Cell Cycle Control: A mini review. *International Journal of Clinical Practice*. 58:1134-1141.

- Hernandez, A. G. D. (2010). *Tratado de Nutrición: Nutrición humana en el Estado de Salud* (Vol. 3). Ed. Médica Panamericana.
- Hernández, D. M., & Hurtado, M. M. C. (2000). Alimentos funcionales (nutracéuticos). *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*.
- Idehen, E., Tang, Y., & Sang, S. (2017). Bioactive phytochemicals in barley. *Journal of food and drug analysis*, 25(1), 148-161.
- Instituto Mexicano del Seguro Social (2016)
- Instituto Nacional de Salud Pública. (2011)
- Instituto Nacional del Cáncer. (2016)
- Ishihara, D., Pop, L., Takeshima, T., Iyengar, P., & Hannan, R. (2016). Rationale and evidence to combine radiation therapy and immunotherapy for cancer treatment. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 1-18.
- John Cairns. (1981). *Cáncer: Science and Society*. Editorial Reverté. 1ª edición. Madrid, España.
- Kubatka, P., Kello, M., Kajo, K., Kruzliak, P., Výbohová, D., Šmejkal, K., ... & Kapinová, A. (2016). Young barley indicates antitumor effects in experimental breast cancer in vivo and in vitro. *Nutrition and cancer*, 68(4), 611-621.
- Kumar, A., Metwal, M., Kaur, S., Gupta, A. K., Puranik, S., Singh, S., ... & Yadav, R. (2016). Nutraceutical Value of Finger Millet [*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.], and Their Improvement Using Omics Approaches. *Frontiers in Plant Science*, 7.
- Kumar, V., Abbas, A. K., & Aster, J. C. (2015). *Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional+ Student Consult*. Elsevier España.
- Lahouar, L., El-Bok, S., & Achour, L. (2015). Therapeutic potential of young green barley leaves in prevention and treatment of chronic diseases: an overview. *The American journal of Chinese medicine*, 43(07), 1311-1329.
- Levison, D. A., Reid, R., David J. Harrison, & Stewart Fleming. (2009). *Patología de Muir* (Vol. 14va Edición).
- Lindhe Liu,. *Tecnología de Alimentos*. Int. 2002, 1, 71-72.

- Mercado-Mercado, G., Carrillo, R., Wall-Medrano, A., López Díaz, J. A., & Álvarez-Parrilla, E. (2013). Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México. *Nutrición Hospitalaria*, 28(1), 36-46.
- México, 2012. Base de defunciones 2012. Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS). Secretaría de Salud, México, 2014. Estimaciones de población: Consejo Nacional de Población (CONAPO), México, 2012. Tasa de mortalidad estandarizada por edad.
- Murray, P., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2015). *Microbiología médica*. Elsevier Brasil.
- Nasri, H., & Rafeian-Kopaei, M. (2014). Medicinal plants and antioxidants: why they are not always beneficial?. *Iranian Journal of public health*, 43(2), 255.
- Nicoletti, M. (2012). Nutraceuticals and Botanicals: Overview and Perspectives. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 63(sup1), 2-6.
- OMS. 2015. Cáncer.
- Okarter, N., Liu., R.H. Health benefits of whole grain phytochemicals. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2010, 50 193-208.
- Paulíčková, I., Ehrenbergerová, J., Fiedlerová, V., Gabrovská, D., Havlova, P., Holasova, M. & Vaculová, K. (2007). Evaluation of barley grass as a potential source of some nutritional substances. *Czech Journal of Food Science. Vol*, 25(2), 65-72.
- Pham-Huy, L.A.; He, H.; Pham-Huy, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int. J. Biomed. Sci.* 2008, 4, 89–96.
- Planas, M., J. Álvarez, J.M. Culebras, A. García de Lorenzo, M. León, J. Maldonado, J.C. Montejo. (2010). *Tratado de Nutrición*. 2da Edición. Nutrición Clínica
- Portal for International Cancer Research: Cancer Epidemiology and Genetic Database. (2012).

- Rafeian-Kopaei, M., Barandaran, A., & Rafeian, M. (2013). Plants antioxidants: From laboratory to clinic. *Journal of nephropatology*, 2(2).
- Razo-Castro J., González-Coria C., Pots-Hernández I., Segura-Isasi I., López-Martínez J., García-Gasca T, Mercado-Luna A., Chávez-Servín J., Ferriz-Martínez R. (2015). Efecto antiproliferativo de un extracto de pasto de cebada (*Hordeum vulgare*) sobre la línea celular de Cáncer de Mama. *Ciencia@UAQ*. 2, 1-8.
- Robles-Escajeda, E., Lerma, D., Nyakeriga, A. M., Ross, J. A., Kirken, R. A., Aguilera, R. J., & Varela-Ramirez, A. (2013). Searching in mother nature for anti-cancer activity: anti-proliferative and pro-apoptotic effect elicited by green barley on leukemia/lymphoma cells. *PloS one*, 8(9), e73508.
- Rojas Mejía, A. M. (2010). Plantas medicinales en el manejo de enfermedades oculares.
- Sainz Fernández, C. (2005). Análisis de la influencia in vitro de bajas dosis de radiación producidas por ²²²Rn sobre proliferación celular, apoptosis y respuesta a agentes citotóxicos. Universidad de Cantabria.
- Salazar, M. M. (2009). Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular in vitro y su importancia en biotecnología de la salud. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(2), 152-166.
- Sánchez-Rodríguez, M. A., & Mendoza-Núñez, V. M. (2003). Envejecimiento, enfermedades crónicas y antioxidantes. *México: FES "ZARAGOZA", UNAM*.
- Sawicki, C. M., McKay, D. L., McKeown, N. M., Dallal, G., Chen, C. Y. O., & Blumberg, J. B. (2016). Phytochemical Pharmacokinetics and Bioactivity of Oat and Barley Flour: A Randomized Crossover Trial. *Nutrients*, 8(12), 813.
- Sociedad Española de Cardiología (2000).
- Stavric, B. (1994). Role of chemopreventers in human diet. *Clinical biochemistry*, 27(5), 319-332.
- Sun, J., Chu, Y., Wu, X., & Liu, R. (2002). Actividades antioxidantes y antiproliferativas de algunas frutas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7449-7454.

- Casadevall, V. U. (2009). Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares (Doctoral dissertation, Universitat de Barcelona).
- Vargas, R. D., Torrescano, G. R., Mendoza, A. M., Vallejo, B., Acedo, E., & Sánchez, J. J. (2013). Mecanismos involucrados en la actividad antioxidante y antibacteriana del propóleo. *Biotecnia Revista deficiencias Biológicas y de la Salud*, 32-36.
- Villaseñor, E. A. Me., & Rogelio Martínez Macías. (2009). *Fundamentos de Oncología*. Universidad Nacional Autónoma de México
- Yahia, Elhadi M. 2016. Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and human health. Wiley-Blackwell.(Pag 3) In press.
- Zicre, Daniela. (2012). Cátedra de Anatomía y Fisiología Patológicas. Facultad de Ciencias Médicas. UNR.