



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

“Perfil Citotóxico de Extractos de Hoja de Amaranto (*A. hypochondriacus* L.) en células murinas y humanas”

TESIS

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

PRESENTA:

L.N. Cynthia González Coria

Dirigido por:

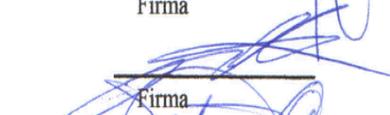
Dr. Jorge Luis Chávez Servín
 Director de Tesis

SINODALES:

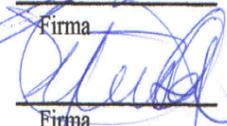
Dr. Jorge Luis Chávez Servín
 PRESIDENTE


 Firma

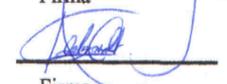
Dr. Roberto Augusto Ferríz Martínez
 SECRETARIO


 Firma

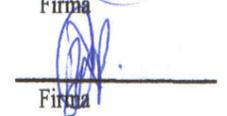
Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
 VOCAL

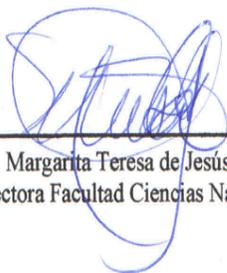

 Firma

Dra. Karina de la Torre Carbot
 SUPLENTE


 Firma

MNH. Francisco Josué López Martínez
 SUPLENTE


 Firma



 Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
 Directora Facultad Ciencias Naturales



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

Centro Universitario
 Querétaro, Qro.
 Diciembre, 2016
 MÉXICO

RESUMEN

En las últimas décadas se ha estudiado el efecto de extractos de diferentes especies vegetales en diversos tipos de células incluyendo células cancerígenas, en estos estudios se ha observado un efecto citotóxico y/o antiproliferativo a nivel *in vitro*, los autores de dichos estudios mencionan que algunos de los compuestos bioactivos de las especies vegetales son los responsables de estos efectos aludiendo a que presentan capacidad antioxidante y diferentes compuestos antioxidantes, siendo interesante evaluar estos compuestos provenientes de otras especies vegetales de interés alimentario como lo es la hoja de Amaranto ya que a diferencia de otras partes de la planta de Amaranto, como la semilla ó el tallo, la hoja posee el mayor contenido de compuestos con capacidad antioxidante, estos pueden participar en la prevención de diversas enfermedades incluyendo cáncer, ya que pueden actuar como secuestradores biológicos de los radicales libres, el interés en los últimos años ha pasado de lo preventivo al posible tratamiento con dichos compuestos antioxidantes de manera que ciertos compuestos fenólicos sirven como moléculas señalizadoras en rutas de muerte celular. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad antioxidante y los compuestos responsables de los extractos liofilizados acuoso y metanólico de la hoja de Amaranto *Amaranthus hypochondriacus L.* y con los mismos determinar la citotoxicidad sobre células de cáncer de colon humano (HT-29) y fibroblastos murinos (3T3), utilizando citometría de flujo para evaluar parámetros de muerte celular. Se realizó una extracción acuosa y otra metanólica a partir de la hoja de amaranto y estos fueron rotaevaporados y liofilizados. Se evaluó la capacidad antioxidante (CA) por los métodos (FRAP y DPPH), se determinó el contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) por el método de Folín-Cicalteau, Antocianinas (AT) por diferenciación de PH y Taninos Condensados (TC) por el método de vainillina-catequina. Se determinó la concentración inhibitoria media (CI50) y la concentración letal media (CL50) posteriormente se utilizó un kit de Anexina V y Muerte Celular para determinar apoptosis y un kit de Lactato Deshidrogenasa (LDH) para determinar necrosis en las células tratadas con los Extractos Liofilizados (EL). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) seguido por una prueba pos hoc de Tukey y Dunnet con un nivel de significancia ($p < 0,05$) utilizando el programa estadístico SPSS v21 y el Software Prism GraphPad v5.

Palabras Clave: Hoja de Amaranto, *Amaranthus hypochondriacus L.*, HT-29, 3T3, Citotoxicidad, Extracto acuoso y metanólico.

SUMMARY

In recent decades has studied the effect of extracts of different plant species in various cell types including cancer, these studies have shown a cytotoxic effect and / or antiproliferative in vitro level, the authors of these studies mention that some of bioactive compounds of plant species are responsible for these effects alluding to exhibit antioxidant capacity and different antioxidant compounds, it is interesting to evaluate these compounds from other plants of food interest as is the leaf Amaranth because unlike other parts of the amaranth plant, as seed or stem, leaf has the highest content of compounds with antioxidant capacity, they can participate in the prevention of various diseases including cancer, as they can act as biological scavengers of free radicals, interest in recent years has shifted from the possible treatment with preventive antioxidants such compounds so that certain phenolic compounds serve as signaling molecules in cell death pathways. The aim of this study was to evaluate the antioxidant capacity and the compounds responsible for the aqueous and methanolic extracts lyophilized leaf Amaranth *Amaranthus hypochondriacus l.* and therewith determine cytotoxicity on cells human colon cancer (HT-29) and murine fibroblasts (3T3) using flow cytometry to evaluate cell death parameters. an aqueous methanol extraction and another was made from leaf amaranth and these were broken evaporated and lyophilized. antioxidant capacity (AC) by methods (FRAP and DPPH) was evaluated, the content of total phenolics (TPC) was determined by the Folin-Cicalteau, Anthocyanins (AT) by differentiation of PH and condensed tannins (CT) by the method of vanillin-catechin. inhibiting concentration (IC50) and the median lethal concentration (LC50) was determined subsequently Annexin V and Cell Death to determined apoptosis and Lactate Dehydrogenase (LDH) kit was used to determine necrosis in cells treated with lyophilized extracts cells (LE). An analysis of variance (ANOVA) followed by a post hoc Tukey and Dunnet with a level of significance ($p < 0.05$) using SPSS v21 and GraphPad Prism Software v5 was performed.

Key Words: Amaranth leaves, *Amaranthus hypochondriacus l.*, HT-29, 3T3, Cytotoxicity, methanolic and aqueous extract.

DEDICATORIA

*A mi esposo Diego
por su apoyo incondicional,
por alentarme a cumplir mis metas
y por ser mi ejemplo a seguir.*

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mi familia: a mi hermana, a mi mamá, a mi papá, y a mi esposo que siempre me han apoyado y enseñado a ser una mejor persona y por creer en mí, siempre. Son ustedes mi motor de vida.

Al Dr. Jorge Luis Chávez Servín, mi director de tesis por haberme brindado la oportunidad de trabajar con él desde un principio y por cada una de sus enseñanzas y su paciencia en el proceso de este trabajo, ¡Es un gran Asesor!

A la Dra. Teresa García Gasca porque es una gran maestra, y una gran persona, gracias por motivarme a ser una mejor estudiante, es un honor trabajar dentro de su laboratorio y un ejemplo a seguir en su entrega y dedicación a la investigación.

A MNH Josué López Martínez por su paciencia y entrega al laboratorio donde trabajé, por enseñarme todo en el cultivo celular, por su entusiasmo contagiante, muy especialmente agradezco a él ya que sin su ayuda este trabajo no hubiera podido ser posible.

A mi mesa de sinodales el Dr. Roberto Ferríz y Dra. Karina de la Torre, Mi respeto y Admiración por su entrega y gran pasión por enseñar. Muchas Gracias.

Al M.en C. Konisgmar Escobar por su apoyo con el equipo de la liofilizadora y su equipo de trabajo dentro del laboratorio de Nutrición Animal de la FCN.

Por último agradecer, al CONACyT y a la Universidad Autónoma de Querétaro y a todos mis profesores durante la maestría que me guiaron en la realización de este trabajo y por sus enseñanzas, a mis compañeros del grupo de investigación y compañeros del Laboratorio de Biología Celular, a mis amigos que conocí durante la maestría y que hicieron de mis días de trabajo que fueran aún mejores. Gracias.

ÍNDICE GENERAL

| | Página |
|---|-------------|
| i. RESUMEN..... | I |
| ii. SUMMARY..... | II |
| iii. DEDICATORIA..... | III |
| iv. AGRADECIMIENTOS..... | IV |
| v. ÍNDICE GENERAL | V |
| vi. ÍNDICE DE CUADROS Y TABLAS..... | VII |
| vii. ÍNDICE DE FIGURAS | VIII |
| | |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| II. MARCO TEÓRICO..... | 2 |
| 2.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL AMARANTO | 2 |
| 2.2 COMPUESTOS FENÓLICOS | 3 |
| 2.2.1 FLAVONOIDES | 5 |
| 2.2.2 ANTOCIANINAS | 5 |
| 2.2.3 TANINOS | 5 |
| 2.3 CÁNCER | 6 |
| 2.3.1 INCIDENCIA, PREVALENCIA Y MORTALIDAD DEL CÁNCER DE COLON EN MÉXICO Y EN EL MUNDO | 6 |
| 2.3.2 ETAPAS DEL CÁNCER | 7 |
| 2.3.3 MODULACIÓN DE ANTIOXIDANTES EN CÉLULAS DE CÁNCER | 9 |
| 2.3.4 MUERTE CELULAR | 10 |
| 2.3.4.1 APOPTOSIS..... | 10 |
| 2.3.4.1.1 VÍA EXTRÍNSECA DE LA APOPTOSIS | 11 |
| 2.3.4.1.2 VÍA INTRÍNSECA DE LA APOPTOSIS | 12 |
| 2.3.4.2 NECROSIS | 13 |
| III. HIPÓTESIS | 14 |
| IV. OBJETIVOS | 14 |
| 4.1 OBJETIVO GENERAL | 14 |
| 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 14 |
| V. METODOLOGÍA | 14 |
| 5.1 DISEÑO DE ESTUDIO | 14 |
| 5.2 LUGAR DE ESTUDIO | 14 |
| 5.3 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS | 15 |
| 5.3.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS (EL) | 16 |
| 5.3.1.1 DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS | 16 |

| | |
|---|----|
| 5.3.1.2 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES.. | 16 |
| 5.3.1.3 DETERMINACIÓN DE TANINOS CONDENSADOS..... | 17 |
| 5.3.1.4 DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR DPPH | 17 |
| 5.3.1.5 DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR FRAP | 17 |
| 5.4 CULTIVO CELULAR | 18 |
| 5.4.1 LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE COLON HUMANO (HT-29) | 18 |
| 5.4.2 LÍNEA CELULAR DE FIBROBLASTOS MURINOS (NIH/3T3) | 19 |
| 5.4.3 CÁMARA DE NEUBAUER | 21 |
| 5.4.4 % DE PROLIFERACIÓN Y % DE SOBREVIVENCIA | 22 |
| 5.4.5 CI50 Y CL50 | 22 |
| 5.4.6 CITÓMETRO DE FLUJO | 22 |
| 5.4.6.1 ANEXINA V | 23 |
| 5.4.6.1.1 KIT DE ANEXINA V Y MUERTE CELULAR MUSE®..... | 24 |
| VI. ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 25 |
| VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 26 |
| 7.1 COMPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS LIOFILIZADOS (ELA Y ELM)..... | 26 |
| 7.2 EXTRACTOS DE HOJA DE AMARANTO EN CÉLULAS MURINAS Y HUMANAS..... | 26 |
| 7.2.1 CURVA DOSIS RESPUESTA (NIH/3T3)..... | 30 |
| 7.2.2 CURVA DOSIS RESPUESTA (HT-29) | 31 |
| 7.2.3 CI50 Y CL50 DEL ELA Y ELM EN NIH/3T3 Y HT-29 | 36 |
| 7.3 ANÁLISIS DEL CITÓMETRO MUSE® | 39 |
| 7.3.1 ANÁLISIS DE ANEXINA V Y MUERTE CELULAR | 40 |
| 7.3.1.1 MUERTE CELULAR EN NIH/3T3 | 40 |
| VIII. CONCLUSIÓN | 43 |
| IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 44 |

ÍNDICE DE CUADROS Y TABLAS

| | Página |
|--|--------|
| Cuadro 1. COMPUESTOS ANTIOXIDANTES DE LA HOJA DEL AMARANTO <i>A. hypochondriacus l.</i> | 6 |
| Cuadro 2. EFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS EN CÁNCER <i>in vitro</i> | 9 |
| Cuadro 3. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA LÍNEA CELULAR HT-29 | 18 |
| Cuadro 4. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA LÍNEA CELULAR NIH/3T3 | 20 |
| Tabla 1. COMPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS LIOFILIZADOS (ELA y ELM) | 28 |
| Tabla 2. CI50 y CL50 DE LOS EXTRACTOS ACUOSO Y METANÓLICO EN CÉLULAS MURINAS Y HUMANAS | 39 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Fig. 1 <i>Amaranthus hypochondriacus l.</i> FLORES Y CRECIMIENTO DE LA PLANTA..... | 2 |
| Fig. 2 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE <i>A. hypochondriacus l.</i> EN MÉXICO..... | 3 |
| Fig. 3 FOTOFRAFÍA DE LA HOJA DE AMARANTO <i>A. hypochondriacus l.</i> | 3 |
| Fig. 4 ESQUEMA DE LA CLASIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS..... | 4 |
| Fig. 5 ETAPAS DEL DESARROLLO DEL CÁNCER | 8 |
| Fig.6 COMPUESTOS FENÓLICOS EN EL DESARROLLO DEL CÁNCER | 9 |
| Fig. 7 DIAGRAMA SIMPLIFICADO DE LAS VÍAS MOLECULARES QUE REGULAN LA MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS. | 13 |
| Fig. 8 FOTOGRAFÍA DEL ROTAVAPOR BÜCHI R-200 DEL LAB. BIOLOGÍA CELULAR FCN, UAQ | 15 |
| Fig. 9 FOTOGRAFÍA DE LA LIOFILIZADORA Y FREEZER LABCONCO DEL LAB. DE NUTRICIÓN ANIMAL FCN, UAQ | 16 |
| Fig. 10. FOTOGRAFÍA DEL LECTOR DE ELISA DEL LAB. DE NUTRICIÓN HUMANA FCN, UAQ | 18 |
| Fig. 11 BAJA Y ALTA DENSIDAD DE CÉLULAS HT-29 | 19 |
| Fig. 12 BAJA Y ALTA DENSIDAD DE CÉLULAS NIH/3T3 | 20 |
| Fig. 13 REPRESENTACIÓN DE LAS PLACAS DE 24 POZOS EN AMBAS LÍNEAS CELULARES (HT-29 Y NIH/3T3)..... | 20 |
| Fig. 14 REPRESENTACIÓN DE LA CÁMARA DE NEUBAUER | 21 |
| Fig. 15 IMÁGEN DEL CITÓMETRO DE FLUJO MUSE® | 23 |
| Fig. 16 ESQUEMA DE LA EXTERNALIZACIÓN DE PS EN UNA CÉLULA APOPTÓTICA | 24 |
| Fig. 17 ESQUEMA DEL ENSAYO DE ANEXINA V Y MUERTE CELULAR MUSE® | 24 |
| Fig. 18 MOLÉCULAS DE PS EN LA SUPERFICIE EXTERNA DE LA MEMBRANA CELULAR | 25 |

| | |
|--|----|
| Fig. 19. EXTRACTO ACUOSO DE LA HOJA DE AMARANTO <i>A. hypochondriacus</i> l. ANTES Y DESPUES DE LIOFILIZAR | 27 |
| Fig. 20 EXTRACTO METANÓLICO DE LA HOJA DE AMARANTO <i>A. hypochondriacus</i> l. EN PROCESO DE CONGELACIÓN POR ACETONA EN EL FREEZER | 27 |
| Fig. 21 FOTOGRAFÍA DEL EXTRACTO METANÓLICO FILTRADO EN UN MATRAZ DE BOLA A BAÑO MARÍA LISTO PARA ROTAVAPORAR | 27 |
| Fig. 22. GRÁFICA DEL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES ELA y ELM | 29 |
| Fig. 23 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN AMBOS EXTRACTOS POR FRAP Y DPPH | 29 |
| Fig. 24 CONTENIDO DE TANINOS CONDENSADOS EN ELA Y ELM | 29 |
| Fig. 25 CONTENIDO DE ANTOCIANINAS EN ELA Y ELM | 29 |
| Fig. 26. % DE PROLIFERACIÓN DEL ELA EN NIH/3T3 | 31 |
| Fig. 27 % DE SOBREVIVENCIA DEL ELA EN NIH/3T3 | 32 |
| Fig. 28 % DE PROLIFERACIÓN DEL ELM EN NIH/3T3 | 33 |
| Fig. 29 % DE SOBREVIVENCIA DEL ELM EN NIH/3T3 | 34 |
| Fig. 30 COMPARACIÓN DEL % DE PROLIFERACIÓN ENTRE ELM Y ELA EN NIH/3T3 | 35 |
| FIG. 31 COMPARACIÓN DEL % DE SOBREVIVENCIA ENTRE ELM Y ELA EN NIH/3T3 | 35 |
| FIG. 32 % DE PROLIFERACIÓN DEL ELA EN HT-29 | 36 |
| FIG. 33 % DE SOBREVIVENCIA DEL ELA EN HT-29 | 37 |
| FIG. 34 COMPARACIÓN DEL % DE PROLIFERACIÓN DEL ELA ENTRE AMBAS LÍNEAS CELULARES | 38 |
| FIG. 35 COMPARACIÓN DEL % DE SOBREVIVENCIA DEL ELA ENTRE AMBAS LÍNEAS CELULARES | 38 |
| Fig. 36 CONTROL DE ASB 0.5% EN NIH/3T3 EN ENSAYO DE ANEXINA V Y MUERTE CELULAR | 40 |
| Fig. 37 CL50 DEL ELA EN NIH/3T3 EN ENSAYO DE ANEXINA V Y MUERTE CELULAR | 40 |
| Fig. 38 CI50 DEL ELM EN NIH/3T3 EN ENSAYO DE ANEXINA V Y MUERTE CELULAR | 41 |
| Fig. 39 GRÁFICA DEL % DE CÉLULAS DEL ELA y ELM CON EL CONTROL DE ASB EN CÉLULAS MURINAS | 41 |
| Fig. 40 INDUCCIÓN DEL AG EN CÉLULAS HEPÁTICAS | 42 |

I. INTRODUCCIÓN

El interés hacia el consumo del amaranto en la alimentación humana se ha visto favorable desde épocas antiguas (Becker et al., 1981) además el amaranto no sólo brinda semillas comestibles sino hojas para consumo humano que tienen hoy en día una gran variedad culinaria (Breene, 1991). Este cultivo de origen prehispánico en el que se consideró como sagrado, ha sido destacado en los últimos años por sus compuestos con capacidad antioxidante, la hoja por su parte es la que contiene mayor contenido de compuestos antioxidantes a diferencia de otras partes de la planta como: raíz, tallo, flor, germinado y semilla; Dentro de las especies mayormente cultivadas en México la especie *Amaranthus hypochondriacus* es la que presenta el mayor contenido de flavonoides, compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante en comparación con *A. cruentus* y *A. caudatus* (Hongyian et.al, 2015) estos compuestos son de gran importancia ya que pueden participar en la prevención de diversas enfermedades asociadas con el estrés oxidativo enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y cáncer (Valko et.al, 2007). En este contexto, los antioxidantes recientemente han recibido especial atención ante un enfoque prometedor para el cáncer, además del efecto preventivo, ya que por otra parte la actividad de una amplia gama de enzimas y receptores de las células también se modula por los polifenoles, por estas razones, además de tener propiedades antioxidantes, pueden también ser útiles como un posible tratamiento del cáncer, debido a varias acciones biológicas específicas (Dai y Mumper, 2012). Resulta interesante que a los antioxidantes se les conoce por su capacidad de secuestrar radicales libres y neutralizarlos en una célula normal, sin embargo cuando existe una elevada cantidad de antioxidantes presentes en la célula se ha sugerido un efecto pro-oxidante dando lugar a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que en elevadas concentraciones estos son tóxicos y pueden causar daño oxidativo en la célula deteniendo el ciclo celular y llevándolas a la muerte (Valko et.al, 2007). En los últimos años se ha estudiado de manera *in vitro* diversas líneas celulares de cáncer debido al posible efecto antiproliferativo y/o citotóxico provocado por diferentes tipos de extractos ricos en compuestos fenólicos y/o antioxidantes provenientes de distintas especies vegetales, los responsables de dichos efectos anticancerígenos pudieran ser los compuestos que presenten y se encuentran dependiendo de la especie o fuente vegetal y que algunos mismos puedan o no poseer capacidad antioxidante, ejemplos de estos compuestos son los compuestos fenólicos, taninos, antocianinas, flavonoides entre otros (Roleira et.al, 2015).

II. MARCO TEÓRICO

2.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL AMARANTO

El género *Amaranthus* proviene de la palabra del griego “amarantos” que significa: imperecedera o no se marchita, lo que alude a la resistencia de la planta ante diversas situaciones climáticas (Amicarelli y Camaggio, 2012, Morales et.al., 2009) pertenece a la familia *Amaranthaceae* e incluye más de 60 especies de amaranto entre las que destacan la *Amaranthus hypochondriacus l.* (Stallknecht y Schulz-Schaeffe, 1993). El amaranto es una planta con hojas brillantes coloreadas y flores violetas, anaranjadas, rojas y doradas, las panojas algunas más de 50 cm de largo, parecen a las del sorgo, están formadas por muchas espigas que contienen numerosas florecitas pequeñas, que alojan a la pequeña semilla (0.9 - 1.7 mm de diámetro), estas se producen en cantidades masivas, la planta del amaranto puede llegar a medir hasta 3 metros de alto (Stallknecht y Schulz-Schaeffe, 1993). Es uno de los pocos cultivos considerado como de usos múltiples, ya que pueden suministrar además de semillas, verduras por sus hojas de alta calidad nutricional como alimento humano (Breene, 1991, Abbott y Campbell, 1982). Desde la antigüedad hasta nuestros días, el amaranto es un producto de alta calidad nutritiva y un aliado de la salud humana (Becker et al., 1981), el interés por su amplio consumo en la alimentación humana ha crecido en las últimas décadas debido a los informes favorables del valor nutricio del amaranto y beneficios para la salud (Millán et.al., 2012).



Figura 1. *Amaranthus hypochondriacus l.* Flores y Crecimiento de la planta. (Fern et.al, 2014).

En México se cultivan principalmente las especies *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*, (Mohinder , 1971, Álvarez-Jubete et al., 2010). El *A. hypochondriacus* tiene un crecimiento anual

rápido y es la especie de mayor robustez y rendimiento, debido a su capacidad de producir grandes inflorescencias de semillas comestibles (Mohinder, 1971; Legaria, 2010).

México es uno de los principales productores de amaranto a nivel mundial junto con Guatemala, Perú, Ecuador, Estados Unidos y República Checa. Entre los principales estados productores de amaranto en México se encuentran Puebla, Morelos, Tlaxcala, el Distrito Federal, el Estado de México y Guanajuato, según datos publicados en la SAGARPA y SEFOA en el 2014.



Figura 2. Distribución Geográfica de *A. hypochondriacus l.* en México (Espitia-Rangel et.al, 2010).

A menudo se distinguen plantas que sirven de alimento tanto su grano como su hoja y el amaranto es una de ellas (Amicarelli y Camaggio; 2012) sus hojas pueden ser consumidas o utilizadas desde que son pequeñas hasta que son más maduras, así como su raíz (Stallknecht y Schulz-Schaeffe, 1993) la hoja es preparada con una variedad de platillos gastronómicos donde se incluye a esta misma en diferentes cocciones, como fresca para ensaladas o en agua fresca, o cocida en sopas y guisados (Abbott y Campbell, 1982).



Figura 3. Fotografía de Hoja de Amaranto *A. hypochondriacus l.*

En contraste con el grano de amaranto, las hojas han recibido significativamente menor atención para ser estudiadas y analizadas (Makus, 1984). Sin embargo las hojas de amaranto como verdura

han sido comparadas con otras hojas comestibles que incluso son parte de la dieta humana como la espinaca (Abbott y Campbell, 1982). La hojas frescas de amaranto contienen de 27 a 53 kcal/100 g y un valor elevado de proteína de 4 - 6 g, 0.2 - 0.6 g de grasa y 4 - 7 g de hidratos de carbono en 100 g respectivamente (Uusikua, 2010). y son considerablemente más altas en contenido de calcio, hierro y fósforo (Makus, 1984, Igbokwe et al. 1988). También las hojas del amaranto comparada con algunos otros vegetales verdes tradicionales es rica en compuestos Fenólicos, Flavonoides y Capacidad Antioxidante (Khair et.al., 2012).

2.2 COMPUESTOS FENÓLICOS

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, es decir productos sintetizados en las plantas que poseen la característica biológica de ser productos secundarios de su metabolismo. 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). Muchos trabajos han demostrado el efecto que tienen los fenoles sobre el ciclo celular en células tumorales en cultivos *in vitro*. Esto ha sido demostrado en células de varios tipos de leucemia, cáncer de estómago, de pulmón, de colon, de vejiga, y próstata (Kuo, 1996). Los fenoles también pueden proteger frente al cáncer mediante su inhibición del daño oxidativo del ADN (Omenn, 1995).

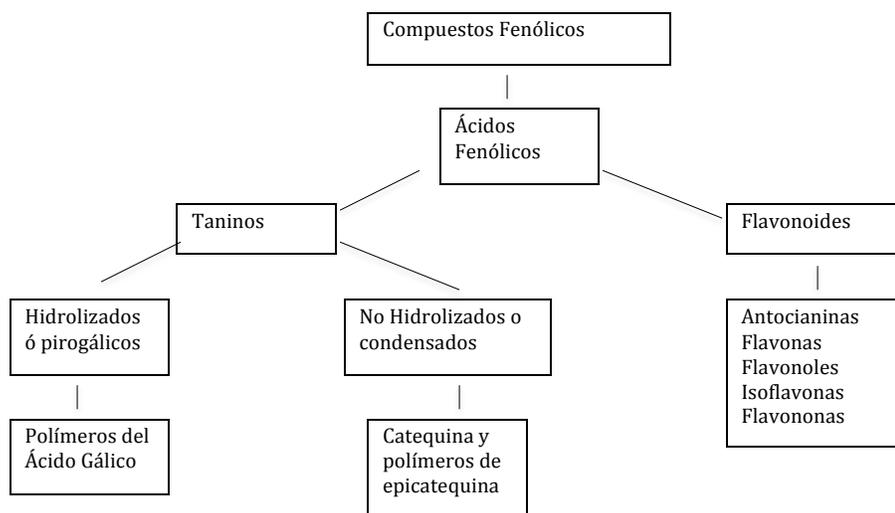


Figura 4. Clasificación Esquemática de los Compuestos Fenólicos (Badui Dergal et.al, 2006).

En el Cuadro 1 se muestra lo encontrado en un estudio sobre la caracterización de la hoja de amaranto *A. hypochondriacus L.* extraídos en diferentes solventes en cuanto a sus compuestos antioxidantes.

2.2.1 FLAVONOIDES

Los flavonoides son un grupo de los compuestos fenólicos (flavonoides, antocianinas y taninos) contienen dos anillos aromáticos unidos por un anillo heterocíclico. Los compuestos fenólicos reaccionan fácilmente con un ácido orgánico o un azúcar, como los flavonoides y las antocianinas, o entre sí para formar polímeros, como los taninos (Badui Dergal et.al, 2006).

2.2.2 ANTOCIANINAS

Las antocianinas son los compuestos fenólicos solubles en agua, se consideran una subclase de los flavonoides, son responsables de la pigmentación roja, azul y púrpura principalmente, las antocianinas son formas catiónicas de flavilo, por lo que se sabe que el núcleo de flavilo es deficiente en electrones y por lo tanto muy reactivo, lo que lo hace muy sensible a cambios de pH. Al madurar las frutas, el pH cambia, y con ello el color, estos cambios de las antocianinas se deben a modificaciones en su estructura, debido a una deficiencia del núcleo de flavilo, estos pigmentos funcionan como verdaderos indicadores de pH (Baublis et.al, 1994; Cheynier, 1999). Las antocianinas son estables a bajo PH y en presencia de oxígeno, exposición a la luz, o altas temperaturas las antocianinas se degradan (Walton et al. 2006). Después de la administración oral, las antocianinas pueden ser absorbidos directamente desde el tracto gastrointestinal (principalmente en el estómago y el intestino delgado) (Felgines et al 2006; Talavera et al 2004). 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). Se expresan en cianidina-3-glucósido al ser la cianidina la antocianina más abundante de la parte comestible de las plantas (Ghosh y Konishi 2007).

2.2.3 TANINOS

Son una clase de compuestos fenólicos incoloros pero por medio de una modificación química pueden formar su correspondiente antocianina coloreada, tienen sabor astringente y

amargo, son solubles en agua, alcohol y acetona. De acuerdo con su estructura y reactividad con agentes hidrolíticos, particularmente ácidos, se han dividido en dos grupos: taninos hidrolizables o pirogálicos y taninos no hidrolizables o condensados. Los taninos no hidrolizables o condensados son dímeros de la catequina o de antocianidinas y tienen una estructura flavonoide (Cheynier, 1999). Los taninos se consideran también antioxidantes, con capacidad de atrapar los radicales libres y se oxidan con facilidad en presencia de oxígeno (Badui-Dergal et.al, 2006).

Cuadro 1. Compuestos Antioxidantes de la hoja de Amaranto *A. hypochondriacus l.*

| Solvente | Compuesto | Autor |
|----------|--|---------------------------|
| Metanol | 2-Methoxy-4-vinylphenol | (López-Mejía et.al, 2014) |
| Hexano | Retinoic acid, methyl ester 24,25-Dihydroxyvitamin D | (López-Mejía et.al, 2014) |
| Etanol | 2-Methoxy-4-vinylphenol | (López-Mejía et.al, 2014) |

2.3 CÁNCER

El cáncer es una enfermedad en la que las células anormales se dividen sin control y pueden invadir otros tejidos (metástasis), 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, las células cancerosas son capaces de formar tumores malignos que tienden a crecer de manera invasiva, afectando tejidos y órganos normales (Cox y Sinclar, 1998 ; Byrnes et. al, 2014).

2.3.1 INCIDENCIA, PREVALENCIA Y MORTALIDAD DE CÁNCER COLORECTAL (CCR) EN MÉXICO Y EN EL MUNDO

El cáncer es uno de los mayores problemas de salud y de las principales causas de muerte en el mundo, la probabilidad de desarrollar algún tipo de cáncer en la población va en aumento debido a los malos hábitos y factores ambientales, aunado a la predisposición genética. La Organización Mundial de la Salud reportó 8,2 millones de defunciones en el 2012 y se prevé que

los casos anuales de cáncer aumenten de 14 millones en 2012 a 22 millones en unas décadas (OMS,2014), Siendo el cáncer de pulmón, estómago, colon, hígado y mama entre los más frecuentes de entre 100 tipos de cáncer conocidos (OMS,2014). Los tipos de cáncer con mayor prevalencia son el cáncer de pulmón (12.7%), de mama (10.9%), colorectal (9.7%), y estómago (7.81%) (Bray et.al, 2013). Ocupando el 4to lugar en mortalidad el CCR a nivel mundial y una incidencia del 5% presentando 6,437 casos en 2008 (GLOBOCAN, 2008). En México el cáncer representa la tercer causa de muerte (OMS, 2013) y el INEGI reportó en 2010 que el 13% de las muertes en México fueron por cáncer, de las cuales 5.4% son por CCR (Aldaco et.al, 2012). Este cáncer (CCR) ocupa el tercer lugar más común en hombres y el segundo en mujeres, y sus factores de riesgo están ligados con la edad (más propenso arriba de los 40 años) existe una sensibilidad heredada sin embargo la mayoría de los casos son esporádicos y no familiares; En 1980 con la medida de extirpación de pólipos y la detección temprana del cáncer de colon los casos de mortalidad se redujeron (Instituto Nacional de Cancerología y Sociedad Americana del Cáncer, 2014).

2.3.2. ETAPAS DEL CÁNCER

En el desarrollo del cáncer se pueden diferenciar tres etapas principales (Figura 5). 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 rasgo distintivo de esta etapa terminal es la capacidad de escapar, invadir y colonizar o metastatizar órganos distantes (Fidler, 2003).

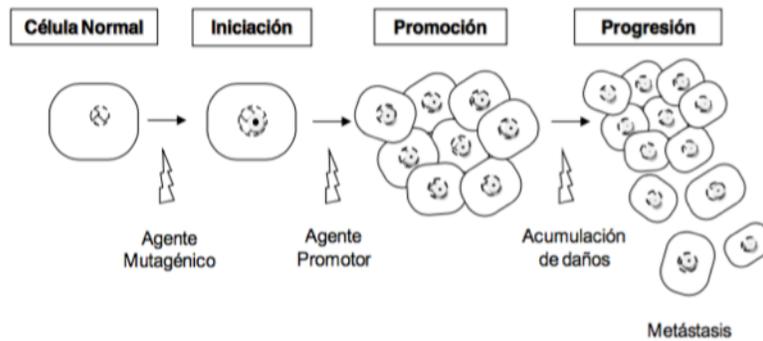


Figura 5. Etapas del Desarrollo del Cáncer (Cornejo et.al, 2012)

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. 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 estos genes supresores de tumores que codifican para componentes de los mecanismos de control del ciclo celular, mismos que 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 tumorogénesis (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 et.al, 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 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).

2.3.3. MODULACIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES EN CÉLULAS DE CÁNCER

Se ha estudiado 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).

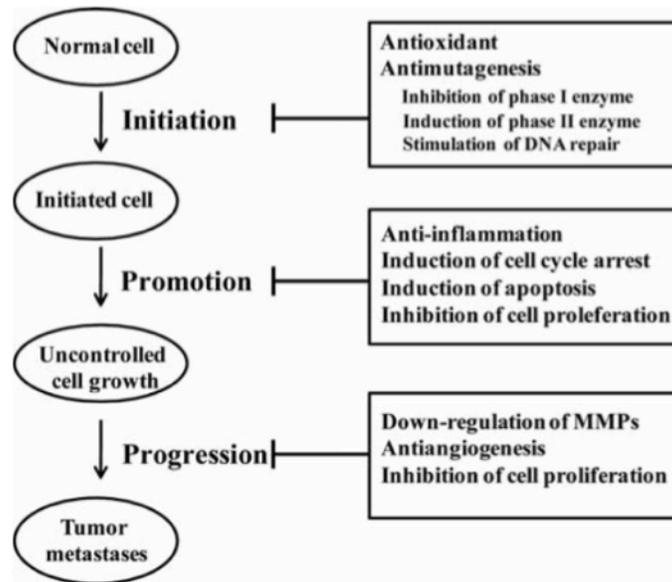


Figura 6. Compuestos fenólicos en el desarrollo del cáncer (Day y Mumper, 2010)

Cuadro 2. Efectos Biológicos de los Compuestos Fenólicos en Cáncer *in vitro*

| Característica | Compuesto | Autor (es) |
|---|--|--|
| Promoción de Arresto de Ciclo celular y apoptosis | Polifenoles, Antocianinas, flavonoides | Maher et.al, 2011; Wang et.al, 2013; Yang et.al, 2012) |
| Modulación de Oncogenes | Fenoles | Atalay et.al, 2003 |
| Metilación de genes relacionados con la supresión de cáncer | Fenoles, Curcumina, Antocianinas | Atalay et.al, 2003; Link et.al, 2013; Wang et.al, 2013 |

Otros polifenoles actúan inhibiendo la proliferación celular que se encuentra completamente desregulada en los casos de cáncer. Esta inhibición de la proliferación ha sido demostrada *in vitro* en muchas líneas celulares tumorales. Por ejemplo, Kuo publicó el efecto antiproliferativo de los flavonoides sobre células de carcinoma de colon a través de mecanismos de inducción de la apoptosis. Aunque los efectos antiproliferativos de los polifenoles en general, y flavonoides e isoflavonoides en particular en cultivos celulares parece bien demostrado, existen relativamente pocos datos en relación con la actividad antiproliferativa *in vivo*, y no se conoce prácticamente nada de la relevancia clínica de esta bioactividad (Kuo, 1996; Birt et.al, 2001). Los polifenoles también pueden proteger frente al cáncer mediante su inhibición del daño oxidativo del ADN (Omenn,1995).

2.3.4. MUERTE CELULAR

La muerte celular puede ser producida por necrosis o apoptosis. En la apoptosis la célula dirige por sí misma su programa de muerte, es decir la célula muere de una manera controlada que finaliza en la muerte celular individual sin alterar la estructura de las células vecinas (Bialostozky et.al, 2008). ya sea porque fue determinada genéticamente o porque fue inducida por señales originadas del exterior (Saiukumar et.al, 1999). Para la homeostasis del organismo resulta esencial la existencia de un balance adecuado entre mitosis y apoptosis ya que nuestro organismo se encuentra en constante recambio celular. En cambio, en la necrosis el proceso es diferente: la ruptura del ADN ocurre en forma descontrolada, la membrana celular es lesionada de manera abrupta por causas mecánicas, térmicas o químicas produciendo desnaturalización de las proteínas, daño nuclear con pérdida de la integridad de la membrana, liberando residuos y sustancias celulares al exterior, lo cual provoca inflamación (Shirai, 1999).

2.3.4.1 APOPTOSIS

La apoptosis se caracteriza por la muerte celular que ocurre en ausencia de inflamación en las células o en los tejidos vecinos, y se define por las características morfológicas específicas tales como fragmentación de la cromatina y del citoplasma. La cromatina se condensa y el DNA es cortado entre los nucleosomas, el citoplasma experimenta condensación, reducción de volumen y fragmentación con formación de los denominados cuerpos de apoptoticos (Bialostozky et.al, 2008). La apoptosis es un proceso que no deja secuelas en el tejido que la sufre, debido a la ausencia de respuesta inflamatoria y a que los fragmentos celulares son fagocitados por los macrófagos

(Giansanti et.al, 2011). 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. Pero 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). La mayoría de los cambios morfológicos, tales como la fragmentación nuclear y de las proteínas celulares, son causados por las caspasas (Cysteine Aspartyl Specific Proteases) son parte de la familia de las cisteína-proteasas, que juegan un papel clave en el proceso de apoptosis (Lakhani et.al, 2006). 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 (Wang et.al, 2014). Existen dos grandes grupos de acuerdo a su función; iniciadoras, como la 8 y la 9 y las efectoras, como la 3, 6 y la 7, las cuales son dependientes de las iniciadoras para poder ejercer su función (Wolf y Green, 1999). 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 et.al, 2013). La activación de la apoptosis mediante las caspasas se ejecuta a través de una vía común activando la caspasa 3. Se pueden utilizar dos vías no excluyentes entre sí (Figura 6): una vía extrínseca, a través de receptores situados en la membrana llamados receptores celulares de muerte (Death Cell Receptors), que pertenecen a la familia del factor de necrosis tumoral (FNT) cuyos prototipos son FAS y su ligando APO/ FAS y TNRF1, o bien, mediante una vía intrínseca, mediante la liberación del activador mitocondrial del tipo citocromo C, que es translocado del espacio intermembranal al citosol que conduce a su vez a la formación del apoptosoma y a la activación de la cascada de las caspasas (Serasinghe et.al, 2014).

2.3.4.1.1 VÍA EXTRÍNSECA DE LA APOPTOSIS

Esta vía comienza con la activación de un receptor en la superficie a través de la unión de un ligando de muerte, formando un complejo multiproteico de muerte celular llamado DISC (Death Induction Signaling Complex) este se une a una proteína adaptadora, denominada proteína con un dominio de muerte asociado a FAS (Fas-Associated Via Death Domain, FADD), que a su vez

recluta a la procaspasa 8 a través de los dominios de receptores de muerte por lo tanto se activa la la procaspasa-8 que rompe y activa a la procaspasa-3 y a Bid, una proteína pro-apoptótica de la familia Bcl-2, a través de la cual se unen las vías extrínseca e intrínseca de muerte celular (Figura 6) (Crow et.al, 2004). 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 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 et.al, 2006). Los miembros de la familia de proteínas Bcl-2 controlan la apoptosis bloqueándola o induciéndola. 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 (Pimentel y Benaim, 2012).

2.3.4.1.2 VÍA INTRÍNSECA DE LA APOPTOSIS

A diferencia de la vía extrínseca, que traduce señales específicas de estímulos para la muerte celular, la vía intrínseca integra una amplia gama de agresiones extra e intracelulares, que incluyen las deficiencias en nutrientes, las radiaciones y otros tipos de estrés químicos y físicos como estrés oxidativo, daño al ADN etc., estas señales convergen en la mitocondria llevándola a su disfunción y a la liberación de 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, se forma a través de la acción de los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2 de proteínas que 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). Una vez que el citocromo C es liberado, se une a la proteína adaptadora (APAF-1, Apoptotic Protease Activating Factor-1) en presencia de ATP, esta proteína sufre un cambio en su conformación lo que resulta en el reclutamiento de la procaspasa-9. El complejo así formado da como resultado una estructura conocida como el apoptosoma, el que atrapa y activa a la pro- caspasa-3 (Kluck et.al, 1997). La caspasa-3, producto de la activación de la procaspasa-3, inicia la fase ejecutora de la apoptosis (Figura 7) (Szliszka y Krol, 2015).

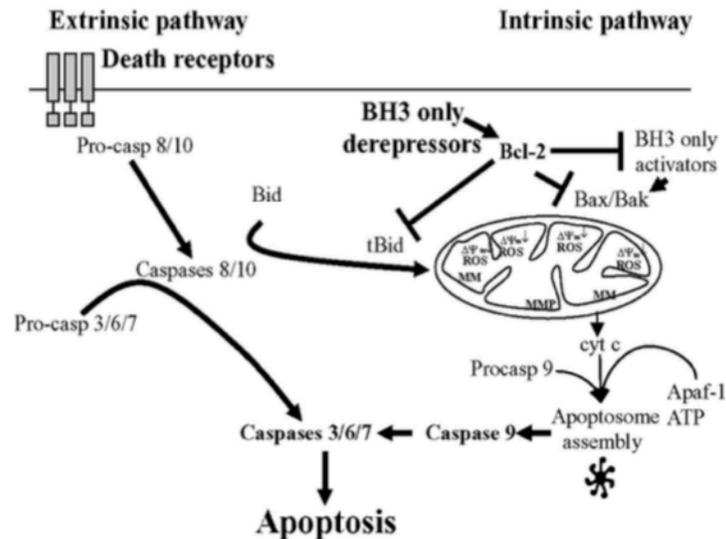


Figura 7. Diagrama simplificado de las vías moleculares que regulan la muerte celular apoptótica (Wlodkowic et.al, 2011).

2.3.4.2 NECROSIS

La necrosis puede describirse como un colapso metabólico celular y ocurre cuando una célula ya no mantiene la homeostasis iónica (Dive et.al, 1992). Las células que mueren por necrosis generalmente desde las primeras etapas ya hay daño, sus organelos se edematizan y hay pérdida de sus estructuras, aglutinación en el núcleo y lisis en la cromatina nuclear ya que la entrada de agua en la célula causa hinchazón y a menudo ruptura de compartimentos de membrana (Moquin y Chan, 2010). La necrosis es típicamente inducida por extremos en el ambiente externo de la célula, tales como hipoxia, tóxicos activos de membrana y venenos respiratorios tales como cianuro (Leathwood y Plummer; 1969). Otro aspecto importante de la necrosis es que hay inflamación (White et.al, 2014). A medida que los niveles de ATP se agotan y los gradientes de iones transmembrana se disipan, la célula se hincha y los organelos internos se dilatan. Inicialmente, se observa una burbuja reversible de la membrana plasmática. Pasado un punto sin retorno, la membrana se rompe, derramando enzimas lisosómicas al exterior (Leathwood y Plummer; 1969). En muchos cánceres, la inflamación puede ser un componente importante del proceso que promueve la tumorigénesis, la comprensión de la necrosis es importante en la biología del cáncer por varias razones ya que los cánceres que contienen altos niveles de necrosis a menudo tienen un mal pronóstico. Puede ser debido a que tales cánceres crecen tan rápidamente que superan su suministro de sangre (White et.al, 2014).

III. HIPÓTESIS

El efecto Citotóxico de los Extractos Acuoso y Metanólico de la hoja de Amaranto "*A. hypochondriacus l.*" inducirá a muerte celular en las células de cáncer de colon humano (HT-29) y en fibroblastos murinos (NIH/3T3).

IV. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el efecto Citotóxico y los parámetros de muerte celular inducido por los extractos de la hoja de Amaranto "*A. hypochondriacus l.*" sobre las línea celulares de cáncer de colon humano (HT-29) y fibroblastos murinos (NIH/3T3).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Comparar el contenido de Compuestos Fenólicos Totales, Antocianinas, Taninos Condensados y la capacidad antioxidante de los extractos (acuoso y metanólico) de la hoja de Amaranto "*A. hypochondriacus l.*".
- Obtener la concentración letal media (CL50) y la concentración inhibitoria media (CI50) del Extracto Liofilizado Acuoso (ELA) y el Extracto Liofilizado Metanólico (ELM) en ambas líneas celulares (HT-29 y 3T3).
- Evaluar parámetros de Muerte Celular (Apoptosis vs Necrosis)

V. METODOLOGÍA

5.1 DISEÑO DE ESTUDIO

El presente estudio es experimental controlado.

5.2 LUGAR DE ESTUDIO

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Celular y el contiguo laboratorio de cultivo celular, en la Facultad de Ciencias Naturales Campus Juriquilla de la Universidad Autónoma

de Querétaro; ubicado en Av. de las Ciencias s/n Juriquilla, Delegación Santa Rosa Jáuregui, Querétaro, C.P. 76230.

5.3 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

La semilla de Amarantho "*Amaranthus hypochondriacus L.*", se obtuvo del (INIFAP) Celaya, se sembró en un invernadero de la Facultad de Ingeniería, campus Amazcala de la Universidad Autónoma de Querétaro. Posteriormente, las hojas de Amarantho fueron secadas en la estufa del Laboratorio de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Naturales a una temperatura constante de 40°C por 24 hrs y se pulverizó en el molino del Laboratorio de Bromatología a un tamiz de 0.5 mm, se obtuvo la harina de la hoja de Amarantho y se almacenó a -80°C. Para la obtención de los extractos se tomaron 10 g de la harina de hoja de Amarantho y se reconstituyó en 1,000 ml de dos posibles mezclas: metanol/agua en proporción 80/20 %_v y otro 100% agua (destilada), colocándolos en agitación constante y en ausencia de luz (Figura 6) por 16 hrs, los diferentes extractos se filtraron y en el caso del extracto metanólico se rotaevaporó (BUCHI R-200) a una temperatura de 45°C a baño maría y con una presión de vacío oscilando entre los 10 mbar por un periodo de 6 horas aproximadamente, posteriormente ambos extractos fueron liofilizados (LABCONCO) por 72 hrs a una presión $<133 \times 10^{-10}$ mbar y a una temperatura de -45°C posteriormente, almacenados en ultra congelación a -80°C.



Figura 8. Fotografía del Rotavapor BÜCHI R-200 del Lab. Biología Celular, FCN, UAQ.



Figura 9. Fotografía de la Liofilizadora y Freezer (LABCONCO) del Lab. Nutrición Animal, FCN, UAQ.

5.3.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS LIOFILIZADOS (EL)

Ambos extractos liofilizados (acuoso y metanólico) se caracterizaron en cuanto a su Capacidad Antioxidante (CA) por dos métodos, DPPH y FRAP, Compuestos Fenólicos Totales (CFT) por el método de Folín Ciocalteu, Antocianinas (AT) por diferenciación de pH y Taninos Condensados (TC) por el método de catequina vainillina.

5.3.1.1. 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 flavilo que presenta coloración y de esta forma poder cuantificarlas espectrofotométricamente (Deighton et.al, 2000). La muestra se leyó a una absorbancia de 535 nm en el espectrofotómetro de ELISA. La concentración de antocianinas totales en la muestra ($\mu\text{L}/\text{Kg}$) se calculó como cianidina 3-glucósido. Todos los análisis se realizaron por triplicado y los resultados finales se reportan en mg Eq cianidina 3-glucósido por 100 g de EL.

5.3.1.2. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES

El método empleado fue el de Folín-Ciocalteu, descrito por Palomino y col., en 2009, el cual está basado en la reducción de ácido gálico por compuestos fenólicos en presencia de un álcali (carbonato de sodio). La placa se dejó reposar 1.5 hrs en la oscuridad a temperatura ambiente. Después del reposo se leyó a una absorbancia de 750 nm en el espectrofotómetro lector de ELISA.

5.3.1.3. 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). 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 et. al, 2000). Se leyó cada muestra a una absorbancia de 500 nm en un espectrofotómetro lector ELISA (Figura 8)

5.3.1.4 DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR 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). Se dejó reposar por 30 min y se leyó la absorbancia a 517nm en el espectrofotómetro lector ELISA (Figura 8).

5.3.1.5 DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR 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).



Figura 10. Fotografía del Lector ELISA del Laboratorio de Nutrición Humana de la FCN, UAQ.
(Thermo)

5.4 CULTIVO CELULAR

5.4.1. LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE COLON HUMANO (HT-29)

Se utilizó la línea celular HT-29 (ATCC® HTB-38™) de adenocarcinoma colónico humano, se sembraron en Medio DMEM (Gibco) suplementado al 10% de Suero Fetal Bovino (SFB), se realizaron 4 repeticiones de la Curva Dosis-Respuesta, sembrando en cajas de 24 pozos, se sembraron 1.5×10^3 células por pozo, se mantuvieron en condiciones de temperatura a 37°C, en una atmósfera de CO₂ del 5%. Se sincronizaron las células cambiando las condiciones al reducir la suplementación del SFB al 2% por un periodo de 24 hrs y se aplicaron las concentraciones de los ELA y ELM en medio DMEM más ASB al 0.5% por duplicado (2 pozos por concentración) por cada caja, las concentraciones fueron las siguientes: 0.01, 0.1, 1, 10, 100 µg Eq de Ácido Gálico por 24 hrs. Se realizó un control inicial (2 pozos) ó llamado “Control de Supervivencia” y un Control de Albumina Sérica Bovina al 0.5% (ASB) (2 pozos) ó “Control de Proliferación” (Figura 13).

Cuadro 3. Características Generales de la Línea Celular HT-29

| CARACTERÍSTICAS | HT-29 |
|------------------------|----------------------------|
| Organismo | Humano <i>homo sapiens</i> |
| Tejido | Colon |
| Morfología | Epitelial |
| Propiedades de cultivo | Adherentes |
| Enfermedad | Adenocarcinoma colorectal |
| Edad | Adulto, 44 años |
| Género | Femenino |
| Etnia | Caucásica |

| | |
|---------------------|---|
| Derivación | Tumor primario en 1964 por J. Fogh |
| Expresión Antígena | RH+, más grupo sanguíneo A. |
| Oncogenes | myc +; ras +; myb +; fos +; sis +; p53 +; abl -; ros -; src - |
| Productos Celulares | componente secretor de IgA; antígeno carcinoembrionario (CEA); factor de crecimiento transformante beta proteína de unión; mucina |

(ATCC, 2014)

ATCC Number: **HTB-38**

Designation: **HT-29**

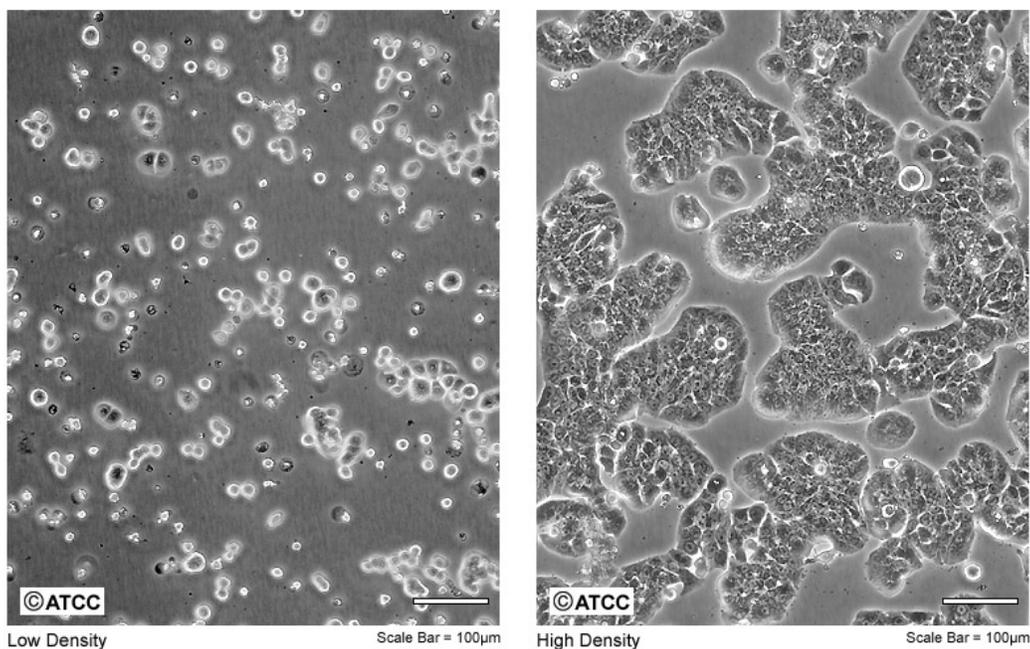


Figura 11. Baja y Alta densidad de células de cáncer de colon humano HT-29 (ATCC, 2014)

5.4.2. LÍNEA CELULAR DE FIBROBLASTOS MURINOS (NIH/3T3)

Se utilizó la línea celular NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658™) de fibroblastos embrionarios murinos, se sembraron en Medio DMEM (Gibco) suplementado al 10% de Suero Fetal Bovino (SFB), se realizaron 4 repeticiones de la Curva Dosis-Respuesta, sembrando en cajas de 24 pozos, se sembraron 1×10^3 células por pozo, se mantuvieron en condiciones de temperatura a 37°C, en una atmósfera de CO₂ del 5%. Se sincronizaron las células cambiando las condiciones al reducir la suplementación del SFB al 2% por un periodo de 24 hrs y se aplicaron las concentraciones de los ELA y ELM en medio DMEM más ASB al 0.5% por duplicado (2 pozos por concentración) por cada caja, las concentraciones fueron las siguientes: 0.01, 0.1, 1, 10, 50, 100 µg Eq de Ácido Gálico por 24 hrs. Se realizó un control inicial (2 pozos) ó llamado “Control de Supervivencia” y un

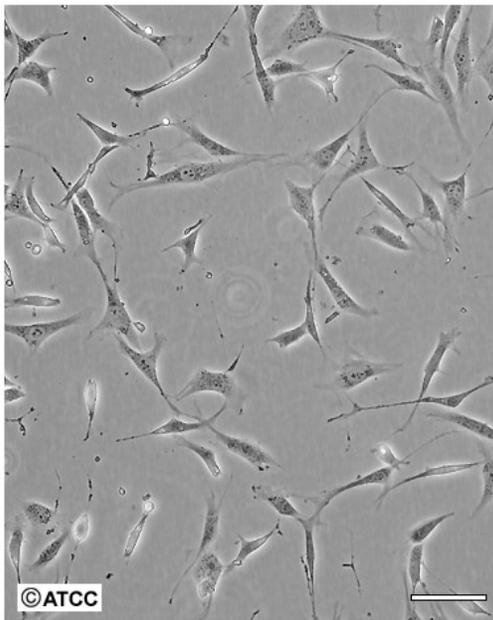
Control de Albumina Sérica Bovina al 0.5% (ASB) (2 pozos) ó “Control de Proliferación” (Figura 13).

Cuadro 4. Características Generales de la Línea Celular NIH/ 3T3

| CARACTERÍSTICAS | NIH/3T3 |
|------------------------|--|
| Organismo | <i>Mus musculus</i> , ratón |
| Tejido | Embrionario |
| Morfología | Fibroblastos |
| Propiedades de cultivo | Adherentes |
| Edad | Embrionario |
| Etnia | NIH/suizos |
| Expresión Antígena | Suceptible al virus murino de leucemia |

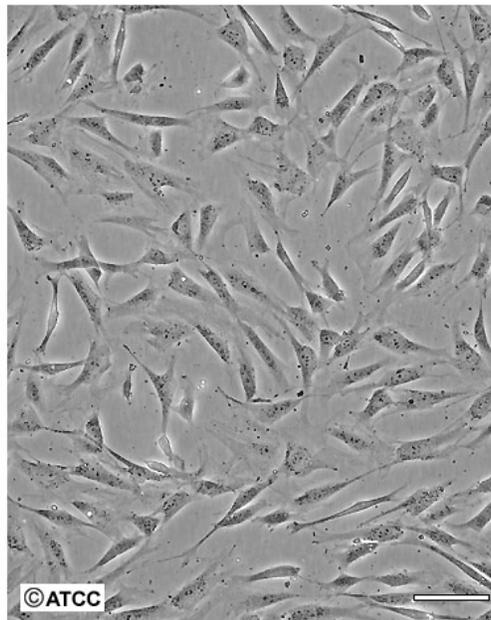
(ATCC, 2014)

ATCC Number: **CRL-1658**
 Designation: **NIH/3T3**



Low Density

Scale Bar = 100µm

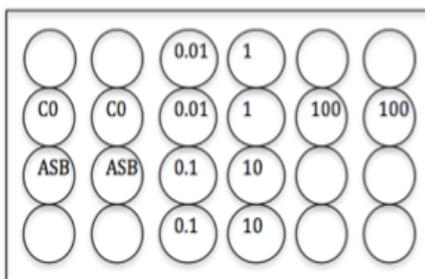


High Density

Scale Bar = 100µm

Figura 12. Baja y Alta densidad de fibroblastos murinos NIH/3T3 (ATCC, 2014)

A



B

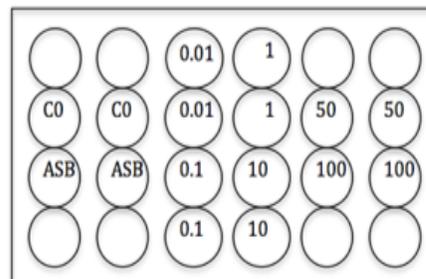


Figura 13. Representación de las placas de 24 pozos de HT-29 (A) y NIH/3T3 (B).

Las concentraciones utilizadas en las curvas dosis-respuesta para los ELA y ELM fueron las mismas basándose en la cantidad de la determinación de Compuestos Fenólicos Totales de los mismos. En ambas líneas celulares son expresadas en μg Equivalentes de Ácido Gálico (μg Eq de AG) de cada EL.

En la Figura 13 la representación por pozo de las concentraciones en las placas de 24 pozos, aquellos en blanco fueron llenados con Agua Esterilizada. En la línea celular murina se realizó una concentración más que en la de cáncer de colon añadiendo la concentración de $50 \mu\text{g}$ Eq de AG.

5.4.3 CÁMARA DE NEUBAUER

La cámara de conteo es un aparato de vidrio óptico especial de precisión. Se utiliza para contar células u otras partículas en suspensiones bajo el microscopio (Bastidas O, 2015).

En la Figura 14 (B) los cuatro cuadrantes de los extremos tanto superiores como inferiores y que cuentan con 16 cuadros mas pequeños en blanco, ahí es donde se realizó el conteo de las células por microscopio invertido discriminando a aquellas células de los bordes internos (marcados en negro oscuro en la imagen), la cámara cuenta con dos hemocitómetros (superior e inferior), contando cada hemocitómetro sería un conteo independiente.

Se realizaron 4 conteos independientes en un Hemocitómetro (Cámara de Neubauer) por medio de la fórmula:

$$(\text{Número de células} / \text{Número de campos}) \times 10,000 \times \text{ml de la suspensión celular}$$

(Bastidas O, 2015).

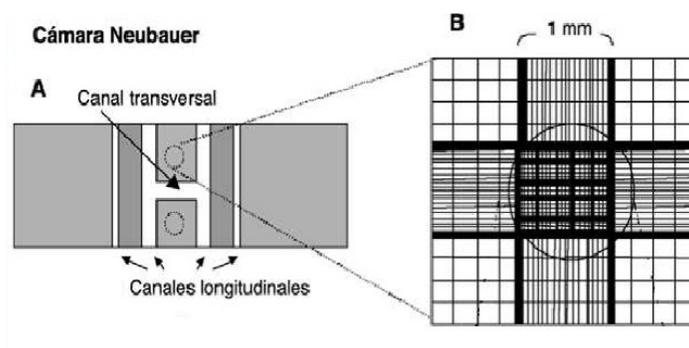


Figura 14. Representación de la Cámara de Neubauer (Bastidas O, 2015).

5.4.4 % PROLIFERACIÓN y % SOBREVIVENCIA

La proliferación celular se calculó de acuerdo a la ecuación:

$$\%P = (\text{Número de células por pozo} \times 100) / \text{Número de células del control de ASB 0.5\%}$$

La sobrevivencia celular se calculó mediante la ecuación:

$$\%S = (\text{Número de células por pozo} \times 100) / \text{Número de células del control inicial}$$

5.4.5 CI50 y CL50

La Toxicidad es la capacidad de una sustancia química de causar daños a los organismos vivos, se refiere a los efectos adversos ocurridos dentro de un período de tiempo después de la administración de una única dosis. Se suele presentar en forma de dosis o concentración letal media (DL_{50} o CL_{50}), que es la expresión derivada estadísticamente de una dosis o concentración que es letal para el 50% de los organismos de prueba expuestos durante un período definido de tiempo, esta depende de la cantidad de la sustancia administrada o absorbida y del tiempo de exposición a ella (Gad, 2014). La concentración inhibitoria medio (CI50) es una medida de la eficacia de una sustancia en la inhibición de una función biológica o bioquímica específica. Esta medida cuantitativa indica cuánto de una sustancia (inhibidor) se necesita para inhibir a la mitad un proceso biológico dado (o componente de un proceso, es decir, una enzima, célula, receptor celular o microorganismo) (Cheng y Prusoff, 1973). Las concentraciones inhibitorias del 50% de la proliferación celular (CI50) se calcularon mediante regresión lineal del log de la concentración contra el porcentaje de proliferación y las concentraciones letales del 50% de la sobrevivencia celular (CL50).

5.4.6 CITÓMETRO DE FLUJO

La citometría de flujo representa un método rápido objetivo y cuantitativo de análisis de células, núcleos, etc. en suspensión. Es un método que permite la medición rápida de ciertas características físicas y químicas de células o partículas suspendidas en líquido que producen una señal de forma individual al interferir con un haz de luz. Una de las características analíticas más importantes de los citómetros de flujo es su capacidad de medir múltiples parámetros celulares, como el tamaño, forma y complejidad y, por supuesto, cualquier componente celular que pueda ser marcada con un fluorocromo (Shapiro; 2003).

En este trabajo, para ver marcadores de muerte celular se utilizó Citómetro de Flujo Muse® (Figura 15) y se utilizó el kit de Anexina V y Muerte Celular Muse® para ver si los EL de la hoja de Amaranto indujeron a apoptosis.



Figura 15. Imagen del Citómetro de Flujo Muse® (Merck Millipore, 2016)

5.4.6.1 ANEXINA V

La Anexina V se utiliza para evaluar la apoptosis temprana y tardía (Merck Millipore, 2016). El ensayo se basa en la translocación de la fosfatidilserina (PS) a la superficie exterior de la membrana celular, un evento asociado a menudo con el inicio de la apoptosis ya que es una de las maneras más inconfundibles de detectar la apoptosis en estadios tempranos comprobando la localización de la PS en la membrana plasmática; La PS es un tipo de fosfolípido que en células viables se mantiene en la monocapa interior de la membrana celular cuando se empieza a desencadenar el proceso de la apoptosis, la PS migra a la capa externa de la membrana, esta localización puede ser detectada fácilmente ya que la Anexina V se une específicamente a la PS en una reacción dependiente de calcio, las moléculas de Anexina V se marcan con diferentes fluoróforos para detectar apoptosis mediante diversas técnicas como, por ejemplo, citometría de flujo (Callahan et.al, 2003). En estadios tardíos de apoptosis, cuando la membrana plasmática ha perdido su integridad y el DNA se hace accesible, se emplean moléculas fluorescentes que actúan como agentes intercalantes en los ácidos nucleicos de doble cadena (y, por tanto, en el DNA) como el Yoduro de Propidio (PI) y la 7 aminoactinomicina D (7-AAD) (Wlodkowic et.al, 2011).

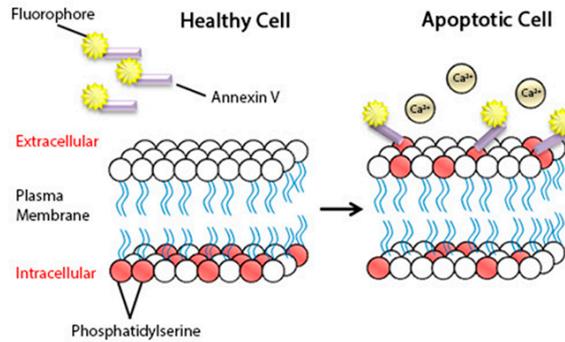


Figura 16. Esquema de la externalización de la PS en un célula apoptótica y unión con Anexina V (GrupoTaper, 2014)

5.4.6.1.1 KIT DE ANEXINA V y MUERTE CELULAR Muse®

El ensayo con el kit del Muse® Anexina V y Muerte Celular utiliza un solo reactivo y dos colorantes para teñir y diferenciar células vivas, muertas y apoptóticas de manera confiable. A principios de la vía apoptótica, moléculas de PS son trasladadas a la superficie exterior de la membrana celular. Anexina V-PE se utiliza para detectar PS en la membrana externa de las células apoptóticas. Por otro lado, 7-AAD, se impregna en células muertas y células con apoptosis en última etapa ó tardía. El Analizador Muse® guía paso a paso hasta 4 diferentes poblaciones de células: células muertas, las células vivas, principios y finales de las células apoptóticas (Merck Millipore, 2016). Para interpretar los resultados de los eventos en cada uno de los cuatro cuadrantes son los siguientes:

- Cuadrante inferior izquierdo: células viables, no sometidos a la apoptosis detectable
- Cuadrante inferior derecho: células en las primeras etapas de la apoptosis
- Cuadrante superior derecho: células en las últimas etapas de la apoptosis o muerte por mecanismos apoptóticos.
- Cuadrante superior izquierdo: células que han muerto a través de la necrosis, pero no a través de la vía apoptótica (Merck Millipore, 2016) (Figura 17).

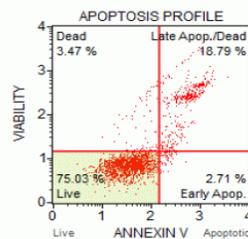


Figura 17. Esquematización del ensayo de Anexina V y Muerte Celular del Muse® (Merck Millipore, 2016).

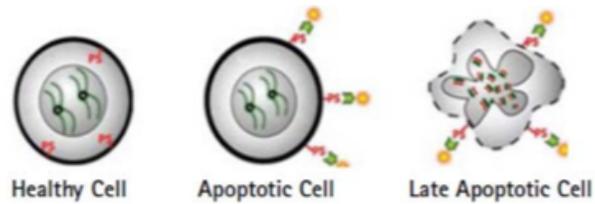


Figura 18. Las moléculas de PS se trasladan a la superficie externa de la membrana celular donde la Anexina V puede unir las fácilmente (Millipore, 2013).

5.4.6.2 LACTATO DESHIDROGENASA (LDH)

LDH es una enzima estable que es liberada rápidamente en el medio de cultivo celular a un daño en la membrana plasmática, por lo que se considera como el marcador más ampliamente utilizado en un estudio de citotoxicidad (Decker y Lohmann-Matthes, 1988; Korzeniewski y Callewaert, 1983) ya que se encuentra en muchos tejidos del cuerpo, pero es mayor su presencia en el corazón, hígado, riñones, músculos, glóbulos rojos, en el cerebro y en los pulmones (Spriet et.al, 2000; Li, 1989) y se libera al plasma como consecuencia de la destrucción celular (fisiológica o patológica) por lo que es un marcador de destrucción celular (BioVision, 2015).

VI. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó estadística descriptiva presentando los resultados con promedios y desviaciones estándar, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) seguido por una prueba pos hoc de Tukey y de Dunnet con un intervalo de confianza del 95% ($p < 0.05$) utilizando el programa estadístico SPSS v.21 y GraphPad Prisma v.5 para la caracterización de los extractos. Las curvas dosis-respuesta se analizaron mediante regresión lineal simple. Los datos experimentales de dosis-respuesta se analizaron mediante una prueba t-student para muestras independientes ($p < 0.05$) y una post hoc de Tukey para la diferencia entre CI50 y CL50.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 COMPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS LIOFILIZADOS (ELA y ELM)

En la Tabla 1. Se puede observar que al comparar ambos extractos liofilizados (metanólico y acuoso) el contenido de CFT, CA, TC, y AT se encuentran significativamente ($p < 0.05$) en mayor cantidad en el Extracto Liofilizado Metanólico (ELM) que en el Extracto Liofilizado Acuoso (ELA) (Ver Gráficas de las Figuras 22- 25), en el caso de los CFT se caracterizan por reaccionar fácilmente a un compuesto orgánico como lo es el metanol (Badui Dergal, 2006) lo que explica con el aumento significativo al utilizar metanol para su extracción, esto se compara con los resultados obtenidos en un estudio que indica que los extractos de la hoja tenían más capacidad antioxidante y que esto se atribuía a la variedad de los compuestos extraídos con etanol, y no sólo a los compuestos fenólicos (López-Mejía et.al, 2014). En un estudio, demuestran que los extractos aislados con disolventes polares en mezcla de metanol/agua tuvieron antioxidantes más fuertes que los extractos obtenidos con acetona (Kraujalis et.al, 2013). Las antocianinas de la hoja de amaranto *A. hypochondriacus l.* parecieron ser más afines a esta mezcla (metanol-agua) del extracto metanólico, ya que a pesar de que la literatura indica que estos son solubles al agua, también suelen ser solubles en metanol y etanol (Badui Dergal et.al, 2006) aunque al extraerlas en 100% acuoso, la pigmentación rojiza de la hoja se dejó ver claramente en comparación con el extracto metanólico (80/20 %v, metanol/agua) a pesar que estos provienen de la misma muestra seca molida de amaranto *A. hypochondriacus l.* (Chen y Luo, 2010; Baublis et.al, 1994) (Figuras 19- 21).

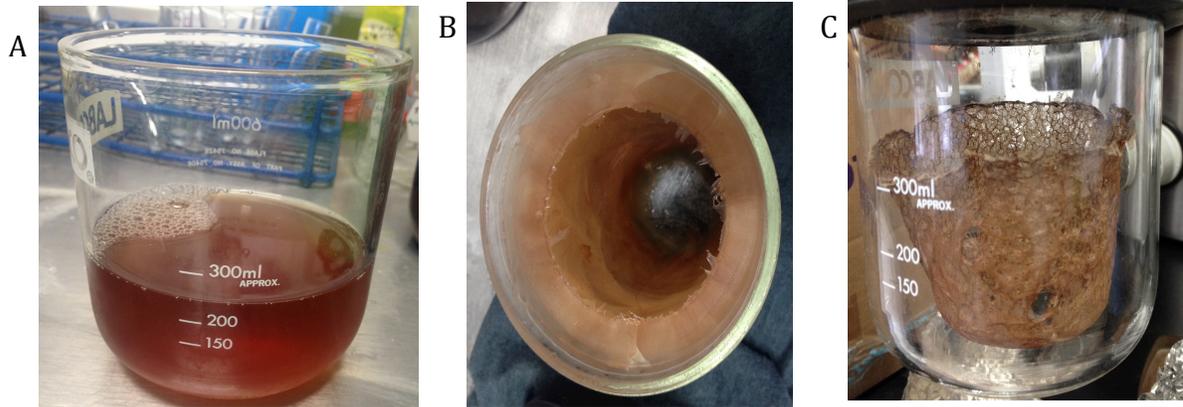


Figura 19. Extracto Acuoso de la Hoja de Amaranto *A. hypochondriacus l.* antes y después de Liofilizar

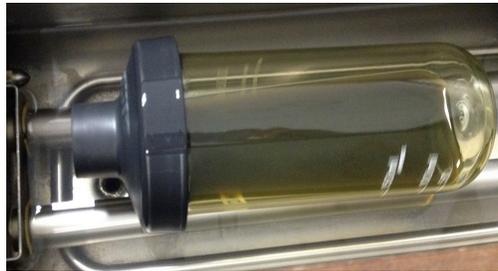


Figura 20. Extracto Metanólico de la Hoja de Amaranto *A. hypochondriacus l.* en proceso de congelación por acetona en el Freezer.



Figura 21. Fotografía del Extracto Metanólico filtrado en un matraz de bola a baño maría listo para roto-evaporar.

En la Figura 19 se puede observar el Extracto Acuoso después de filtrar por medio de papel filtro whatman (A) después en un estado sólido por el que fue congelado por medio de un Freezer (LABCONCO) con Acetona a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (B) y después de liofilizarse por 48 hrs (C). La coloración entre el Extracto Acuoso que es de un color rojizo y la coloración del Extracto Metanólico es verde oscuro, a pesar de que ambos extractos provienen de la misma muestra de hoja de amaranto al utilizar diversos solventes la coloración cambia notablemente.

Tabla 1. Comparación de los extractos liofilizados metanólico y acuoso en cuanto a Capacidad Antioxidante (CA), Compuestos Fenólicos Totales (CFT), Antocianinas (AT), Taninos Condensados (TC) en 100 g de EL de la Hoja de Amaranto “*A. hypochondriacus* l.”.

| | <i>CFT</i> | <i>CA (DPPH)</i> | <i>CA (FRAP)</i> | <i>TC</i> | <i>AT</i> |
|------------|---------------|------------------|------------------|----------------|----------------|
| ELM | 3848 ± 366 * | 3603.4 ± 188 * | 21.7 ± 0.76 * | 10351 ± 827* | 1419.5 ± 154 * |
| ELA | 2232.6 ± 58.3 | 1463.3 ± 103.5 | 12.7 ± 0.44 | 2671.1 ± 183.5 | 917.5 ± 87.3 |

Los resultados se muestran como el promedio de tres determinaciones ± 1 desviación estándar. Las determinaciones fueron expresadas en 100 g de ELM Metanol/Agua 80/20 v/v y ELA 100% Acuoso. La CA por DPPH se expresó en mg Eq. De Ác. Ascórbico y FRAP en g Eq Ácido Ascórbico, CFT en mg Eq Ácido Gálico, TC en mg Eq Catequina y AT en mg Eq Cianidina-3-glucosido.

*Muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) entre ambos extractos.

Es necesario determinar la capacidad antioxidante de una muestra por diferentes tipos de ensayo (Huang et.al, 2005). En este estudio, se utilizaron dos métodos diferentes para comparar la actividad antioxidante de los extractos liofilizados. El método DPPH ha sido ampliamente utilizado para evaluar la capacidad de eliminación de radicales libres. El otro método por FRAP se mide por la transferencia de electrones, es también un ensayo sencillo de medir la potencia antioxidante total, mientras que la reacción se lleva a cabo en condiciones ácidas. Cuando un radical férrico se reduce a la forma ferrosa (Benzie y Strain, 1996). En otro estudio, se compararon hojas y flores de otra especie vegetal con distintos solventes, para comparar la capacidad antioxidante con tres diferentes métodos (DPPH, ORAC, ABTS), y en todos los métodos utilizados tanto en hojas como en flores, la capacidad antioxidante es mayor cuando utilizan metanol a diferencia de etanol o agua (Heoa et.al, 2014). Hongyian y colaboradores determinaron la capacidad antioxidante por el método de FRAP en hojas de amaranto *A. hypochondriacus* expresando sus valores en 62.21 μmol Eq de Ac. Ascórbico/ g de materia seca (Hongyian et.al, 2015). Kraujlis y colaboradores, determinan por DPPH la capacidad antioxidante del extracto metanólico de la hoja de amaranto, dando un valor de 46.9 μmol Eq de Trolox/ g de extracto metanólico y 8.91 9 μmol Eq de Trolox/ g de materia seca (Kraujalis et.al, 2013)

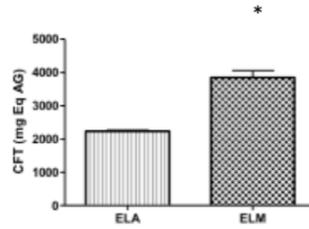


Figura 22. Gráfica del contenido de Contenido de Compuestos Fenólicos Totales en los ELA y ELM (* p<0.05).

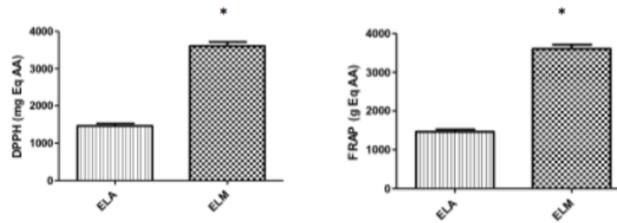


Figura 23. Capacidad Antioxidante de ambos extractos por métodos de FRAP y DPPH (* p<0.05).

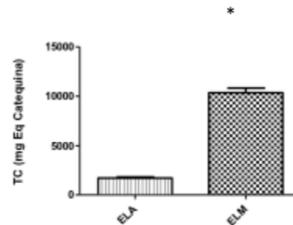


Figura 24. Contenido de Taninos Condensados en ELA y ELM (*p<0.05).

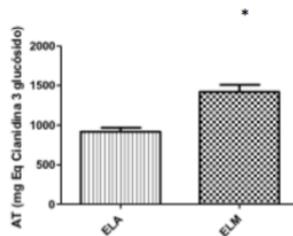


Figura 25. Contenido de Antocianinas en ELA y ELM (* p<0.05).

En un estudio se compararon diferentes especies de *Amaranthus* (*A. caudatus* y *A. cruentus*) usando diferentes partes de la planta, las hojas obtuvieron los más altos niveles de compuestos fenólicos totales y betalainas, un pigmento muy parecido al de las antocianinas, mientras que las semillas y los tallos fueron los más bajos. La especie *A. hypochondriacus* favorablemente tuvo el mayor contenido de compuestos fenólicos en comparación con las hojas de las otras dos especies reportando 14.94 mg Eq de Ac. Gálico / g de materia seca, sus extractos fueron metanólicos al 80% (Hongyian et.al, 2015) nuestros resultados en CFT son mayores de lo reportado en este estudio en

un 49% en el caso del extracto liofilizado acuoso, y por el doble con el extracto metanólico liofilizado, esto posiblemente puede deberse a las condiciones climáticas de los cultivos de donde se obtuvo la muestra donde se pudo haber influido en la producción de estos metabolitos secundarios, la muestra utilizada en este estudio fue cultivado en los invernaderos de la Facultad de Ingeniería campus Amazcala, de la UAQ y también a los métodos de extracción utilizados. Regresando al estudio de Hongyian y col. reportan que sus resultados en otros estudios el contenido de CFT fue reportado por otros más alto que los resultados de ellos. Según Kraujalis y colaboradores, al comparar la materia seca de la hoja de amaranto con el extracto metanólico de la misma, hay una diferencia en el CFT que es cinco veces mayor en el extracto metanólico, ya que en el extracto metanólico la cantidad de CFT reportada es de 32.3 mg Eq de Ác. Gálico /g de extracto lo cual se compara con los valores del ELM de este estudio. (Kraujalis et.al, 2013).

7.2 EXTRACTOS DE HOJA DE AMARANTO EN CÉLULAS MURINAS Y HUMANAS

Como se mencionó en la metodología, se realizaron 4 repeticiones de las curvas dosis-respuesta para ambos extractos y ambas líneas celulares, sin embargo cabe mencionar que no se muestran los resultados del ELM en HT-29, por cuestiones que imposibilitaron la repetición del mismo en esta línea celular.

La duración de la exposición de las células a las diferentes concentraciones utilizadas (0.01, 0.1, 1, 10, 100 μg Eq de Ác. Gálico/ml en el caso de HT-29) y (0.01, 0.1, 1, 10, 50,100 μg Eq de Ác. Gálico/ml en el caso de NIH/3T3) fue de 24 hrs, después se procedió a hacer el análisis estadístico donde se presentan los resultados en las gráficas (Figuras 36-31) como promedios y desviación estándar así como las significancias estadísticas.

Para el cálculo de las concentraciones se basó en el contenido de la determinación de compuestos fenólicos de ambos extractos y expresar dichas concentraciones en Eq de Ácido Gálico (AG), ya que es un compuesto fenólico natural que se encuentra en muchas especies vegetales, se ha relacionado con diversas actividades biológicas como antioxidante, antiinflamatorio, entre otras. Muchos reportes han indicado que el AG inhibe la proliferación celular y promueve la apoptosis en células tumorales, sin ejercer ningún efecto deletéreo en células normales (Inoue et.al, 2000; Isuzugawa et.al, 2001).

7.2.1 CURVA DOSIS-RESPUESTA NIH/3T3

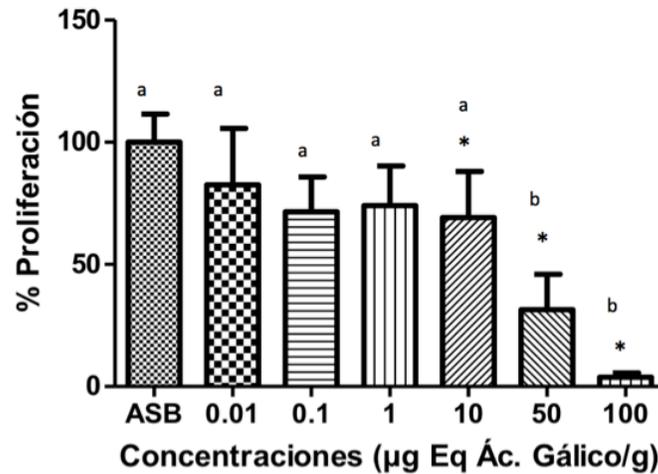


Figura 26. % de Proliferación del ELA en NIH/3T3

Los resultados se muestran como el promedio de cuatro determinaciones ± 1 desviación estándar.

* Muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) de las concentraciones contra el Control de Albúmina Sérica Bovina (ASB) por medio de una prueba post hoc de Dunnet. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) comparando todas las concentraciones entre sí incluyendo el control por medio de una prueba post hoc de Tukey.

La gráfica de la Figura 26 muestra el % de Proliferación de las células NIH/3T3 en presencia de las diferentes concentraciones del Extracto Acuoso (ELA) de la hoja de Amarantho *A. hypochondriacus* L. en 0.5 ml de medio DMEM + ASB, El control de ASB indica el 100% de células, 82.6%, 71.6%, 74%, 69.2%, 31.4 % y 3.9% respectivamente con cada concentración de menor a mayor (0.01-100 µg Eq de AG) también se puede observar que en base al análisis estadístico con la prueba Dunnet las concentraciones 10, 50 y 100 µg Eq de AG fueron aquellas que presentaron diferencia significativa con respecto al control, es decir, se inhibió la proliferación celular en un 30.8%, 68.6% y 96.1% respectivamente y que no existe diferencia significativa comparando todas las concentraciones entre sí incluyendo el control excepto las concentraciones 50 y 100 µg Eq de AG esto puede indicar un efecto citotóxico del ELA usando estas concentraciones más altas, y una tendencia a la inhibición de la proliferación se puede observar desde la concentración más pequeña, aunque no de manera significativa. El % de Proliferación ayuda a determinar la Concentración Inhibitoria Media CI50 mediante regresión lineal del log de la concentración contra el porcentaje de proliferación (Ver Tabla 2).

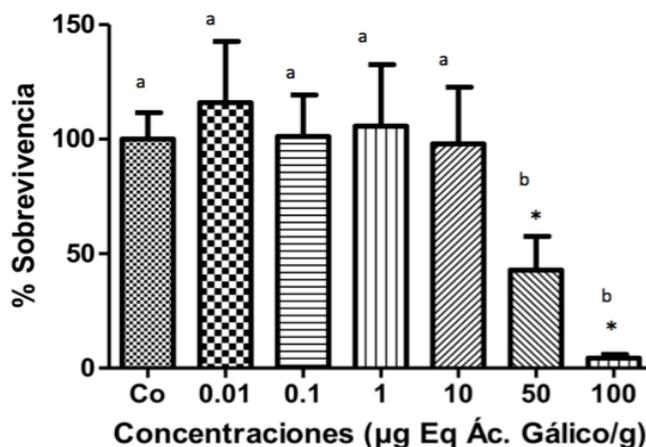


Figura 27. % de Supervivencia del ELA en NIH/3T3

Los resultados se muestran como el promedio de cuatro determinaciones ± 1 desviación estándar.

* Muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) de las concentraciones contra el Control Inicial (C0) por medio de una prueba post hoc de Dunnet. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) comparando todas las concentraciones entre sí incluyendo el control por medio de una prueba post hoc de Tukey.

La gráfica de la Figura 27 muestra el % de Supervivencia de las células NIH/3T3 en presencia de las diferentes concentraciones del Extracto Acuoso (ELA) de la hoja de Amarantho *A. hypochondriacus l.* en 0.5 ml de medio DMEM + ASB, El control inicial (C0) indica el 100% de células, 115%, 101.2%, 105.7%, 97.9%, 42.8% y 4.5% respectivamente con cada concentración de menor a mayor (0.01-100 µg Eq de AG) también se puede observar que en base al análisis estadístico con la prueba Dunnet las concentraciones 50 y 100 µg Eq de AG fueron aquellas que presentaron diferencia significativa con respecto al control disminuyendo en un 57.2% y 95.5% respectivamente, y que no existe diferencia significativa comparando todas las concentraciones entre sí incluyendo el control excepto las concentraciones 50 y 100 µg Eq de AG esto puede indicar un efecto citotóxico del ELA usando estas concentraciones más altas ya que no parece que exista un efecto citotóxico que indique que las células estén muriendo a bajas concentraciones (0.01-10 µg Eq de AG) según la prueba pos hoc de Tukey al no mostrar significancia estadística. El % de Supervivencia ayuda a determinar la Concentración Letal Media CL50 mediante regresión lineal del log de la concentración contra el porcentaje de proliferación (Ver Tabla 2).

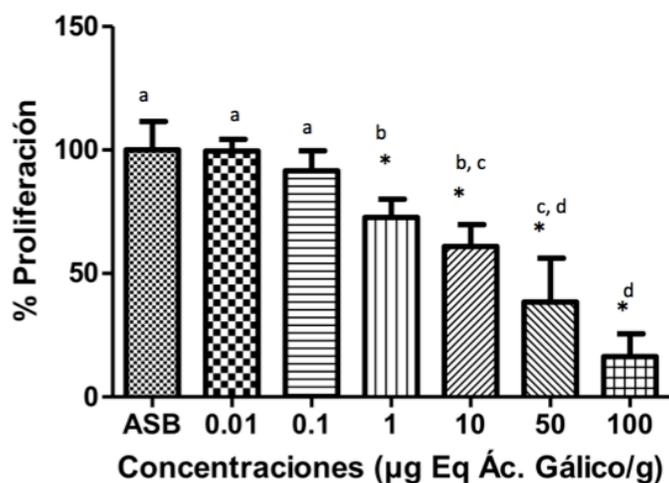


Figura 28. % de Proliferación del ELM en NIH/3T3

Los resultados se muestran como el promedio de cuatro determinaciones ± 1 desviación estándar.

* Muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) de las concentraciones contra el Control de Albúmina Sérica Bovina (ASB) por medio de una prueba post hoc de Dunnet. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) comparando todas las concentraciones entre sí incluyendo el control por medio de una prueba post hoc de Tukey.

La gráfica de la Figura 28 muestra el % de Proliferación de las células NIH/3T3 en presencia de las diferentes concentraciones del Extracto Metanólico (ELM) de la hoja de *Amaranto A. hypochondriacus l.* en 0.5 ml de medio DMEM + ASB, El control de ASB indica el 100% de células, 99.5%, 91.5%, 72.4%, 60.9%, 38.4% y 16.3% respectivamente con cada concentración de menor a mayor (0.01-100 µg Eq de AG) también se puede observar que en base al análisis estadístico con la prueba Dunnet que desde la concentración 1 - 100 µg Eq de AG presentaron diferencia significativa con respecto al control, es decir, se inhibió la proliferación celular en un 27.6%, 39.1%, 61.6 y 83.7% respectivamente y comparando todas las concentraciones entre sí incluyendo el control las concentraciones más bajas (0.01 y 0.1 µg Eq de AG) no tienen diferencia significativa entre ellas ni con el control de ASB, y entre las concentraciones (1 y 10 µg Eq de AG) no hay diferencia significativa entre ellas pero sí con respecto a las concentraciones más bajas y el control y en comparación con la concentración más alta (100 µg Eq de AG); la concentración 10 y 50 µg Eq de AG no son diferentes significativamente así como entre la 50 y 100 µg Eq de AG.

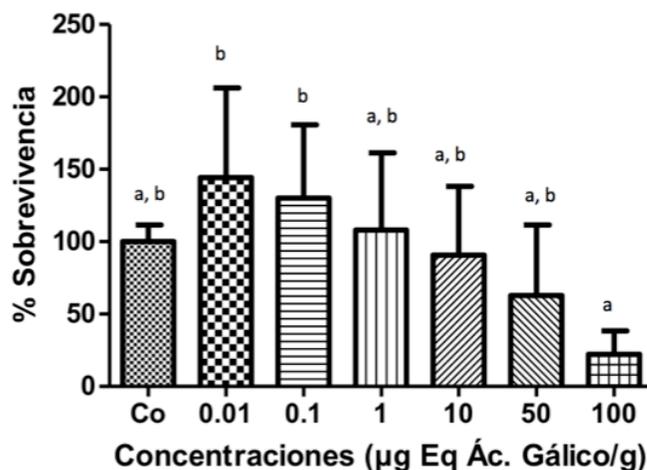


Figura 29. % de Sobrevivencia del ELM en NIH/3T3

Los resultados se muestran como el promedio de cuatro determinaciones ± 1 desviación estándar.

* Muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) de las concentraciones contra el Control Inicial (C0) por medio de una prueba post hoc de Dunnet. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) comparando todas las concentraciones entre sí incluyendo el control por medio de una prueba post hoc de Tukey.

La gráfica de la Figura 29 muestra el % de Sobrevivencia de las células NIH/3T3 en presencia de las diferentes concentraciones del Extracto Metanólico (ELM) de la hoja de *Amaranto A. hypochondriacus l.* en 0.5 ml de medio DMEM + ASB, El control inicial (C0) indica el 100% de células, 144.1%, 130.1%, 107.9%, 90.8%, 62.8% y 22.1% respectivamente con cada concentración de menor a mayor (0.01-100 µg Eq de AG) también se puede observar que en base al análisis estadístico con la prueba Dunnet no existe diferencia significativa entre las concentraciones con respecto al control inicial esto no se observa de la misma manera con la prueba post hoc de Tukey en la que claramente indica que hay diferencia significativa entre la concentración 0.01 y 0.1 µg Eq de AG con respecto al control pero de manera inversa ya que pareciera que a pequeñas concentraciones en lugar de inhibir la proliferación el ELM elucidará la respuesta proliferativa de las células murinas y a partir de la concentración de 1, 10 y 50 µg Eq de AG indujera el efecto citotóxico del ELM al disminuir el porcentaje de células sin ser significativo con respecto al control, lo que puede que no hay un efecto citotóxico del ELM usando estas concentraciones más altas

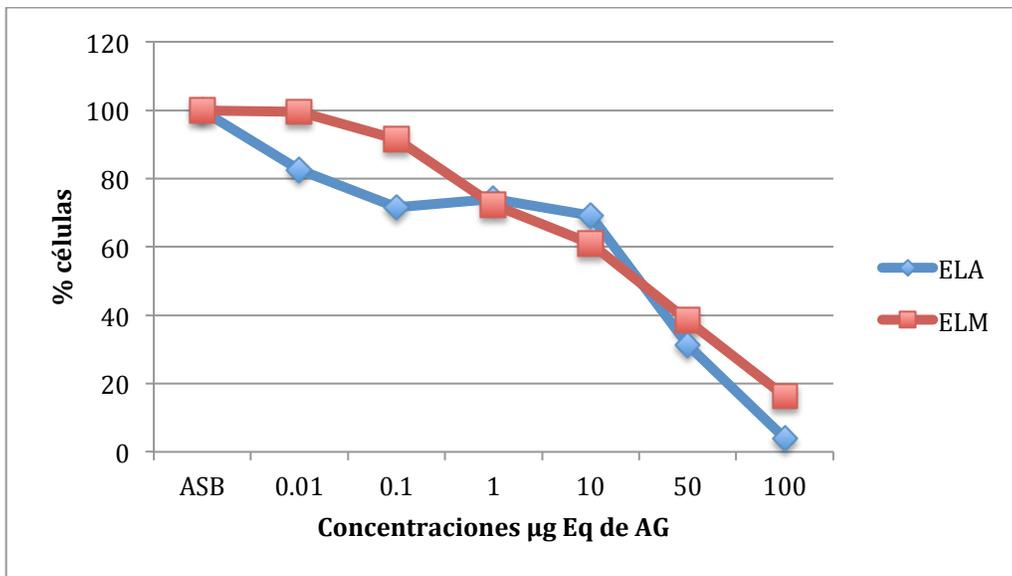


Figura 30. Comparación del % de Proliferación entre ELM y ELA en NIH/3T3

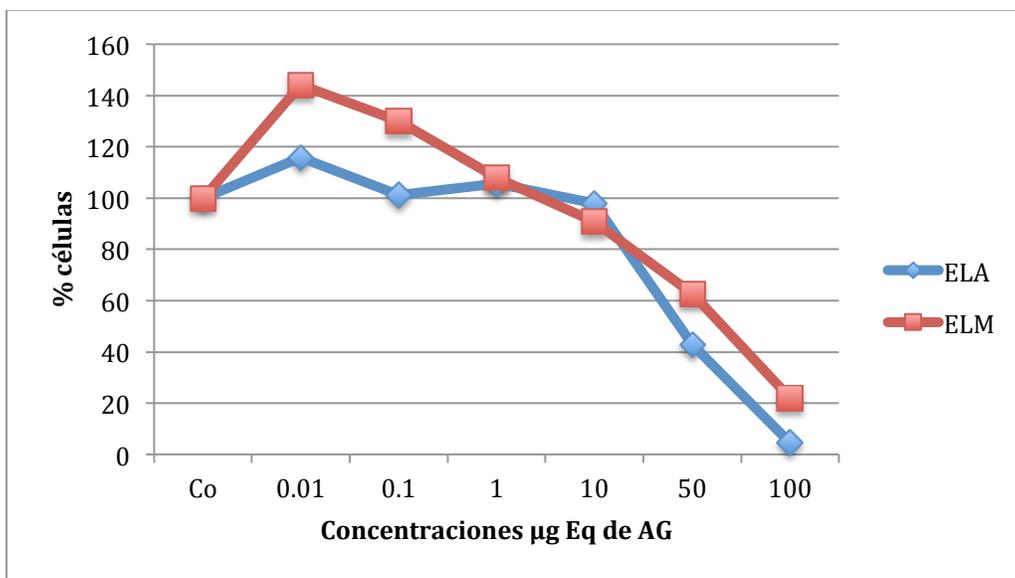


Figura 31. Comparación del % de Supervivencia entre ELM y ELA en NIH/3T3

Lo anterior puede indicar que el efecto citotóxico es más notable del ELM en comparación con el ELA al observar que desde la concentración 1 $\mu\text{g Eq de AG}$ hay un cambio significativo en la disminución del porcentaje de células en presencia del ELM (Figura 29). Sin embargo en comparación con el ELA las células murinas suelen ser deletéreas en presencia del Extracto Acuoso a una concentración de 100 $\mu\text{g Eq de AG}$ al observar un porcentaje menor de células que en el Extracto Metanólico (Figuras 30 y 31).

7.2.2 CURVA DOSIS-RESPUESTA EN HT-29

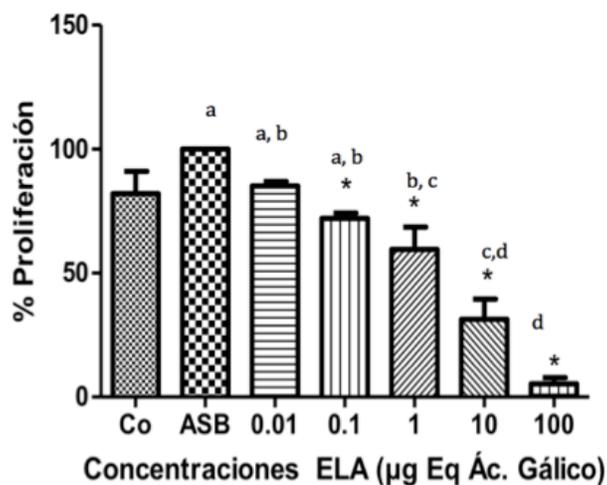


Figura 32. % de Proliferación del ELA en HT-29

Los resultados se muestran como el promedio de cuatro determinaciones ± 1 desviación estándar.

* Muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) de las concentraciones contra el Control de Albúmina Sérica Bovina (ASB) por medio de una prueba post hoc de Dunnet. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) comparando todas las concentraciones entre sí incluyendo el control por medio de una prueba post hoc de Tukey.

La gráfica de la Figura 32 muestra el % de Proliferación de las células HT-29 en presencia de las diferentes concentraciones del Extracto Acuoso (ELA) de la hoja de Amaranto *A. hypochondriacus* L. en 0.5 ml de medio DMEM + ASB, El control de ASB indica el 100% de células, 82.2%, 72.9%, 57.6%, 32.7% y 4.8 % respectivamente con cada concentración de menor a mayor (0.01-100 µg Eq de AG) también se puede observar que en base al análisis estadístico con la prueba Dunnet a partir de las concentraciones 0.1 - 100 µg Eq de AG presentaron diferencia significativa con respecto al control, es decir, se inhibió la proliferación celular en un 27.1%, 42.4%, 67.3% y 95.2% respectivamente y que no existe diferencia significativa entre las concentraciones 0.01 y 0.1 µg Eq de AG con respecto al control de ASB con una prueba post hoc de Tukey ($p < 0.05$) tampoco existe diferencia significativa entre las concentraciones de 0.01 - 1 µg Eq de AG así como entre 1 y 10 µg Eq de AG y 10 y 100 µg Eq de AG comparando todas las concentraciones entre sí; esto puede indicar una inhibición de la proliferación celular desde concentraciones muy pequeñas de manera significativa del ELA en células de cáncer de colon humano (HT-29).

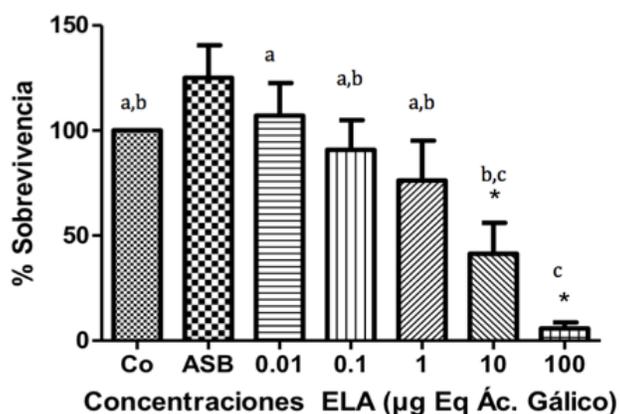


Figura 33. % de Supervivencia del ELA en HT-29

Los resultados se muestran como el promedio de cuatro determinaciones ± 1 desviación estándar.

* Muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) de las concentraciones contra el Control Inicial (C0) por medio de una prueba post hoc de Dunnet. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) comparando todas las concentraciones entre sí incluyendo el control por medio de una prueba post hoc de Tukey.

La gráfica de la Figura 33 muestra el % de Supervivencia de las células ht-29 en presencia de las diferentes concentraciones del Extracto Acuoso (ELA) de la hoja de Amaranto *A. hypochondriacus* l. en 0.5 ml de medio DMEM + ASB, El control inicial (C0) indica el 100% de células, 103.5%, 87.7% 75.4%, 42.2% y 5.2% respectivamente con cada concentración de menor a mayor (0.01-100 µg Eq de AG) también se puede observar que en base al análisis estadístico con la prueba Dunnet las concentraciones 10 y 100 µg Eq de AG fueron aquellas que presentaron diferencia significativa con respecto al control inicial disminuyendo en un 57.8% y 94.8% respectivamente, esto quiere decir que posiblemente la CL50 se encuentre en un rango de 10 y 100 µg Eq de AG (Ver Tabla 2) y que no existe diferencia significativa comparando todas las concentraciones entre sí incluyendo el control excepto las concentraciones 10 y 100 µg Eq de AG esto puede indicar un efecto citotóxico del ELA usando estas concentraciones más altas.

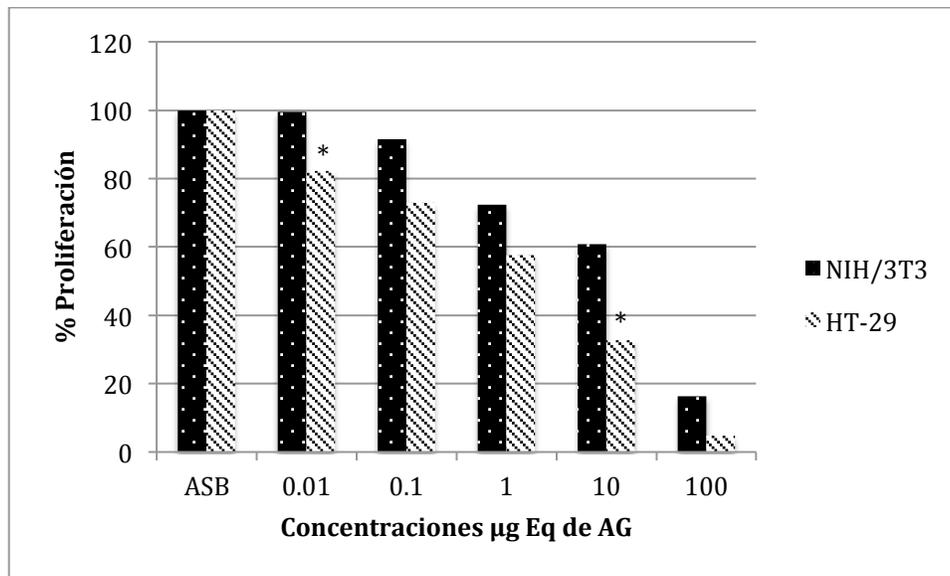


Figura 34. Comparación del % de Proliferación del ELA entre ambas líneas celulares

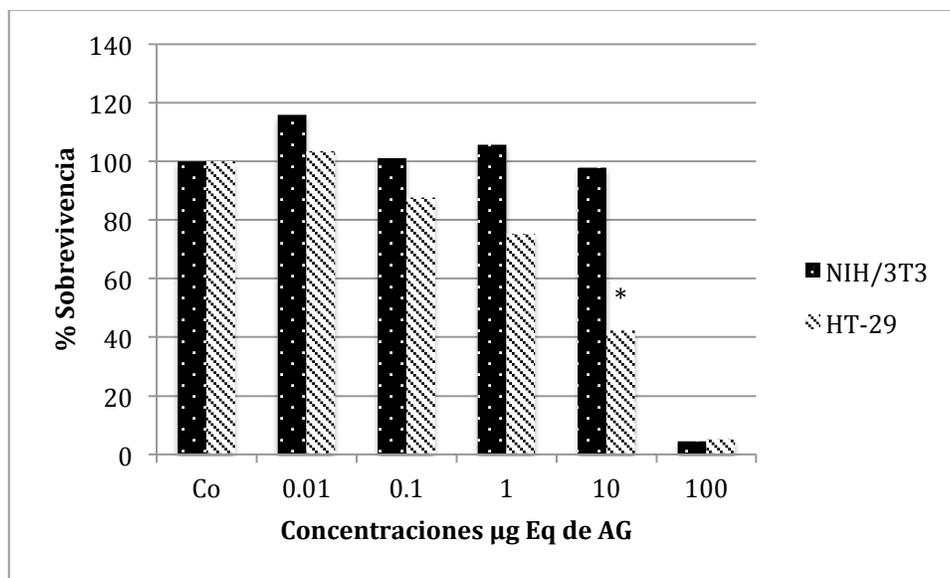


Figura 35. Comparación del % de Supervivencia del ELA entre ambas líneas celulares

En las Gráficas anteriores (Figuras 34 y 35) se puede observar el efecto del Extracto Acuoso en ambas líneas celulares utilizadas (NIH/3T3 y HT-29) comparando las mismas concentraciones, en la gráfica de la Figura 34 el * indica si existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre cada concentración del ELA en cada línea celular del % de Proliferación. Siendo la concentración 0.01 y 10 µg Eq de AG las concentraciones con una disminución en la proliferación de manera significativa del ELA entre NIH/3T3 y HT-29, siendo las células de cáncer de colon humano las más impactadas ante el extracto acuoso, sin embargo aunque la prueba estadística no indica

significancia en todas las concentraciones se puede observar una tendencia de que la línea celular HT-29 tuvo un mayor impacto del ELA en comparación con las de fibroblastos murinos.

En la Gráfica de la Figura 35, las concentración de 10 µg Eq de AG es la que obtuvo una diferencia significativa entre una línea celular y la otra por el ELA en cuanto al % de Supervivencia.

7.2.3 CI50 y CL50 EN NIH/3T3 y HT-29

Tabla 2. CI50 y CL50 de los Extractos Acuoso y Metanólico en Células Murinas y Humanas.

| Extracto de Hoja de Amaranto <i>A.</i> <i>hypochondriacus L.</i> | (µg Eq. de Ac. Gálico) | NIH/3T3 | HT-29 |
|---|-----------------------------------|----------------|--------------|
| ELA | CI50 | 4.16 | 1.09 |
| | CL50 | 31.43 | 3.68 |
| ELM | CI50 | 9.29 | 0.91 |
| | CL50 | 75.46 | 18.4 |

La Tabla 2 muestra las CI50 y CL50 de los extractos Acuoso y Metanólico en las células de cáncer de colon humano (HT-29) y fibroblastos murinos (NIH/3T3). En general las CI50 y CL50 en NIH/3T3 son mayores que en HT-29 en 2.8 y 7.5 veces más respectivamente del ELA y 9.2 y 3 veces más respectivamente en el caso del ELM.

7.3 ANÁLISIS DEL CITÓMETRO MUSE®

7.3.1 ANÁLISIS DE ANEXINA V y MUERTE CELULAR

7.3.1.1 MUERTE CELULAR NIH/3T3

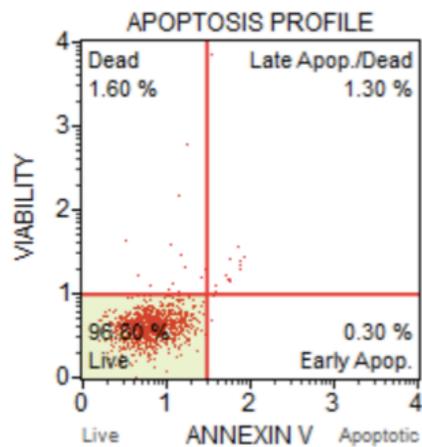


Figura 36. Control de ASB 0.5% en NIH/3T3 en ensayo de Anexina V y Muerte Celular

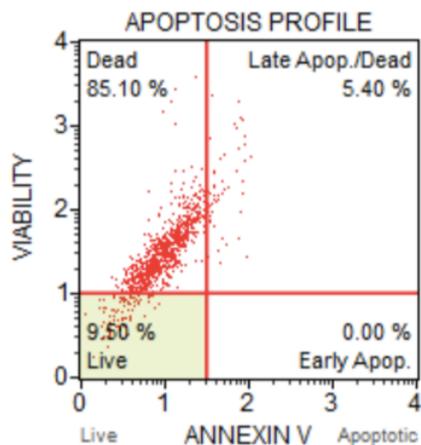


Figura 37. CL50 del ELA en NIH/3T3 en ensayo de Anexina V y Muerte Celular

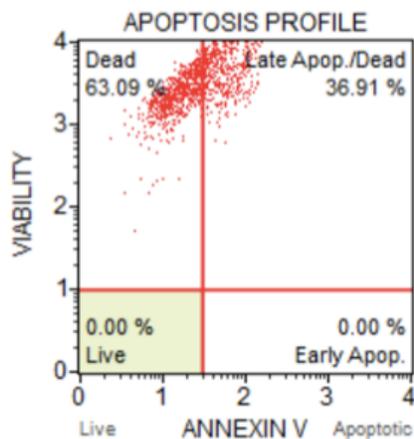


Figura 38. CL50 del ELM en NIH/3T3 en ensayo de Anexina V y Muerte Celular

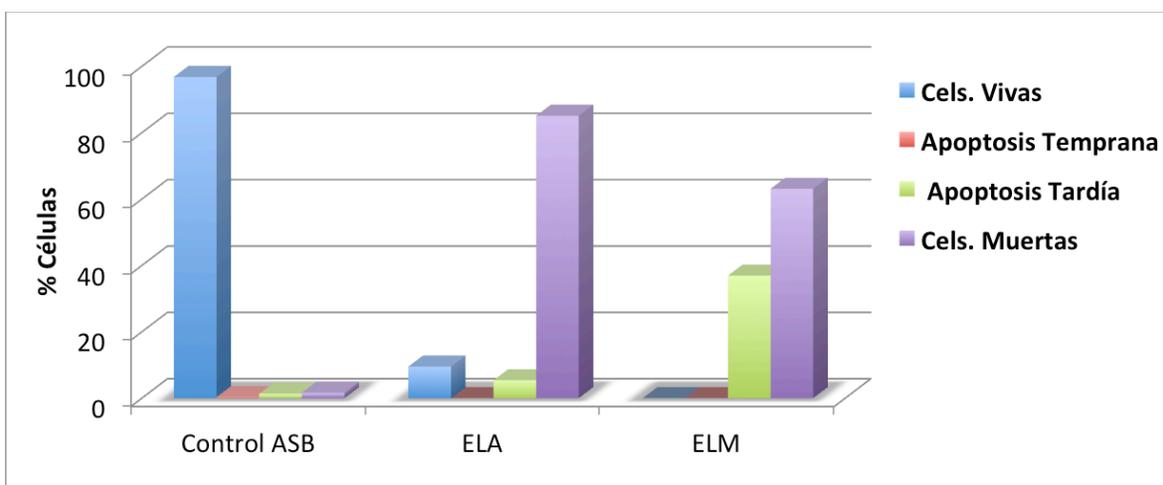


Figura 39. Gráfica del % células del ELA y ELM con el Control de ASB en células murinas.

En la Figura 39 se puede observar que tanto con el ELA y ELM el porcentaje de células predominante son las células muertas y desechos celulares en comparación con el control donde éstas en su mayoría se encuentran viables. El ensayo de Anexina V y Muerte Celular del Muse® se realizó a las 8 hrs de haber aplicado las CL50 de cada uno de los extractos. Claramente se puede deducir que los Extractos de la hoja de amaranto *A. hypochondriacus l.* están induciendo a una muerte celular abrupta en los fibroblastos murinos, se esperaría que hubieran sido detectados más células vivas en cada uno de los extractos, ya que se usa una concentración letal media donde la mitad de las células deberían morir más no el cien por ciento.

En estudios anteriores, se ha demostrado que compuestos antioxidantes que son aislados, como es el caso del ácido gálico un compuesto fenólico que abunda en diversas especies vegetales comestibles como plantas o frutas, induce a muerte celular por apoptosis y por necrosis en fibroblastos de

pulmón, células hepáticas y en células tumorales (Hscie et.al, 2014; Hscie et.al, 2016). En fibroblastos de pulmón se reportó haber reducido la proliferación celular a una concentración entre 50-75 μM reduciendo la proporción de fase G1 y aumentando las fases S y G2 / M de los mismos, lo que sugiere la detención del ciclo celular en las fases S y G2 / M. Alas concentraciones 100-150 μM indujo a muerte celular y hubo cambios en su morfología (Hscie et.al, 2016), cabe destacar que el AG utilizado en ambos estudios por Hscie y colaboradores era un compuesto aislado y puro de esta manera indujo la muerte celular necrótica a través de la generación rápidamente de ROS (Inoue et.al, 2000), lo que desencadena la liberación de Ca^{2+} por el retículo endoplásmico hacia el citoplasma, aumentando la concentración citosólica de Ca^{2+} , lo que conduce a la activación de calpaina I dependiente de Ca^{2+} . Además, esta cadena de eventos causa la ruptura de la membrana lisosomal y, en última instancia, la muerte celular necrótica en estas células (Hscie et.al, 2014).

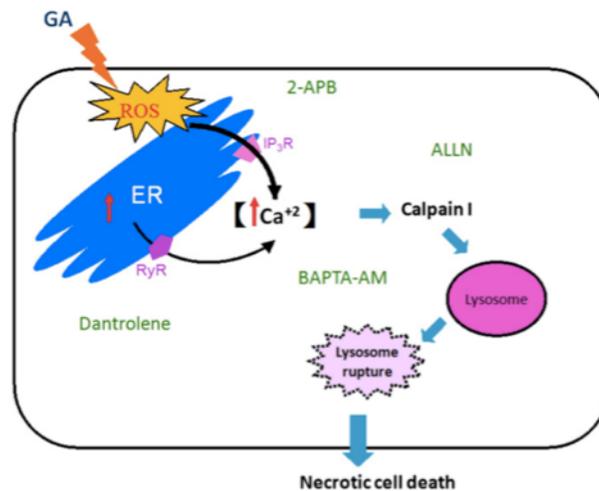


Figura 40. Inducción del AG en células hepáticas (Hscie et.al, 2014)

Una de las concentraciones usadas por Hscie y colaboradores fue de 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de AG a las 4 hrs encontraron inhibición de la proliferación de manera significativa, esto concuerda con la CL50 del ELA (31.43 μg Eq de AG/ml) en nuestro estudio, sin embargo la exposición del ELA en las células NIH/3T3 fue de 8 horas, cuando en este estudio ellos a la mitad del tiempo que nosotros encontramos el efecto citotóxico, ya que a las 6 horas con una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de AG ellos encontraban citotoxicidad a un 100% (Hscie et.al, 2014).

Así mismo otro estudio por Yun y colaboradores, aislaron las antocianinas de uva morada y las probaron en células de cáncer de colon (HT-29) a una concentración de 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de antocianinas totales de la uva, reportando que inhibe la actividad proliferativa y la migración celular en un 95% con respecto al control (Yun et.al, 2010).

En el presente estudio, a pesar de que se expresaban las concentraciones en $\mu\text{g Eq de AG/ml}$, los extractos de la hoja de Amaranto *A. hypochondriacus l.* son una mezcla compleja conformada por grandes cantidades de sales y minerales que pudieron haber provocado un shock osmótico en las células fibroblásticas murinas provocando así la muerte abrupta de las células NIH/3T3 debido a que los disolventes utilizados (Metanol/Agua) son polares atraen compuestos orgánicos incluyendo iones y sales minerales que pudieron haber jugado un papel importante en el medio de las células.

VIII. CONCLUSIÓN

Se encontró que el ELM obtuvo la mayor capacidad antioxidante (CA) y cantidad de compuestos antioxidantes (AT, CFT y TC) ($p < 0.05$) en comparación con el ELA. Al ser los compuestos fenólicos y demás antioxidantes afines a un disolvente orgánico además de compuestos antioxidantes otros compuestos que no son aislados ya que se está usando una materia compleja que incluyen sales minerales entre otros, pueden estar en conjunto con los metabolitos antioxidantes de interés. Sin embargo, la literatura ha reportado que el efecto antiproliferativo sugiere que los compuestos fenólicos pudieran actuar induciendo a muerte celular en ambas líneas celulares. Esto ha sido demostrado en células de varios tipos de leucemia, cáncer de estómago, de pulmón, de colon, de vejiga, y próstata (Birt et.al, 2001). Sin embargo, en muchos de estos llevados a cabo de manera *in vitro*, han sido aislados o utilizados en fases puras de las cuales sólo podrán ser verdaderamente efectivas de esta manera y adjudicarle el efecto a esto. Por tanto el ELA y ELM han mostrado que a pesar de ser una mezcla compleja y mostrar la sinergia de la planta indujo a muerte celular con una citotoxicidad del 100% en células murinas. La evidencia indica que se requieren vías de señalización específicas para mediar la necrosis inducida por diferentes señales de muerte. Claramente, se necesita más trabajo para aclarar el mecanismo que generan de manera aislada los compuestos antioxidante durante la lesión celular necrótica.

Se necesita discriminar con otro ensayo la muerte celular por necrosis como lo es el caso del kit de Biovision de LDH para el caso de la prueba de los extractos en NIH/3T3 y determinar a las 4 hrs para ver si encontramos más porcentaje de células vivas ó CL25; así como determinar la parte de HT-29 en presencia de los extractos por Anexina V y muerte celular en el Muse.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott J, Campbell T. 1982. Sensory evaluation of vegetable amaranth *Amaranthus spp.* Hort Science. 17: 409.
- AICR: American Institute for Cancer Research. 2007. World Cancer Research Fund Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective.
- Álvarez-Jubete L, Arendt E, Gallagher E. 2010. Nutritive values of pseudo-cereals and their increasing use as functional gluten-free ingredients. Food Science and Technology. 21: 106-113.
- Amicarelli V, Camaggio G. 2012. *Amaranthus*: A crop to rediscover. Forum Ware International. 2: 4-11.
- 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.
- ATCC, 2014. The essential of life science research. Características Generales: HT-29 (ATCC® HTB-38™). Ubicado en: <http://www.atcc.org/products/all/HTB-38.aspx#documentation>
- Badui- Dergal S, Guerrero-Legarreta I, López-Hernández E, Armenta López R. 2006. Química de Alimentos: Pigmentos. Pearson Educación México. 4: cap.7, 417-429.
- Barba de la Rosa A, Fomsgaard I, Larsen B, Mortensen A, Olvera-Martinez L, Silva-Sanchez C, Mendoza-Herrera A, Gonzalez-Castaneda J, De Leon-Rodriguez A. 2009. Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) as an alternative crop for sustainable food production: Phenolic acids and flavonoids with potential impact on its nutraceutical quality. Journal of Cereal Science. 49: 117-121.
- Bastidas O, 2016. Folleto Informativo: Conteo Celular con Hematocitómetro. Uso elemental del Hematocitometro. Technical Note - Neubauer Chamber Cell Counting. ubicado en: www.celeromics.com. 1-6.
- Baublis A, Spomer A, Berber-Jiménez M. 1994. Anthocyanin pigments: comparison of extract stability. *J. Food Sci.*, 59:1219.
- Becerra R. 2000. El amaranto: nuevas tecnologías para un antiguo cultivo. CONABIO. Biodiversitas. 30: 1-6.

- Becker R, Wheeler E, Lorenz K, Stafford A, Grosjean O, Betschart A, Saunders R. 1981. A composition study of amaranth grain. *Journal of Food Science*. 46: 1175-1180.
- Benzie F, Strain J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239: 70–6.
- Bialostozky D, Rodríguez-Diez G, Zazueta C. 2008. Detección de apoptosis en enfermedades cardiovasculares mediante las imágenes SPECT de cardiología nuclear. *Archivos de Cardiología de México*. 78: 217-228.
- BioVision. 2015. LDH-Cytotoxicity Colorimetric Assay Kit II. Ubicado en: <http://www.biovision.com/ldh-cytotoxicity-colorimetric-assay-kit-ii-2845.html>.
- Birt DF, Hendrich S, Wang W. 2001. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol Ther*; 90: 157-77.
- Breene W. 1991. Food use in grain amaranth. *Cereal Foods World*. 36: 426-430.
- Brenner D, Baltensperger D, Kulakow P, Lehman J, Myers R, Slabbert M. 2000. Genetic resources and breeding of Amaranths. *Plant breeding reviews*. 19: 227–285.
- Bressani R. 1993. Amaranth. *Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition*. 1: 135-140.
- Byrnes A, Huang Y, Shannon K. 2014. Chapter 35 – The FDA Review Process for Cancer Gene Therapy. *Gene Therapy of Cancer*. 3: 503-505.
- Callahan M, Halleck M, Krahling S, Henderson A,† Williamson P, Schlegel R. 2003. Phosphatidylserine expression and phagocytosis of apoptotic thymocytes during differentiation of monocytic cells. *Journal of Leukocyte Biology*. 74: 846-856.
- Caselato-Sousa V, Amaya-Farfán J. 2012. State of knowledge on amaranth grain: a comprehensive review. *Journal of Food Science* 4: 93-104.
- Cheng Y, Prusoff W. 1973. Relationship between the inhibition constant (KI) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction. *Biochemical Pharmacology*. 22: 3099-3108.
- Cheynier, V. 1999. Structure and colour properties of anthocyanins and related pigments. *Proc. 1st Int. Cong. Pigments in Foods*. Sevilla, España.
- Christofferson E, Yuan J. 2010. Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Curr Opin Cell Biol*. 22:263–8.
- Colin J, Hain O, Allan A, Clarke R, Clarke 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: 140156.

- Cornejo, S., Arriaga, A., Cambiasso, J., & Martinez, D. 2012. Etapas de desarrollo de cancer. Cordoba: Biologi celular.
- Cox, T., & Sinclear, J. 1998. *Biología Molecular en Medicina*. Panamericana, Ed.3a.Madrid, España.
- Crow M, Mani K, Nam, Kitsis R. 2004. The Mitochondrial Death Pathway and cardiac myocyte apoptosis *Circ Res*. 95: 957-970.
- Das B, Yeger H, Baruchel H, Freedman M, Koren G, Baruchel S. 2003. *In vitro* cytoprotective activity of squalene on a bone marrow versus neuroblastoma model of cisplatin-induced toxicity: Implications in cancer chemotherapy. *European Journal of Cancer*. 39: 2556–2565.
- Day J, Mumper R. 2010. Plant phenolics: Extraction, Analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 15: 7313-7352.
- Decker T, Lohmann-Matthes M. 1988. A quick and simple method for the quantification of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumour necrosis factor (TNF) activity. *J Immunol Methods*. 115: 61-9.
- Declercq W, Vanden-Berghe T, Vandenabeele P. 2009. RIP kinases at the crossroads of cell death and survival. *Cell*. 138:229–32
- Deighton N, Brennan R, Finn C, Davies V. 2000. Antioxidant properties of domesticated and wild *Rubus* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1307–1313.
- Deshpande S, Cheryan, M. 1987. Determination of Phenolic Compounds of dry beans using vanillin, redox and precipitation assays. *Journal of Food Science*, 52, 332–334.
- Dive C, Gregory C, Phipps D, Evans D, Milner A, Wyllie A. 1992. Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. *Biochimica et Biophysica acta*. 1173: 275-285.
- Donley, N., & Thayer, M. J. 2012. DNA Replication timing, genome stability and cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 29: 997–1003.
- Escudero N, Zirulnik F, Gomez N, Mucciarelli S, Gimenez M. 2006. Influence of a protein concentrate from *Amaranthus cruentus* seeds on lipid metabolism. *Experimental Biology and Medicine*. 231: 50–59.
- Espitia-Rangel E, Mapes-Sánchez E, Núñez-Colín C, Escobedo-López D. 2010. Distribución Geográfica de las especies cultivadas *Amaranthus* y de sus parientes silvestres en México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 1,3: 427-437.
- Felgines C, Talavera S, Texier O, Besson C, Fogliano V, Lamaison JL, la FL, Galvano G, Remesy C, Galvano F .2006. Absorption and metabolism of red orange juice anthocyanins in rats. *Br J Nutr*. 95:898–904

- Fern K, Fern A, Morris R. 2014. Useful Tropical Plants Database 2014. Jardines botánicos Charles University. <http://tropical.theferns.info/image.php?id=Amaranthus+hypochondriacus>.
- Gad SC. 2014. LD50/CL50 Lethal Dosage 50/Lethal Concentration 50. *Encyclopedia of Toxicology*. 3:58-60.
- Ghosh D, Konishi T. 2007. Anthocyanins and anthocyanin rich extracts: role in diabetes and eye function. *Asia Pac J Clin Nutr* .16:200–208.
- Giansanti, V., Torriglia, A., & Scovassi, a. I. 2011. Conversation between apoptosis and autophagy: Is it your turn or mine? *Apoptosis*, 16: 321–333.
- Grobelnik-Mlakar S, Turinek M, Jakop M, Bavec M. 2010. Grain amaranth as an alternative and perspective crop in temperate climate, In: *Journal for Geography*. 5: 135-145.
- Grupo Taper. 2014. Apoptosis Temprana: Anexina V. Ubicado en: <http://www.taper.es/apoptosis-temprana-anexina-v/>
- Gupta A, Sharma M, Tandon N. 2004. Reviews on Indian Medicinal Plants. Indian Council of Medical Research, New Delhi, India. 2.
- Gutiérrez-Gailen Y, Martínez M, Varona-Torres N, Rodríguez A. 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.
- Heoa B, Parkb Y, Parkc Y, Baeb J, Chod J, Parke K, Jastrzebskif Z, Gorinstein S. 2014. Anticancer and antioxidant effects of extracts from different parts of indigo plant. *Industrial Crops and Products* 56: 9–16
- Huang, BX Ou, RL Prior. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 1841-1856.
- Hsieh C, Wu C, Wu C, Yen J, Liu M, Hsueh M, Hsu S. 2014. Gallic acid selectively induces the necrosis of activated hepatic stellate cells via a calcium-dependent calpain I activation pathway. *Life Sci*. 102: 55-64.
- Hscie C, Wu C, Hsu S, Yen J. 2016. Molecular mechanisms of gallic acid-induced growth inhibition, apoptosis, and necrosis in hypertrophic scar fibroblasts. *Life Science*. Accepted manuscript.
- Igbokwe P, Tiwari S, Collins J, Tartt J, Russell L. 1988. Amaranth: A potential crop for southwestern Mississippi. *Agronomy and Forestry*. 13: 10.
- Inoue, M, Sakaguchi N, Isuzugawa K. 2000. Role of reactive oxygen species in gallic acid-induced apoptosis. *Biol Pharm Bull*.10: 1153-1157.
- Isuzugawa, K, Inoue M, Ogihara Y. 2001. Catalase contents in cells determine sensitivity to the apoptosis inducer gallic acid. *Biol Pharm Bull*. 9: 1022-6.

- Kluck R, Bossy-Wetzel E, Green D, Newmeyer D. 1997. The release of cytochrome C from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*. 275: 1132-36.
- Korzeniewski C, Callewaert D. 1983. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J Immunol Methods*. 64:211-24.
- Kraujalis P, Venskutonis P. 2013. Supercritical carbon dioxide extraction of squalene and tocopherols from amaranth and assessment of extracts antioxidant activity. *The Journal of Supercritical fluids*. 80: 78-85.
- Kraujalis P, Kraujalienė V, Kraujalienė V, Pukalskas A. 2013. Antioxidant Properties and Preliminary Evaluation of Phytochemical Composition of Different Anatomical Parts of Amaranth. *Plant Foods Hum Nutr*. 5-8.
- Kuo S. 1996. Antiproliferative potency of structurally different dietary flavonoids on human colon cancer cells. *Cancer Lett*. 110: 41-8.
- 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.
- Lakshmi B, Vimala V. 2000. Nutritive value of dehydrated green leafy vegetable powders. *Journal of Food Science Technology*. 37: 465-471.
- Leathwood, P, Plummer T. 1969. *Enzymologia* 37: 242-250.
- Legaria J. 2010. Diversidad genética en algunas especies de amaranto (*amaranthus* spp.). *Revista Fitotecnia Mexicana*. 33: 89-95.
- Li S. 1989. Lactate dehydrogenase isoenzymes A (muscle), B (heart) and C (testis) of mammals and the genes coding for these enzymes. *Biochem. Soc. Trans*. 17, 304– 307.
- 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.
- López-Mejía A, López-Malo A, Palou E. 2014. Antioxidant capacity of extracts from amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) seeds or leaves. *Industrial Crops and products*. 53: 55-59.
- Maher P, Dargusch R, Bodai L, Gerard E, Purcell M, Marsh 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.
- Makus J. 1984. Evaluation of amaranth as a potential greens crop in the mid-south. *HortScience*. 19: 881-883.

- Maldonado- Cervantes E, Hyung- Jin J, León-Galván F, Barrera-Pacheco A, De León-Rodríguez A, González de Mejía E, O. de Lumen B, Barba de la Rosa A. Amaranth lunasin-like peptide internalizes into the cell nucleus and inhibits chemical carcinogen-induced transformation of NIH-3T3 cells. *31*: 1635–1642.
- McIlwain R, Berger T, Mak W. 2013. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *5*(4), 1–28.
- Mendoza C, Bressani R, 1987. Nutritional and functional characteristics of extrusion cooked amaranth flour. *Cereal Chemistry*, *64*: 218–223.
- 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.
- Merck Millipore. 2016. Muse Cell Analyzer. Ubicado en:
http://www.merckmillipore.com/MX/es/life-science-research/cell-analysis/muse-cell-analyzer/hb2b.qB.II0AAAE_vzlkifKv,nav?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com.mx%2F
- Millán J., Montoya A., Gutiérrez R., Peralez X., Reyes C. 2012. Optimization of Extrusion Process for Producing High Antioxidant Instant Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*L.) Flour Using Response Surface Methodology. *Applied Mathematics*. (3) 1516-1525.
- Millipore. 2013. Muse™: Annexin V and Dead Cell Kit User's Guide. Catalog No. MCH100105. 1-15. Ubicado en:
[http://www.icms.qmul.ac.uk/flowcytometry/uses/musekits/protocols/MCH100105%2046003384MAN%20\[B\]%20%20ANNEXIN%20V%20&%20DEAD%20CELL%20KIT%20100%20TEST%20USER'S%20GUIDE.pdf](http://www.icms.qmul.ac.uk/flowcytometry/uses/musekits/protocols/MCH100105%2046003384MAN%20[B]%20%20ANNEXIN%20V%20&%20DEAD%20CELL%20KIT%20100%20TEST%20USER'S%20GUIDE.pdf).
- Miyashita, T., & Reed, J. C. 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, *80*(2), 293–299.
- Mohinder P. 1971. Evolution and Improvement of Cultivated *Amaranthus*. *Science Academy*. (38 B). 28-37.
- Molyneux, P. 2003. The use of the stable free radical diphenylpicryl- hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journal Science Technol*, *50*: 211–219.
- Moquin D, Chan F. 2010. The molecular regulation of programmed necrotic cell injury. *Trends Biochem Sci*.*35*:434–41.
- Morales J., Vázquez N., Bressani R. 2009. El amaranto: Características físicas, químicas, toxicológicas y funcionales y aporte nutricio. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. (5).

- Mujica A. , Berti M., 1997. El cultivo del amaranto (*Amaranthus spp.*): producción, mejoramiento genético y utilización. Universidad Nacional del Altiplano (UNA). 78-81.
- Mustafa A, Seguin P, Gelin B. 2011. Chemical composition, dietary fibre, tannins and minerals of grain amaranth genotypes. *International Journal of Food Science and Nutrition*.
- Omenn G. 1995. GAT accounts for the association of vegetables and fruits with lower incidence of cancers and coronary heart diseases. *Ann Epidemiol.* 5: 333-5.
- 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>.
- Ortíz Martínez M., Winkler R., García Lara S. 2014. Preventive and therapeutic potential of peptides from cereals against cancer. *Journal of Proteomics*.
- Pimentel, A. a., & Benaim, G. 2012. El Ca²⁺ y los esfingolípidos como moduladores de la apoptosis y el cáncer. *Investigacion Clinica*, 53(1), 84–110.
- Porr M. 2009. Amaranto: planta latinoamericana con fuerzas colosales. Laboratorio de fisiología vegetal. Facultad de biología. Universidad de La Habana.
- Prakash D, Pal M. 1991. Nutritional and antinutritional composition of vegetable and grain amaranth leaves. *Journal of Science Food Agriculture.* (57) 573-583.
- Raha P, Thomas S, Thurn T, Park J, Munster 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: 1–16.
- Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weiberg J, Venkatachalam M.1999. Apoptosis: Definition, Mechanisms, and Relevance to Disease. *Am J Med.*107: 489-506.
- Sánchez S., Barba de la Rosa A., León-Galván M., de Lumen B., De León-Rodríguez A., González de Mejía E. 2008. Bioactive peptides in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.* (56) 1233–1240.
- Serasinghe N, Missert J, Ascio J, Podgrabinska S, Wieder Y, Izadmehr S, Chipuk 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.
- Shapiro H. 2003. *Practical Flow Cytometry.* Wiley-Liss: A John Wiley and sons Inc., publication. 4:101.
- Shirai T.1999. Commentary: oncosis and apoptosis: two faces of necrosis in a new proposal to clear up the confusion regarding cell death. *Toxicol Pathol.* 27: 495-96

- Shubhpreet Kaur, Narpinder Singh, Jai Chand Rana. 2010. *Amaranthus hypochondriacus* and *Amaranthus caudatus* germplasm: Characteristics of plants, grain and flours. *Food Chemistry*. 123: 1227–1234.
- Shukla S, Pandey V, Pachauri G, Dixit BS, Banerji R, Singh SP. 2003. Nutritional contents of different foliage cuttings of vegetable amaranth. *Plant Food Human Nutrition*. 58: 1-8.
- Szliszka E, Krol W. 2015. Natural Polyphenols Target the Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL) Signaling Pathway for Cancer Chemoprevention. *Foods and Dietary Supplements in the Prevention and Treatment of Disease in Older Adults*. 13: 119-134.
- Spriet L, Howlett R, Heigenhauser G. 2000. An enzymatic approach to lactate production in human skeletal muscle during exercise. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 32: 756-763.
- Stallknecht, Schulz-Schaeffer. 1993. Amaranth Rediscovered. *New Crop*. 211–218.
- Tabas I, Ron D. 2011. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nature Cell Biology*, 13 3:184–190.
- Talavera S, Felgines C, Texier O, Besson C, Manach C, Lamaison JL, Remesy C. 2004. Anthocyanins are efficiently absorbed from the small intestine in rats. *J Nutr*. 134:2275–2279
- Teutonico R.A., Knorr D. 1985. Amaranth: Composition, properties and applications of a rediscovered food crop. *Food Technology*. 39: 49–60.
- Tomás-Barberán, F. A. 2003. Los polifenoles de los alimentos y la salud. *Alimentación Nutrición y Salud*, 10: 41–53.
- Torroella, M., & Villa, T. S. 1998. *Bases Genéticas del Cáncer*. (Fondo de Cultura Económica, Ed.) (1a ed.). México D.F.
- Uusikua, N.P., Oelofsea A., Duodub, K.G., Bester, M.J., Faberd, M. 2010. Nutritional value of leafy vegetables of sub-Saharan Africa and their potential contribution to human health. *Journal of Food Composition and Analysis*. 23: 499–509.
- Valcárcel-Yamani, B., Caetano da Silva Lannes S. 2012. Applications of Quinoa (*Chenopodium Quinoa* Willd.) and Amaranth (*Amaranthus Spp.*) and Their Influence in the Nutritional Value of Cereal Based Foods, In: *Food and Public Health*. 2: 265-275.
- Venskutonis, P.R., Kraujalis, P., 2013. Nutritional components of Amaranth seeds and vegetables: a review on composition, properties, and uses. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 12. 4: 381–412.
- Walton MC, Lentle RG, Reynolds GW, Kruger MC, McGhie TK. 2006. Anthocyanin absorption and antioxidant status in pigs. *J Agric Food Chem*. 54: 7940–7946.

- 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.
- Wang, L, Jin, F, Qin, A, Hao, Y, Dong, Y, Ge, S, Dai, K. 2014. Targeting Notch signaling pathway positively affects the sensitivity of osteosarcoma to cisplatin by regulating the expression and/or activity of Caspase family. *Molecular cancer*, 13: 139.
- White E, Green D, Letai G. 2014. Apoptosis, Necrosis and Autophagy. *Cancer Biology II*. 14: 209-228.
- WHO. 2007. The World Health Organizations fight against cancer: strategies that prevent, cure and care.
- Wlodkowic D, Telford W, Skommerz J, Darzynkiewicz Z. 2011. Apoptosis and Beyond: Cytometry in Studies of Programmed Cell Death. *Methods in Cell Biology*. 103. 55-98.
- Wolf B, Green R. 1999. Suicidal tendencies: Apoptotic cell death by caspase family proteinases. *Journal of Biological Chemistry*, 274: (29), 20049– 20052.
- Xu Y, Huang S, Liu Z, Han J. 2006. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 signaling to mitochondria in necrotic cell death requires RIP1/TRAF2-mediated JNK1 activation. *J Biol Chem*. 281:8788–
- 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.
- Yun J, Lee W, Kim M, Lu J, Kang M, Kim H, Kim D, Choi E, Choi J, Kim H, Lee Y, Ryu C, Kim G, Choi Y, Park O, Shin S. 2010. Characterization of a profile of the anthocyanins isolated from *Vitis coignetiae* Pulliat and their anti-invasive activity on HT-29 human colon cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*. 48:903-909.
- Zayachkivska O., Kounturek S., Drozdowicz D., Kounturek P., Brzozowski T., Ghegotzky M. 2005. Gastroprotective effects of flavonoids in plantas extracts. *Journal of Psysiology and Pharmacology*. 56: 219-231.
- Zong W, Ditsworth D, Bauer D, Wang Z, Thompson C. 2004. Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. *Genes Dev*.18:1272–82.