



Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa

**CARACTERIZACIÓN PARCIAL FITOQUÍMICA DEL FRUTO DE *Cladocolea
loniceroides* (van Tieghem) Kuijt (Loranthaceae) Y SU EFECTO EN DISTINTOS
CULTIVOS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA**

T E S I S

para obtener el grado de
Doctora en Biotecnología

P R E S E N T A

M. en B. María José Serrano Maldonado

Director: Dr. Jorge Soriano Santos
Codirectora: Dra. Teresa García Gasca
Asesores: Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura
Dra. Carmen De la Paz Pérez Olvera

México, D.F., octubre de 2014

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001466.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00143

Matrícula: 208381266

CARACTERIZACIÓN PARCIAL
FITOQUÍMICA DEL FRUTO DE
Cladocolea loniceroides (van
Tieghem) Kuint
(Loranthaceae) Y SU EFECTO
EN DISTINTOS CULTIVOS
CELULARES DE CÁNCER DE MAMA

En México, D.F., se presentaron a las 11:00 horas del día 17 del mes de octubre del año 2014 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. GERARDO DIAZ GODINEZ
DRA. CARMEN DE LA PAZ PEREZ OLVERA
DR. HECTOR BERNARDO ESCALONA BUENDIA
DR. PABLO GUSTAVO DAMIAN MATZUMURA



MARIA JOSE SERRANO MALDONADO
ALUMNA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA

DE: MARIA JOSE SERRANO MALDONADO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

[Signature]
DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTE

[Signature]
DR. GERARDO DIAZ GODINEZ

VOCAL

[Signature]
DRA. CARMEN DE LA PAZ PEREZ OLVERA

VOCAL

[Signature]
DR. HECTOR BERNARDO ESCALONA
BUENDIA

SECRETARIO

[Signature]
DR. PABLO GUSTAVO DAMIAN MATZUMURA

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa
aprobó la tesis

**Caracterización parcial fitoquímica del fruto de *Cladocolea loniceroides* (van Tieghem)
Kuijt (Loranthaceae) y su efecto en distintos cultivos celulares de cáncer de mama**

que presenta

M. en B. María José Serrano Maldonado

Comité Titorial:

Director: Dr. Jorge Soriano Santos

Codirectora: Dra. Teresa García Gasca

Asesora: Dra. Carmen De la Paz Pérez Olvera

Asesor: Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura

Jurado:

Presidente:

Dr. Octavio Loera Corral

Secretario:

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura

Vocal:

Dra. Carmen De la Paz Pérez Olvera

Vocal:

Dr. Gerardo Díaz Godínez

DEDICATORIAS:

A mis papás Laura y Eduardo, gracias por la motivación, por la inspiración, por el amor y por la vida. Se merecen este triunfo y todo mi reconocimiento por vivir y apasionarse conmigo en cada momento que pasamos con el proyecto y por hacer propio cada objetivo que me he planteado. Sin ustedes, este logro no hubiera sido posible.

A Alex, no tienes idea de lo feliz que me haces, del apoyo que significas para mí en todo momento y de cuánto te quiero y admiro.

A Lalo, porque junto a Alex, eres mi razón para seguir adelante, eres una inspiración para vivir cada sueño y cada meta con gusto y cariño.

Con este valiosísimo y hermoso equipo que me respalda, cualquier obstáculo se puede vencer y lo mejor de todo: cada sueño se puede vivir. Los quiero muchísimo.

AGRADECIMIENTO:

Al Dr. Jorge Soriano Santos, por la confianza y el apoyo para realizar este hermoso proyecto, por compartir sus conocimientos conmigo, por enseñarme el gusto por la docencia y la investigación, pero sobre todo, le agradezco enormemente haberme formado como un científico feliz y honesto.

AGRADECIMIENTOS:

A la planta piloto 1, sus instalaciones y el espíritu de toda la gente que forma y ha formado parte de ella, por todo el tiempo y trabajo compartido, por el equipo formado que después de 6 años juntos, se ha convertido en mi segunda casa y su gente, en mi segunda familia.

Al embarcadero “Nuevo Nativitas”, en especial a los Sres. Rodrigo y Fausto, que me ayudaron en la difícil tarea de obtención de muestras durante todos los años que duró el proyecto.

A todos aquellos que de una u otra manera contribuyeron a que el proyecto saliera adelante y que hicieron que estos cuatro sean inolvidables.

RESUMEN

El muérdago es una planta parásita que absorbe del hospedero agua y sales a través de haustorios hasta causarle la muerte. No hay un control químico para evitar la propagación de la plaga de muérdago, por lo que solo se podan las ramas o árboles infestados. Sin embargo, se ha demostrado en trabajos previos que la especie *Cladocolea (C.) Ioniceroides*, endémica de México, contiene compuestos antioxidantes que pueden presentar efectos benéficos contra el cáncer de mama, posiblemente a través de mecanismos que regulan el estrés oxidativo. El objetivo de este trabajo fue analizar la composición química del fruto de *C. Ioniceroides* en diferentes estados de madurez, así como evaluar el efecto que presenta el extracto acuoso de fruto sobre la muerte de cultivos celulares de cáncer de mama. Para lograr esto, se separó el fruto en sus tres estados de madurez en verde, rojo y senescente y se realizaron extractos acuosos para cuantificar los principales compuestos. Con una marcha fitoquímica se detectó la presencia de polifenoles, flavonoides, leucoantocianidinas, hidroxilos fenólicos, alcaloides, aminoácidos y taninos en los tres estados de madurez. Posteriormente, se determinó la concentración de polifenoles totales, misma que es mayor conforme madura el fruto, alcanzando una concentración máxima en el fruto rojo, lo que se refleja también en la mayor concentración de flavonoides observada en el mismo. En el fruto verde se encontró una mayor concentración de taninos que desciende conforme éste madura siendo fruto verde>rojo>senescente. La concentración de alcaloides fue significativamente mayor en el senescente. Se realizó la hidrólisis de taninos de los extractos acuosos en sus tres estados de madurez donde el fruto verde presentó la concentración mayor. Posteriormente se compararon tres métodos distintos de extracción de proteína, donde la fracción proteínica que se aisló en mayor concentración fueron las albúminas. El fruto senescente presentó la mayor concentración de proteína total, sin embargo, esta concentración es baja comparada con otras fuentes vegetales similares. Se realizó electroforesis de la extracción de proteína total y de las albúminas obtenidas por ambos métodos. En los tres estados de madurez y bajo cualquier condición de extracción se presentaron grupos de proteínas (bandas) con perfiles electroforéticos semejantes, lo que sugiere que por cualquier método de extracción se obtuvieron las mismas proteínas. Más adelante, se evaluó la actividad proteolítica de los extractos con la finalidad de conocer si la baja concentración de proteína se debe a una reacción de proteólisis durante el almacenamiento del fruto, sin embargo se encontró que esta reacción no pudo haber

ocurrido bajo las condiciones de refrigeración mantenidas previas al estudio de los frutos. Por último, se aplicaron tratamientos sobre cultivos de 2 líneas celulares de cáncer de mama (MCF7 y MDA-MB-231) y una línea no cancerosa (MCF10A) a diferentes concentraciones de extracto acuoso de fruto rojo para determinar el efecto que éste presenta sobre la muerte celular, utilizando la concentración letal al 50% (CL_{50}). La línea más resistente fue MCF10A (no cancerosa), ya que mostró una mayor CL_{50} (59.64 μg EAG/mL) mientras que la línea MCF7 fue la más sensible ($CL_{50} = 26.4$ μg EAG/mL). Se demostró que el extracto acuoso del fruto de *C. loniceroides*, que contiene polifenoles, flavonoides, taninos y alcaloides, es capaz de disminuir la viabilidad *in vitro* de las líneas celulares de cáncer de mama estudiadas, con menor efecto sobre la línea celular no cancerosa, por lo que se recomiendan estudios posteriores para identificar mecanismos de acción y de purificación del extracto que permitan la obtención de una solución estandarizada que pueda usarse en el tratamiento del cáncer de mama humano.

ABSTRACT

Mistletoe is a tree parasitic plant which take salts and water through haustorium and, eventually, the host tree dies. There is no chemical control to stop the mistletoe plague, just the infested trees or branches are pruned, but this is also an environmental problem. The Mexican endemic mistletoe named *Cladocolea (C.) loniceroides* has, previously, showed to contain antioxidant compounds with benefit effects against breast cancer. Although, there is any experimental assessment to explain this effect, it might be as consequence of a regulated mechanism of oxidative stress. The aim of this work was to observe the chemical composition of *C. loniceroides* fruits at three different mature stages and to evaluate the death effect of aqueous fruit extract against breast cancer cell cultures. The first step was to separate the three fruit mature stages (green, red and senescent) and to make aqueous extracts of them, in order, to quantify the main compounds. A phytochemical screening was performed and the occurrence of polyphenols, flavonoids, leucoantocyanidins, phenolic hydroxyls, alkaloids, aminoacids and tannins were observed in the three mature fruit stages. Subsequently, total polyphenol concentration was determined. The higher concentration of polyphenols was found in red fruit, the same behavior was found with flavonoids. Green fruit had the higher condensed tannins concentration, which diminished according to the physiological maturity of fruit: green>red>senescent. Alkaloids concentration was significantly higher in senescent fruit. Hydrolysable tannins hydrolysis was carried out to quantify them, at three maturity stages; green fruit afforded the highest concentration. Three methods of proteins extraction were compared. The main protein fraction obtained was albumins. Senescent fruit presented the higher total protein concentration, however this concentration was lower than any other similar vegetables. SDS-PAGE was performed for total protein and albumins obtained by both methods. Three maturity stages and the three extraction methods presented similar electrophoretic profiles. Proteolytic activity was evaluated in order to assess any proteolysis during storage, it was demonstrated that this reaction could have not happened at 5°C. Finally, aqueous red fruit extract was applied on two breast cancer cell lines (MCF7 and MDA-MB-231) and one non-cancerous cell line (MCF10A) at different concentrations to determine medium lethal concentration (CL₅₀). MCF10A was the most resistant cell line (59.64 µg GAE/mL) and MCF7 was the most sensitive (CL₅₀ = 26.4 µg GAE/mL). *C. loniceroides* fruit aqueous extract contained polyphenols, flavonoids, tannins and alkaloids and was capable to induce *in vitro* cancer cell death with minor effect against

non-cancerous cell line. We recommended later studies to identify action mechanism and to purify the extract to obtain a standardized solution which could be used as human breast cancer treatment.

CONTENIDO

RESUMEN	iv
ABSTRACT	x
CONTENIDO	xii
1. Introducción	1
1.1. Muérdago	1
1.2. <i>Cladocolea loniceroides</i> (van Tieghem) Kuijt (Loranthaceae)	2
1.3. Cáncer	4
1.4. Efectos biológicos de los compuestos fitoquímicos	10
2. Antecedentes	15
2. Justificación	17
3. Hipótesis	18
4. Objetivo	19
4.1. Objetivos particulares	19
5. Estrategia general de trabajo (figura 1)	20
6. Metodología	21
6.1. Obtención de extractos	21
6.2. Caracterización fitoquímica	22
6.3. Evaluación del contenido de proteínas y actividad proteolítica	28
6.5. Análisis estadístico	36
7. Resultados y discusión	37
7.1. Caracterización fitoquímica parcial	37
7.2. Composición proteínica y actividad proteolítica en diferentes estados de madurez	43
7.3. Efecto sobre la muerte celular de un extracto acuoso de <i>C. loniceroides</i>	54
8. Conclusión	65
9. Referencias	66
APÉNDICE A	74
APÉNDICE B	75

APÉNDICE C	76
APÉNDICE E.	78
APÉNDICE F.....	79
APÉNDICE G.....	80
APÉNDICE H.....	81
APÉNDICE I	82
APÉNDICE J	84
APÉNDICE K	86

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Mecanismos propuestos mediante los cuales los antioxidantes exógenos pueden prevenir el desarrollo de cáncer.	9
Tabla 2. Polifenoles totales y flavonoides cuantificados en los extractos acuosos y metanólicos de diferentes secciones de C. loniceroides: hoja, tallo y fruto.	15
Tabla 3. Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos acuosos y metanólicos de hoja, tallo y fruto de C. loniceroides.	15
Tabla 4. Características de distintas líneas celulares de cáncer de mama.....	33
Tabla 5. Perfil fitoquímico de fruto verde, rojo y senescente de C. loniceroides.	37
Tabla 6. Concentración de fitoquímicos en frutos de C. loniceroides.	38
Tabla 7. Concentración de proteínas obtenidas por métodos distintos en los tres estados de madurez.....	44
Tabla 8. Concentración letal media de las líneas celulares estudiadas.	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura general de los flavonoides.	11
Figura 2. Estructura general de taninos.	12
Figura 3. Estructuras base de alcaloides presentes en los vegetales, los cuales añaden sustituciones a los anillos para formar alcaloides con actividades específicas.....	13
Figura 4. Marcha fitoquímica aplicada en frutos de <i>C. Ioniceroides</i> en estado de madurez verde, rojo y senescente (Martínez y col., 2008).....	22
Figura 5. Reacción de los compuestos polifenólicos (ácido gálico usado como referencia) con el reactivo de Folin Ciocalteu para formar el cromóforo detectable a 765 nm.	24
Figura 6. Reacción de flavonoides (rutina como referencia) con tricloruro de aluminio para la formación del cromóforo detectable a 510nm.	25
Figura 7. Fundamento de la técnica de vainillina-HCl para cuantificación espectrofotométrica de taninos condensados.	26
Figura 8. Fundamento de la técnica espectrofotométrica para la estimación de taninos hidrolizables mediante la cuantificación directa de ácido elágico liberado por hidrólisis ácida.	27
Figura 9. Fundamento de la reacción para la cuantificación espectrofotométrica de alcaloides con reactivo de Dragendorff.....	28
Figura 10. Método de extracción de proteínas de acuerdo a su solubilidad (Padhye y Salunke 1979).	29
Figura 11. Método de extracción de proteína por solubilidad por el método de Osborne (1924).....	31
Figura 12. Método de extracción con álcali (Paredes-López y col., 1988).....	32

Figura 13. Concentración de taninos hidrolizables en fruto verde a 80, 100 y 120°C en tres tiempos de extracción. Las letras como subíndice indican diferencias significativas entre todos los tratamientos de extracción (Tuckey; $p \leq 0.05$).	41
Figura 14. Concentración de taninos hidrolizables en fruto rojo a 80, 100 y 120°C en tres tiempos de extracción. Las letras como subíndice indican diferencias significativas entre todos los tratamientos de extracción (Tuckey; $p \leq 0.05$).	42
Figura 15. Concentración de taninos hidrolizables en fruto senescente a 80, 100 y 120°C en tres tiempos de extracción. Las letras como subíndice indican diferencias significativas entre todos los tratamientos de extracción (Tuckey; $p \leq 0.05$).	43
Figura 16. Extracción total de proteína de fruto rojo a diferentes tiempos de extracción.	46
Figura 17. Estructura de la clorofila. Muestra en el centro de la molécula un átomo de Magnesio unido a 4 átomos de Nitrógeno, que posiblemente aumenten la concentración de nitrógeno cuantificada por el método de Kjeldahl.....	47
Figura 18. Perfil de absorbancias de Iscador M en el espectro UV (190 a 420 nm). Máximo de absorción a 218 nm.	49
Figura 19. Gel de electroforesis de la extracción de proteína con álcali teñido con azul de Coomassie. Carril 1: marcador, 2: fruto verde, 3: fruto rojo, 4: fruto senescente.	50
Figura 20. Gel de electroforesis de albúminas obtenidas por el método de Padhye y Salunke, las bandas fueron detectadas con azul de Coomassie. Carril 1: marcador, 2: fruto verde, 3: fruto rojo, 4: fruto senescente.	50
Figura 21. Gel de electroforesis de albúminas obtenidas por el método de Osborne, las bandas fueron detectadas por azul de Coomassie. Carril 1: marcador, 2: fruto verde, 3: fruto rojo, 4: fruto senescente.	51
Figura 22. Cinética de actividad proteolítica de extracto de fruto verde a diferentes pH y temperaturas.	52

Figura 23. Cinética de actividad proteolítica de extracto de fruto rojo a diferentes pH y temperaturas.	52
Figura 24. Cinética de actividad proteolítica de extracto de fruto senescente a diferentes pH y temperaturas.	53
Figura 25. Perfil de muerte celular de la línea MCF7 después de 24 h de tratamiento con diferentes concentraciones de extracto liofilizado de fruto rojo de <i>C. loniceroides</i> , a partir del cual se obtuvo una concentración letal media (CL_{50}) de 0.0264 mg/mL.	55
Figura 26. Perfil de muerte celular de la línea MCF7 después de 48 h de tratamiento con diferentes concentraciones de extracto liofilizado de fruto rojo de <i>C. loniceroides</i>	55
Figura 27. Perfil de sobrevivencia de la línea MCF7 después de 72 h de tratamiento con diferentes concentraciones de extracto liofilizado de fruto rojo de <i>C. loniceroides</i>	55
Figura 28. Comparación de la curva dosis-respuesta de la línea celular MCF7 con tratamiento de 24, 48 y 72 h con concentraciones de 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5 y 10 mg EAG/mL de extracto acuoso de fruto de <i>C. loniceroides</i>	56
Figura 29. Tratamiento de 24 h para la línea celular MDA-MB-231, $CL_{50} = 0.045$ mg/mL.	57
Figura 30. Tratamiento de 48 h para la línea celular MDA-MB-231.	57
Figura 31. Comparación de la curva dosis-respuesta de la línea celular MDA-MB-231 con tratamiento de 24 y 48 h con concentraciones de 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5 y 10 mg EAG/mL de extracto acuoso de fruto de <i>C. loniceroides</i>	58
Figura 32. Tratamiento de 24 h para la línea celular MCF10A, $CL_{50} = 0.5964$ mg/mL.	59
Figura 33. Tratamiento de 48 h para la línea celular MCF10A.	59
Figura 34. Comparación de la muerte celular ocurrida en la línea celular MCF10A después de 24 y 48 h de tratamiento con concentraciones de 0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1 y 5 mg EAG/mL de extracto acuoso de fruto de <i>C. loniceroides</i>	60

Figura 35. Principio de detección de viabilidad celular por medio de la reducción de sal de tetrazolio a sal de formazan (color anaranjado), detectable a 450 nm.	63
Figura 36. Curvas comparativas de actividad mitocondrial en las tres líneas celulares estudiadas a diferentes concentraciones de extracto de fruto de <i>C. Ioniceroides</i>	64
Figura 37. Porcentaje de viabilidad celular de las líneas MCF7, MDA-MB-231 y MCF10A en diferentes concentraciones de extracto en miligramos equivalentes de ácido gálico por mililitro de medio de cultivo.....	67

1. Introducción

1.1. Muérdago

El muérdago es una planta parásita que ocasiona graves daños a los árboles y arbustos hospederos, impidiendo su desarrollo hasta causarles la muerte (De la Paz Pérez y Ceja, 2005).

Las plantas parásitas poseen raíces especializadas denominadas haustorios, los cuales penetran los tejidos del hospedante y extraen agua y sales minerales (Alvarado-Rosales y col., 2009). El haustorio va creciendo a través de los tejidos primarios y secundarios del hospedero, separando la corteza externa, el córtex y el floema, hasta llegar al xilema (De la Paz Pérez y col., 2006) del que absorben aproximadamente el 90% de los recursos que requieren. Además de absorber agua y sales minerales del xilema y algunos compuestos orgánicos del floema, los haustorios liberan hacia el árbol reguladores de crecimiento que mantienen abiertas las vías de intercambio de recursos y minimizan las reacciones defensivas del árbol. Si la invasión resultara muy agresiva, la rama podría compartimentar el tejido y la infección fracasaría. Por así decirlo, el muérdago debe mantener permanentemente “engañada” a la rama, haciéndole creer que es parte suya, para sí obtener de ella lo que necesita (Marchal-Valencia, 2009). Presentan hojas con las que producen sus propios carbohidratos a través de la fotosíntesis (hemiparásitas o semiparásitas); a pesar de ello, su grado de dependencia del hospedero es necesario al extraer agua y sales minerales (Lamont, 1983).

En México, los árboles hospederos del muérdago usualmente son coníferas y otros árboles. Esto afecta en forma directa la producción maderera y frutícola del país por la merma que estas plantas parásitas causan en la calidad de la madera o en la pérdida de los individuos. No se conoce con certeza el papel de los muérdagos en el ecosistema, sin embargo, sirve como alimento de varias especies de aves que comen sus frutos. Estas mismas aves son las que transportan los frutos del muérdago de un árbol a otro, además remueven el pericarpio del fruto vía regurgitación o defecación y permiten que germine el embrión. Estos frutos segregan sustancias mucilaginosas que permiten su adherencia a los árboles y así proliferan infectando a un nuevo hospedero (López de Buen, 2005).

En México, los muérdagos generan pérdidas por más de 2 millones de metros cúbicos de madera, sin considerar la muerte del arbolado y la predisposición a otros agentes patógenos, como insectos y hongos (Vázquez y Cibrián, 1996).

La especie de muérdago *Viscum (V.) album*, se ha utilizado desde la Edad Media en la medicina tradicional para el tratamiento de diversos padecimientos; sin embargo, desde 1920 hay evidencia de estudios bioquímicos sobre su composición y actividad biológica, por lo que se ha utilizado por la medicina alternativa e incluso alópata en países como Alemania y Suiza, encontrándose en el mercado extractos estandarizados de lectinas de *V. album* indicados como coadyuvantes en el tratamiento de cáncer que en el mercado se encuentran como productos conocidos como Iscador, Helixor, Plenosal y Abnoba (Bar-Sela, 2011).

1.2. *Cladocolea loniceroides* (van Tieghem) Kuijt (Loranthaceae)

Cladocolea loniceroides es una especie de muérdago perteneciente a la familia Loranthaceae. Esta familia es predominantemente tropical pero actualmente se les encuentra también en climas templados y fríos en el norte y el sur de América. Se localiza principalmente en América, Asia, África, Australia, Nueva Zelanda y Nueva Guinea (Cid-Villamil, 2006). La especie *Cladocolea loniceroides* afecta a muchas especies arbóreas, además de ser uno de los principales agentes de deterioro de la salud de numerosos arbustos. *Cladocolea loniceroides* se identificó por primera vez en el Valle de México sobre truenos (*Ligustrum* spp.) traídos del estado de Morelos (Cházaro y col., 2005) desde entonces, en la zona chinampera de Xochimilco ha ocasionado cuantiosos daños al ahuejote (*Salix blonplandiana*) donde éste árbol desempeña un papel fundamental por los beneficios ecológicos y estéticos que proporciona, entre ellos: protección de cultivos y retención de suelos en las chinampas (Alvarado-Rosales y col., 2009).

Los estudios existentes sobre el género *Cladocolea* en México se han enfocado, principalmente a su taxonomía, a las condiciones ambientales que favorecen su presencia, la histología de la germinación, embriogénesis y desarrollo del fruto. Son pocos los relacionados con el proceso de infección y de las alteraciones anatómicas que ocasiona a sus hospederos (Alvarado-Rosales y col., 2009) y es aún menor la información acerca de su composición química y actividad biológica.

El fruto de *C. loniceroides* es una pseudobaya que mide de 5 a 7 mm de longitud de forma ovoide, subgloboso que al madurar cambia de color rojo púrpura a rojo oscuro. Presenta una semilla desnuda, pues no desarrolla una testa, y contiene uno o dos embriones. Los frutos están rodeados por tres capas: exocarpo, mesocarpo y endocarpo. El exocarpo presenta un tejido viscoso y pegajoso, llamado viscina, el mesocarpo tiene viscina y a veces un material celulósico indigestible que se encuentra en una matriz de pectina que es altamente higroscópica. El endocarpo es delgado y se aloja encima del endospermo que presenta clorofila. La pulpa es pegajosa. En los frutos maduros el endospermo no está delimitado por los tegumentos ya que no se desarrollan, de tal modo que el endospermo forma la mayor parte de la semilla, que es muy notable y rica en materiales nutritivos y taninos (Cid-Villamil, 2006).

El exocarpo contiene taninos que son abundantes en la etapa juvenil y se reducen en la medida que madura el fruto, además de un carbohidrato de tipo mucílago, aceites y ceras; este tejido presenta células taniníferas que desarrollan un proceso de integración de materiales fibrilares con taninos. El mesocarpo contiene una capa de viscina y una parénquima con taninos y con estratos celulares con abundantes cloroplastos. El endocarpo comprende un tejido de protección que consiste en unas células que limitan a otro tejido de reserva, contiene también mucílago y abundantes taninos.

El embrión es verde porque contiene clorofila y presenta de dos a cuatro cotiledones. Por último la viscina es el tejido que permite la germinación del embrión y participa para que el fruto se fije en el hospedero. La viscina contiene proteínas y celulosa y abarca gran parte del fruto (Cid-Villamil, 2006).

En cuanto a estudios químicos de la plata, Morales-Carballo y col. (2010), realizaron un trabajo de investigación para evaluar la actividad citotóxica de hoja, tallo y fruto de *C. loniceroides* sobre *Artemia salina*, donde encontraron bajos porcentajes de mortalidad. Reportaron además la presencia de metabolitos secundarios como terpenos, glucósidos y flavonoides, estos últimos posibles causantes del efecto citotóxico.

Asimismo, Durán-Rodríguez y col. (2010), estudiaron la actividad antimicrobiana de extractos orgánicos de ésta misma especie de muérdago, probándola sobre cuatro especies de bacterias (*Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*),

siendo los extractos metanólicos de tallo e infusión del mismo los que presentaron mayor efecto bactericida (0.1 mg/mL). Estos resultados muestran que los metabolitos secundarios de mayor polaridad de *C. Ioniceroides* tienen un uso potencial en el tratamiento de infecciones gastrointestinales y tratamiento de heridas, ya que inhibe el crecimiento de bacterias implicadas en este tipo de infecciones.

Mientras que en nuestros estudios previos (Serrano-Maldonado y col., 2011), se encontró que *C. Ioniceroides* contiene polifenoles de diversa naturaleza química, lo cual le confiere una gran actividad antioxidante. Pruebas *in vivo*, utilizando ratas como modelo experimental, mostraron que la actividad antioxidante inhibe la lipoperoxidación causada por estrés oxidativo. Por otro lado, un extracto acuoso del fruto fue capaz de inhibir el desarrollo de un cultivo de células de cáncer de mama y colon; lo cual indicaría que éste podría utilizarse para la obtención de un extracto estandarizado que contribuya a la prevención y tratamiento coadyuvante de cáncer, por lo que en el presente trabajo, se busca profundizar en la obtención de información en cuanto a la composición del extracto.

1.3 Cáncer

El cáncer es el nombre general de más de 100 enfermedades, ya que hay varios tipos de cáncer que inician por células anormales que crecen fuera de control. El cuerpo humano está hecho de millones de células vivas que, de manera normal, crecen, se dividen para hacer nuevas células y mueren de manera ordenada. En las primeras etapas de la vida, las células se dividen más rápidamente para permitir el crecimiento de una persona. Una vez que la persona es adulta, las células solamente se dividen para reemplazar a aquellas que han muerto y poder mantener sus funciones (National Cancer Institute, 2014).

El cáncer inicia cuando células de una parte del cuerpo comienzan a crecer fuera de control. Este crecimiento celular es diferente al crecimiento normal. En lugar de morir, las células continúan su crecimiento y forman nuevas células anormales, algunas de las cuales son capaces de invadir otros tejidos. Este crecimiento anormal se da por un daño en el ADN. A pesar de que las células sean capaces de reparar los daños del ADN, en el caso de las cancerígenas esta reparación no es posible y las células no mueren (National Cancer Institute, 2014).

Algunos de los mecanismos moleculares y celulares responsables de la iniciación de la carcinogénesis son mutaciones puntuales de protooncogenes, oncogenes y genes implicados en la transducción de señales celulares, las cuales pueden producir alteraciones fenotípicas, reflejándose en el crecimiento anormal (Domínguez, 2004).

La muerte celular, fenómeno que está disminuido en las células de cáncer, consiste en la detención de los procesos biológicos de la célula a través de cambios morfológicos, funcionales y bioquímicos irreversibles y le impiden realizar sus funciones vitales. En los organismos eucariotas pluricelulares, la muerte celular ocurre como proceso necesario de su desarrollo, este proceso constituye la muerte celular programada, que puede ser por senescencia, diferenciación terminal y apoptosis. La apoptosis es un mecanismo genéticamente programado, en donde la muerte ocurre por una combinación de factores intra y extracelulares (Sánchez, 2001). Es un proceso de muerte celular caracterizado por la activación de proteasas catabólicas (caspasas), destinado a eliminar células infectadas o dañadas genéticamente, con efectos opuestos a la mitosis en la regulación del tamaño de los órganos y de los tejidos. Las células apoptóticas no provocan reacciones inflamatorias de las células vecinas y son eliminadas sin provocar daño tisular inmediato. Se diferencia de la necrosis que se produce por un daño directo, irreversible, de todas las estructuras celulares (Dubin y Stoppani, 2000).

Las caspasas son proteasas dependientes de tioles (residuos de cisteína) caracterizadas por su especificidad para hidrolizar péptidos y proteínas. Estas proteasas actúan en las mitocondrias, en el citosol y en el núcleo celular e incluyen los grupos siguientes: a) mediadoras de la inflamación (caspasas 1, 4 y 5); b) efectoras de la apoptosis (caspasas 3, 7 y 2); c) activadoras de caspasas apoptogénicas (caspasas 6, 8, 9 y 10). Las caspasas actúan como ejecutantes principales de la apoptosis inducida por drogas mientras que en la apoptosis iniciada por los receptores apoptogénicos activados, las caspasas forman, además, una parte integral del mecanismo que conduce a la muerte celular (Dubin y Stoppani, 2000).

La necrosis, por otro lado, es un tipo de muerte celular que se asocia con la pérdida temprana en la integridad de las membranas, lo que resulta en la salida del contenido

citoplasmático a la matriz extracelular y por esto induce una respuesta inflamatoria en el tejido circundante (Sánchez, 2001).

A nivel mundial, el cáncer es responsable de un número importante de muertes. La Organización Mundial de la Salud señala que en 2008, fallecieron 7.6 millones de personas, aproximadamente 13% del total de fallecimientos, y estima que para 2030, aumentará a 13.1 millones (OMS, 2013).

En México, según la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC), el cáncer es la tercera causa de muerte y estima que cada año se detectan 128 mil casos nuevos (Secretaría de Salud, Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud, 2013).

Las neoplasias del epitelio afectan principalmente a la población adulta (mayor de 20 años), estos tumores están en las capas de células que recubren los órganos huecos y las glándulas, al igual que aquellos que forman la superficie externa del cuerpo, carcinomas que se asocian a factores de riesgo por estilos de vida poco saludables o ambientales (Mejía y col., 2005).

Los tumores malignos que padece la población adulta son diferentes según el sexo. En 2011 para los hombres, la principal causa de morbilidad hospitalaria por cáncer se debe a las neoplasias en órganos digestivos (23.9%); le siguen los tumores en órganos genitales (12.2%), siendo el de próstata el más frecuente; y los de órganos hematopoyéticos (9.8%). En tanto en las mujeres, la principal causa de egreso hospitalario por tumores malignos se deben al de cáncer de mama (29.6%); le siguen las neoplasias en órganos genitales (16.7%) del cuello del útero y útero, principalmente; y de los órganos digestivos (14.3%). Siendo el cáncer de mama la primera causa de morbilidad hospitalaria, 57 de cada 100 casos se ubican en las mujeres de 40 a 59 años (INEGI, 2014).

Todos los procesos celulares pueden afectarse por diferentes sustancias que ingresan al organismo con la dieta. Se ha demostrado que una serie de compuestos o nutrientes presentes en la dieta o derivados de la misma están estrechamente relacionados con mecanismos que pueden afectar positiva o negativamente la salud y que un nutriente es capaz de influenciar la transcripción, la traducción y los procesos metabólicos postraduccionales (Go y col., 2003).

En este sentido, las plantas han jugado un rol en el mantenimiento de la salud humana por miles de años y han servido a los humanos como fuentes de medicinas. La Organización Mundial de la Salud estima que alrededor del 80% de la población mundial recurre a las plantas de medicina tradicional para su cuidado (Zamora y col., 2005).

Considerando que el cáncer es la tercera causa de muerte en México, es importante tomar en cuenta que varios estudios epidemiológicos han demostrado que un consumo elevado de frutos, vegetales y cereales enteros en la dieta están fuertemente asociados a una disminución en el riesgo del desarrollo de enfermedades crónicas como el cáncer y las enfermedades cardiovasculares. Los principales compuestos activos en este tipo de fuentes, son más de 5000 fitoquímicos individuales, sin embargo un porcentaje muy elevado sigue siendo desconocido y necesita ser identificado para comprender completamente los beneficios a la salud que pueden aportar los compuestos fitoquímicos.

Los compuestos fitoquímicos pueden clasificarse en carotenoides, fenólicos, alcaloides, compuestos nitrogenados y compuestos organosulfurados, de éstos, los más estudiados son los carotenoides y los fenólicos (Liu, 2004).

Conociendo cómo ocurren los mecanismos de muerte celular, es necesario señalar cómo actúan los compuestos fitoquímicos en la prevención y/o como coadyuvantes en el tratamiento de cáncer. Las células del organismo se encuentran expuestas constantemente a muchos agentes oxidantes propios del metabolismo y a agentes externos provenientes del ambiente, algunos de los cuales son necesarios para la vida. Ejemplos de éste tipo de compuestos es el oxígeno.

El oxígeno molecular (oxígeno triplete) es considerado no tóxico debido a que su reactividad es menor en condiciones fisiológicas, sin embargo, su activación metabólica y su reducción hasta agua se lleva a cabo vía transporte de electrones, lo que forma radicales libres o especies reactivas de oxígeno. Estos intermediarios de la reducción del oxígeno pueden ser nucleofílicos, oxidantes o reductores.

Estas especies reactivas del oxígeno (ROS) formadas por la adición de electrones uno a uno, están involucradas en el desarrollo de varios padecimientos y en la aceleración del envejecimiento causadas por el estrés oxidativo. El estrés oxidativo es un factor que

contribuye de manera importante en el desarrollo de enfermedades crónico degenerativas. Se genera por un desbalance entre la producción de ROS y antioxidantes de defensa por lo que se generan daños oxidativos. Esto se puede dar por una deficiencia en los mecanismos de defensa de antioxidantes o por el incremento de ROS (Wolfe y Hai, 2007).

Es importante considerar que un radical libre es cualquier átomo o grupo que posee uno o más electrones desapareados por lo que son muy reactivos. Estos radicales recorren los sistemas vivos, intentando tomar un electrón de las moléculas estables, con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical ha conseguido el electrón que necesita, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en otro radical, por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una reacción en cadena que sirve para sintetizar compuestos, transformarlos o destruir células (Morales y col., 2009).

Los radicales libres se producen continuamente en el organismo, por medio de reacciones bioquímicas de óxido-reducción, generalmente a partir del oxígeno. Dichas reacciones redox se dan por el metabolismo normal de las células, por los fagocitos, en una reacción inflamatoria, en el metabolismo de ácidos grasos y la síntesis y degradación de biomoléculas. El equilibrio entre oxidantes y antioxidantes regula procesos vitales que incluyen la proliferación celular y la apoptosis. Pero las reacciones de las ROS y los radicales libres con lípidos, proteínas y ADN, producen daño potencialmente peligroso. En particular, el daño oxidativo al ADN contribuye al envejecimiento y a la carcinogénesis (Morales y col., 2009).

De los daños al ADN que se pueden generar, se encuentran la ruptura de la cadena, las mutaciones, cruzamientos, ruptura de cromosomas y rearreglos, que son inductores potenciales de cáncer provocadas por daño oxidativo, que podría ser prevenido por una correcta administración de antioxidantes (Liu, 2004).

Los antioxidantes exógenos, o aquellos que son obtenidos por medio de la dieta, se ha demostrado que presentan distintos mecanismos de acción incluyendo actividad antioxidante, atrapamiento de radicales libres, regulación de la expresión génica en proliferación celular, diferenciación celular, supresión de genes, apoptosis, etc., como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Mecanismos propuestos mediante los cuales los antioxidantes exógenos pueden prevenir el desarrollo de cáncer.

Efecto	Mecanismo
Actividad antioxidante	Atrapamiento de radicales libres y disminución del estrés oxidativo.
Inhibición de proliferación celular	
Inducción de diferenciación celular	
Inhibición de la expresión de oncogenes	
Inducción de la expresión de supresión de tumores	
Inducción de apoptosis	
Inducción del arresto del ciclo celular	
Inducción enzimática	Glutati6n peroxidasa Catalasa Super6xido dismutasa
Inhibici6n enzimática	Ciclooxigenasa-2 6xido n6trico sintasa inducible Xantin 6xidasa
Aumento de las funciones inmunes	
Antiangiog6nesis	
Inhibici6n de la adhesi6n e invasi6n celular	
Inhibici6n de nitraci6n y nitrosaci6n	
Regulaci6n del metabolismo de hormonas esteroides	

Efectos antivirales y antibacteriales

(Liu, 2004).

Una generación excesiva de ROS puede contribuir a la iniciación tumoral. Es esta etapa temprana del desarrollo del cáncer, los polifenoles, gracias a su actividad antioxidante, pueden prevenir del daño oxidativo al ADN causado por los radicales libres o los agentes carcinogénicos e impedir el proceso de iniciación de la carcinogénesis. Dicho bloqueo puede tener lugar a través de diferentes mecanismos: captación directa de los radicales libres, quelación de los cationes divalentes implicados en reacciones de Fenton (Fe^{2+} , Cu^{2+}) y modulación de las enzimas relacionadas con el estrés oxidativo (Surh, 2003).

1.4. Efectos biológicos de los compuestos fitoquímicos.

Las plantas presentan metabolitos secundarios o fitoquímicos que son compuestos bioactivos no nutritivos. Una vez que actúan en conjunto con los nutrientes y fibras de la dieta pueden funcionar como sistema de defensa para reducir el riesgo de sufrir ciertas enfermedades crónicas. Algunos de los compuestos fitoquímicos bioactivos más importantes son los flavonoides, taninos, terpenoides, saponinas y compuestos fenólicos (Krishnaiah y col., 2009).

Cerca de tres cuartas partes de la población mundial ha utilizado medicina tradicional para el cuidado de su salud (Gilani y Atta-ur-Rahman, 2005). Las plantas han sido parte importante de la medicina tradicional, casi el 50% de los fármacos utilizados contra el cáncer han sido aislados de fuentes naturales, mayormente plantas. Por lo tanto, las plantas pueden servir como fuentes potenciales en el desarrollo de nuevas y más efectivas drogas anticáncer (Caamal-Fuentes y col., 2011). Además, la medicina herbal es la más utilizada porque estos remedios son considerados seguros por parte de los usuarios ya que consideran que causan menos efectos secundarios y menor dependencia (Olaku y White, 2011).

Los polifenoles, particularmente los flavonoides, cuya conformación general se muestra en la Figura 1, presentes en frutas, vegetales, especias, hierbas medicinales y bebidas, han sido utilizados para el tratamiento de enfermedades como diabetes, cáncer y enfermedades coronarias, dependiendo de la fuente de la que se extraigan. Además, los flavonoides han

demostrado actividades antioxidantes, antivirales, antimicrobianas y antitóxicas. La actividad biológica de estos polifenoles se debe a sus propiedades redox que juegan un papel importante en la neutralización de radicales libres, en el atrapamiento de oxígeno singulete o triplete y descomponiendo peróxidos. Además presentan la capacidad de donar hidrógenos y de quelar iones metálicos. Cuando son consumidos regularmente en la dieta, los flavonoides están asociados a la reducción en la incidencia de enfermedades como cáncer y padecimientos cardíacos (Al-Dabbas y col., 2006; Tsao y Yang, 2003).

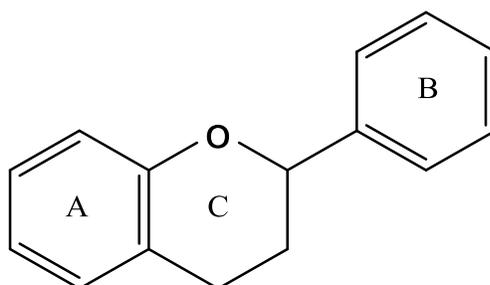


Figura 1. Estructura general de los flavonoides.

Otro grupo de fitoquímicos con actividad importante son los taninos (Figura 2), que tienen efectos diversos en sistemas biológicos, ya que son quelantes de iones metálicos, precipitan proteínas y son antioxidantes biológicos. Debido a los papeles biológicos que pueden llevar a cabo los taninos, es difícil desarrollar modelos que permitan predecir los efectos en algún sistema (Ignat y col., 2011).

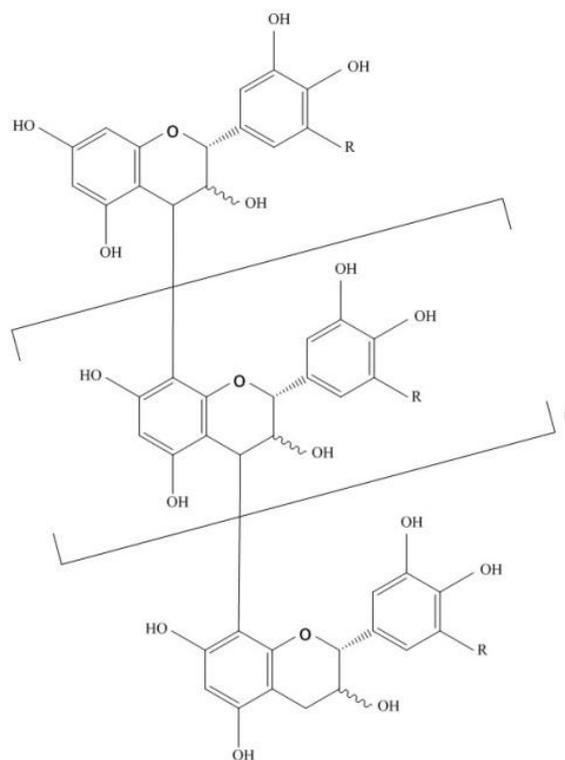


Figura 2. Estructura general de taninos.

Varios estudios han demostrado varios mecanismos de acción que los fitoquímicos llevan a cabo de manera traslapada, incluyendo la actividad antioxidante, neutralizadora de radicales libres, regulación en la expresión de genes en la proliferación celular, diferenciación celular, supresor de genes tumorales; inducción de arresto del ciclo celular y apoptosis; modulación de actividad enzimática en detoxificación, oxidación y reducción, estimulación del sistema inmune, regulación del sistema hormonal y efectos antivirales y antibacterianos (Liu, 2004).

Las plantas producen una gran diversidad de metabolitos secundarios y de ellos, los alcaloides es la clase más prominente. Cerca de 21,000 alcaloides han sido identificados los cuales constituyen el grupo más grande de compuestos nitrogenados. Los alcaloides son importantes para mantener la salud del organismo que lo produce. Una de sus funciones es como defensa química contra organismos herbívoros. Algunos alcaloides tienen actividades antibacterianas, antifúngicas y antivirales. En su estructura, los alcaloides contienen más de un grupo funcional, lo que les permite interactuar con muchas moléculas diana (Wink, 2007).

Para poder detener, inhibir o repeler a los enemigos potenciales, los alcaloides producidos por las plantas deben interferir con blancos moleculares importantes, este efecto puede influir de manera negativa en la comunicación con otros componentes celulares como proteínas. Como consecuencia, el metabolismo y función de células, tejidos, órganos y todo el organismo puede ser afectado. Este conocimiento es importante para entender las funciones de los metabolitos secundarios para el uso racional de los mismos en medicina o protección vegetal (Wink, 2007).

Existen varios tipos de alcaloides, dependiendo de su precursor o estructura base, agrupándose en piridínicos, donde su estructura viene de la piridina a la que se añaden sustituciones en el anillo; los alcaloides pirrolídicos, en los que su estructura deriva del pirrol; alcaloides piperidínicos, indólicos, isoquinoleicos y quinoléicos, cada uno de los cuales presenta efectos biológicos. En la Figura 3 se muestran las estructuras base de alcaloides.

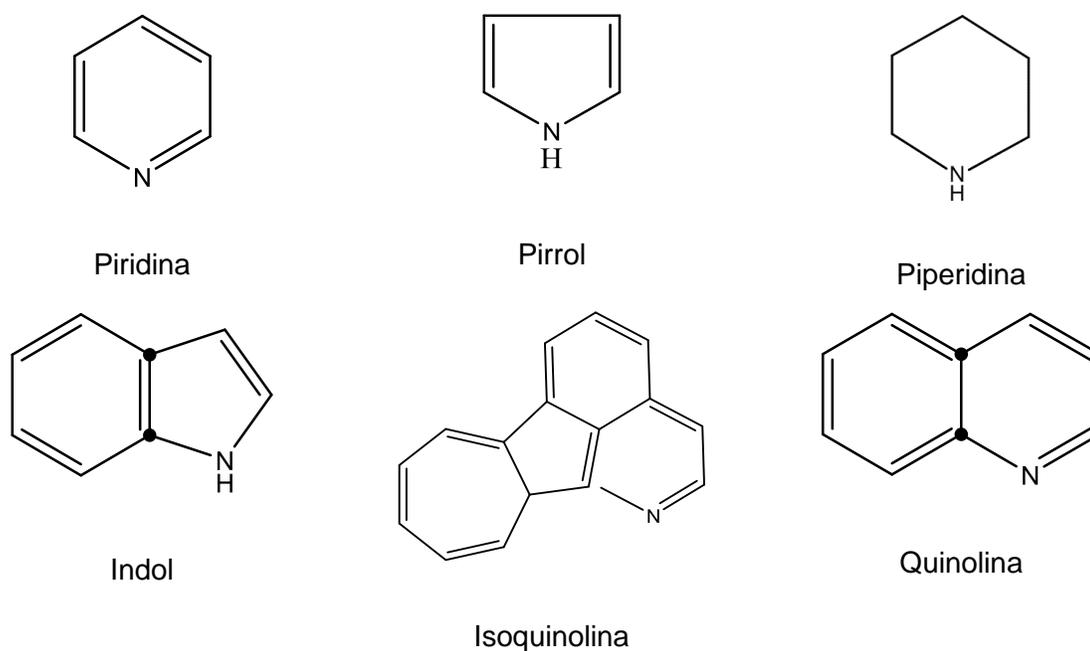


Figura 3. Estructuras base de alcaloides presentes en los vegetales, los cuales añaden sustituciones a los anillos para formar alcaloides con actividades específicas.

Por otro lado, uno de los grupos de macromoléculas de origen biológico más diversos y abundante son los carbohidratos. Éstos están implicados en numerosos procesos bioquímicos como la adhesión celular, la transferencia de información y en la respuesta inmune, entre otras funciones. Los oligosacáridos, que son cadenas cortas de monosacáridos, unidos entre sí mediante enlaces glicosídicos, se encuentran formando parte de glicoproteínas y glicolípidos de las membranas celulares, donde juegan un papel importante en el funcionamiento celular. Dentro de las glicoproteínas se encuentran las lectinas, que son de origen no inmune que reconocen de manera específica carbohidratos de la superficie celular o en suspensión, aglutinan células y precipitan glicoconjugados. Debido a la capacidad de estas proteínas para interactuar con células de la respuesta inmune, algunas lectinas poseen efectos inmunosupresores, otras también son tóxicas, inhiben el crecimiento de células tumorales y participan en la adhesión celular. Se han reportado evidencias de que las lectinas participan en fenómenos tales como el reconocimiento y la eliminación de glicoproteínas del sistema circulatorio, así como de células envejecidas, células tumorales y microorganismos (Hernández-Cruz y col., 2005).

La especie de muérdago *Viscum album* presenta una mezcla de varios componentes con actividad biológica como glicoproteínas, en particular lectinas, polipéptidos, péptidos, aminoácidos, entre otros, que le confieren el importante efecto citotóxico. Las lectinas, que son el componente más estudiado en los extractos de *V. album* tiene dos principales funciones: inhibición de la síntesis de proteínas y apoptosis y una estimulación del proceso inmunológico, lo que ha permitido que estos extractos sean estandarizados y comercializados por buena parte del mercado Europeo como coadyuvante en el tratamiento de enfermedades neoplásicas (Bar-Sela, 2011).

Este uso de las lectinas para el tratamiento de cáncer representa una ventaja debido a que la administración de quimioterapia anticáncer vía intravenosa produce un severo daño a tejidos y órganos ejerciendo un efecto citotóxico incluso sobre células normales. Los medicamentos basados en lectinas pueden representar un gran beneficio en la terapia de cáncer, no sólo por su unión específica en las membranas celulares, sino por su efecto citotóxico y potencial inducción de apoptosis (Ghazarian y col., 2011).

2. Antecedentes.

En trabajos previos se cuantificó la concentración de polifenoles totales y flavonoides en hojas, frutos y tallos de *C. loniceroides* parásito de *Salix bonplandiana*, comparando distintos solventes de extracción. La Tabla 2 muestra las concentraciones encontradas en los extractos de cada parte de la planta.

Tabla 2. Polifenoles totales y flavonoides cuantificados en los extractos acuosos y metanólicos de diferentes secciones de *C. loniceroides*: hoja, tallo y fruto.

Sección/disolvente	Polifenoles totales (mg EAG/g)	Flavonoides (mg eq. Rutina/g)
Hoja/agua	93.3 ± 0.9 ^{c1}	8.26 ± 0.33 ^d
Hoja/metanol	26.3 ± 0.9 ^e	3.78 ± 0.15 ^e
Tallo/agua	120.3 ± 9.0 ^b	9.19 ± 0.27 ^c
Tallo/metanol	31.4 ± 0.4 ^e	3.69 ± 0.21 ^e
Fruto/agua	74.5 ± 4.2 ^d	14.21 ± 0.37 ^b
Fruto/metanol	189.5 ± 4 ^a	36.45 ± 0.54 ^a

¹ Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.

Asimismo se evaluó la actividad antioxidante de estos extractos expresado en porcentaje de inhibición de DPPH', en los que se observó que los extractos de tallo, tanto acuoso como metanólico presentaron una actividad antioxidante significativamente superior al resto de los extractos (p<0.05). En la Tabla 3 se muestran los resultados en porcentaje de inhibición de DPPH', así como el IC₅₀ (concentración de extracto necesaria para tener un 50% de inhibición del radical) expresado en mg equivalentes de ácido gálico.

Tabla 3. Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos acuosos y metanólicos de hoja, tallo y fruto de *C. loniceroides*.

Muestra	% Inhibición de DPPH'	IC ₅₀ (mg eq. AG)
Hoja/agua	77.4 ± 0.5 ^{c,d1}	0.12
Hoja/metanol	83.4 ± 1.7 ^b	2.15

Tallo/agua	84.8± 1.8 ^{a,b}	0.81
Tallo/metanol	90.2 ± 0.1 ^a	0.07
Fruto/agua	82.6 ± 0.4 ^{b,c}	0.39
Fruto/metanol	83.7 ± 0.4 ^b	3.04

¹ Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.

Más adelante se evaluó la actividad quelante de los mismos extractos, ya que es de suma importancia debido a que los metales, especialmente el Fe²⁺, son capaces de iniciar las reacciones de peroxidación lipídica de ácidos grasos insaturados y algunos polifenoles poseen la capacidad de quelar diferentes iones metálicos con lo que evitan el deterioro de los lípidos. Para obtener hasta un 80% de quelación de Fe²⁺ se requirieron hasta 20 mg eq AG/g de cada extracto, mientras que el EDTA utilizado como quelante de referencia, requirió de 20 µg/mL para lograr un 90% de quelación del metal. Todos los extractos presentaron esta capacidad de quelación.

Por otro lado, se evaluó el efecto que presentó el extracto acuoso de fruto sobre las líneas ZR75-1 de cáncer de mama ductal y HT29 de cáncer de colon, construyéndose una curva de muerte celular contra diferentes concentraciones de extracto acuoso de fruto (0.01 a 10 mg EAG/mL de medio de cultivo), en donde se observó que tienen un efecto de muerte de células después de 24 h de tratamiento.

En este estudio previo se concluyó que *C. loniceroides* que infesta a los ahuejotes (*Salix bonplandiana*) de la zona chinampera de Xochimilco podría ser una fuente para la obtención de extractos que contienen polifenoles con actividad antioxidante y capacidad de quelación de metales, los cuales confieren en parte el efecto negativo en la viabilidad de células cancerosas.

2. Justificación.

Cladocolea loniceroides se introdujo accidentalmente en la Ciudad de México y actualmente es un problema grave de infestación en el arbolado del Distrito Federal. Recientemente, es uno de los principales agentes de deterioro del ahuejote, árbol importante para la zona chinampera de Xochimilco.

Los estudios existentes sobre el género *Cladocolea* se han enfocado, principalmente, en su taxonomía, a las condiciones ambientales que favorecen su presencia, la histología de la germinación, embriogénesis y desarrollo del fruto. Son pocos los estudios acerca de su composición bioquímica y actividad biológica. Sin embargo, en trabajos previos se comprobó la elevada concentración de compuestos polifenólicos con actividad antioxidante tanto *in vitro* como *in vivo* y además de presentar inducción de muerte sobre cultivos de líneas celulares de cáncer de mama ductal y cáncer de colon humano. Estos compuestos polifenólicos de fuentes vegetales que presentan potencial farmacológico, con pocos o nulos efectos secundarios, para el uso en medicina preventiva, industria alimentaria y farmacéutica motivan a continuar con el aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de plantas que presentan potencial benéfico para la salud.

Por estos aspectos resulta importante estudiar la composición fitoquímica de *C. loniceroides* ya que podría ser una importante fuente de compuestos antioxidantes bioactivos útiles como coadyuvantes en el tratamiento del cáncer, con lo que se generará un valor agregado a la planta, además de que se contribuirá al manejo integral y aprovechamiento controlado de la plaga.

3. Hipótesis.

Los fitoquímicos extraídos del fruto de *Cladocolea loniceroides* le confieren actividad antioxidante y citotóxica, por lo que el extracto es capaz de provocar la muerte de diferentes líneas celulares de cáncer de mama humano.

4. Objetivo.

Estudiar la influencia del estado de madurez del fruto de *Cladocolea loniceroides* sobre su composición fitoquímica, así como evaluar el efecto del extracto acuoso de fruto rojo sobre la viabilidad de diferentes cultivos celulares de cáncer de mama humano.

4.1. Objetivos particulares.

- Determinar la composición fitoquímica parcial del fruto de *C. loniceroides* en diferentes estados de madurez.
- Evaluar el contenido de proteína y la actividad proteolítica del fruto de *C. loniceroides* en diferentes estados de madurez.
- Evaluar el efecto de un extracto acuoso de *C. loniceroides* sobre la viabilidad de distintas líneas celulares de cáncer de mama.

5. Estrategia general de trabajo (figura 1)

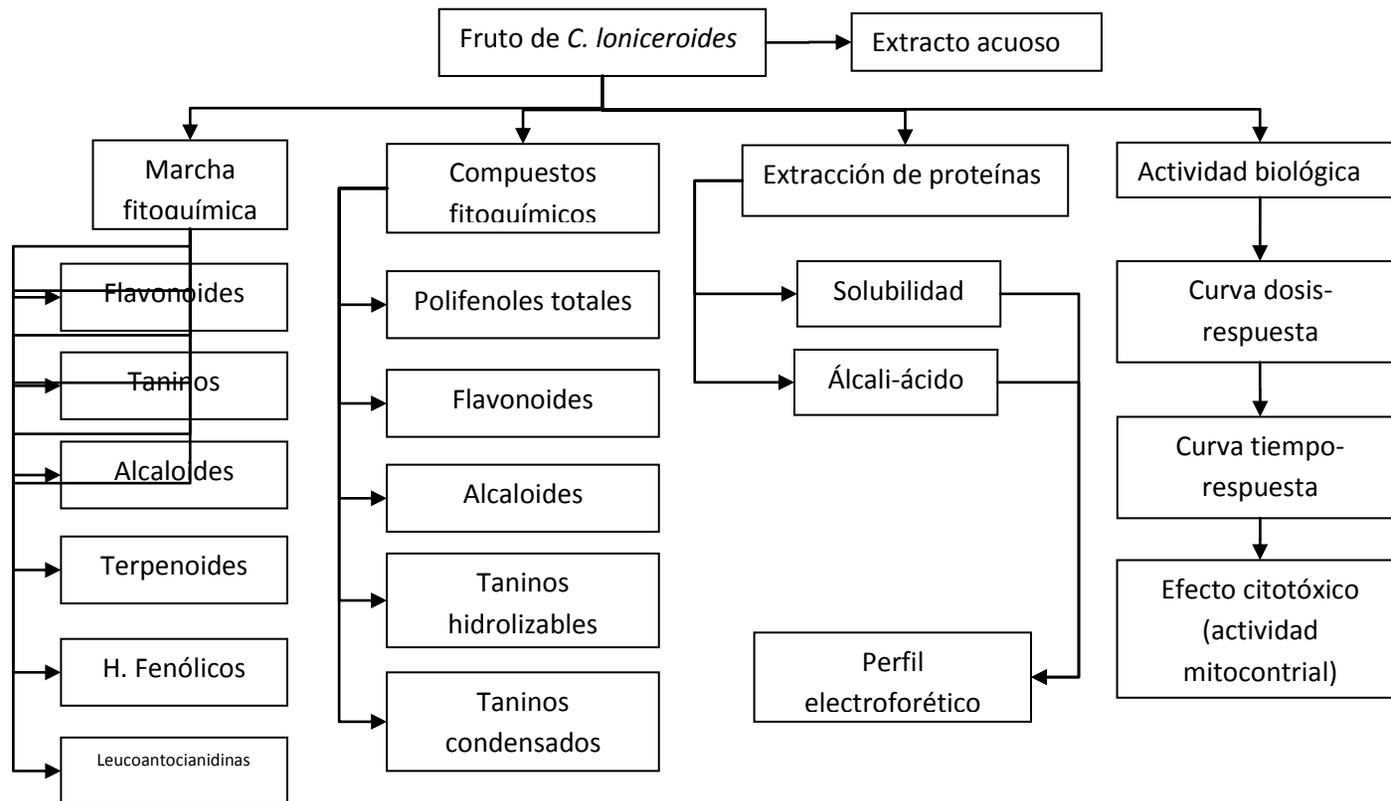


Figura 1. Diagrama de estrategia general de trabajo a partir del fruto de *C. loniceroides* y el extracto acuoso de fruto rojo.

6. Metodología

6.1. Obtención de extractos

Se realizaron extractos acuosos de los frutos de *C. Ioniceroides* en estados de madurez verde, rojo y senescente. La obtención de la muestra se realizó mediante dos extracciones sucesivas con 4 mL de agua por gramo de fruto entero. Se mantuvieron en agitación durante 30 min, se unieron los sobrenadantes y se centrifugaron a 5000 rpm por 10 min. El sobrenadante se mantuvo en refrigeración hasta su uso.

En estos extractos se cuantificó la concentración de polifenoles totales, flavonoides, taninos condensados e hidrolizables y alcaloides.

El extracto de fruto rojo se liofilizó para la aplicación de tratamiento en las líneas celulares de mama. Una vez liofilizado se mantuvo en refrigeración protegido de la luz hasta su uso.

6.2. Caracterización fitoquímica

6.2.1. *Marcha fitoquímica.* En la Figura 4 se muestra el diagrama de obtención de compuestos fitoquímicos en base a su solubilidad.

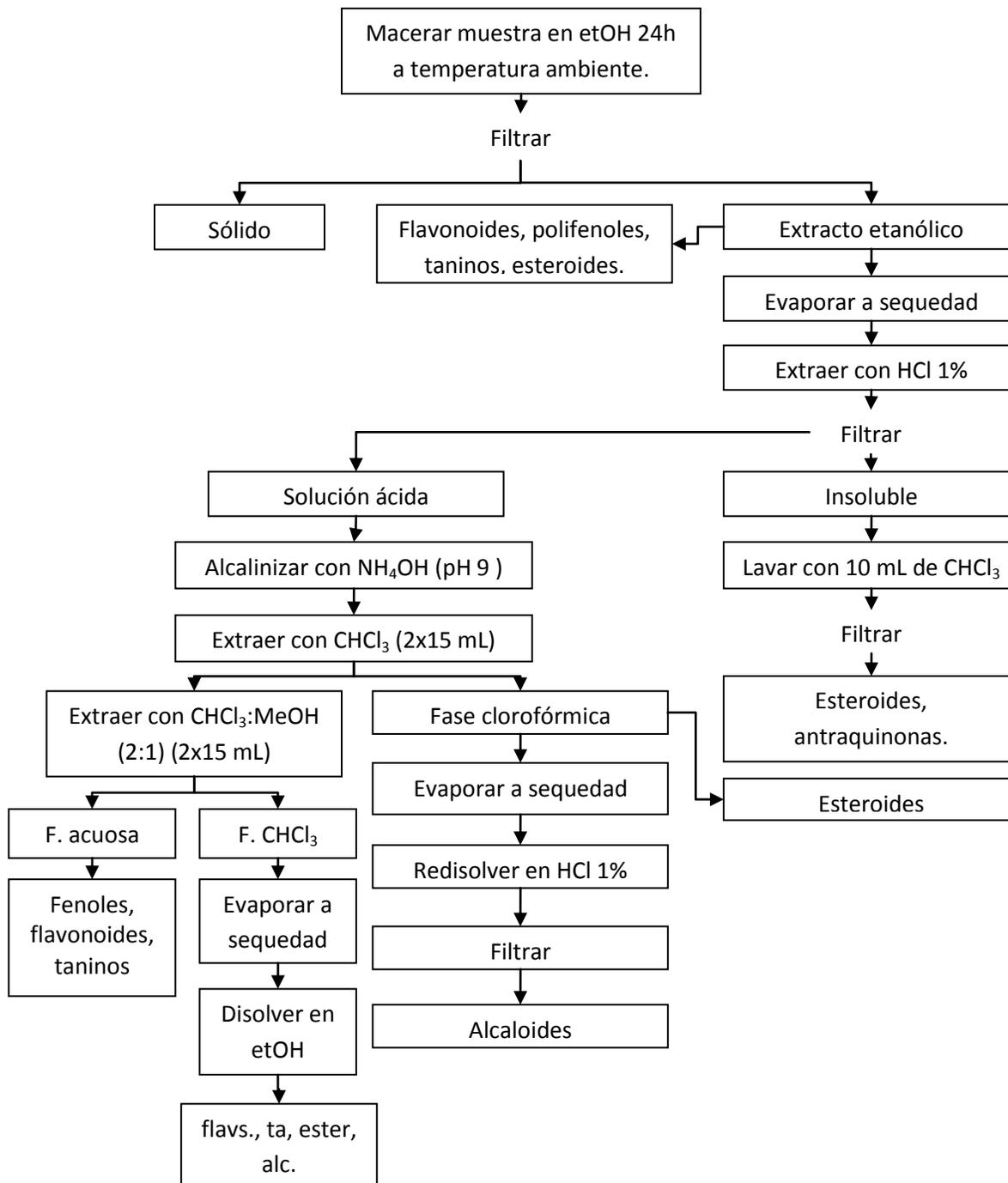


Figura 4. *Marcha fitoquímica aplicada en frutos de C. Ioniceroides en estado de madurez verde, rojo y senescente (Martínez y col., 2008).*

- Polifenoles totales (Método de Folin-Ciocalteu). La mezcla de reacción consistió de 500 μL de muestra, diluída con 4.5 mL de agua, se agregaron 200 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu y 500 μL de solución saturada de Na_2CO_3 , se agitaron los tubos y se adicionaron 4.3 mL de agua destilada. La coloración azul fue indicativo de presencia de polifenoles (Singleton y col., 1999).
- Flavonoides (Ensayo con rutina). Se tomaron 100 μL de extracto, se diluyó con 1250 μL de agua destilada y se mezcló con 75 μL de NaNO_2 al 5%. Tras reposar 6 min, se adicionan 150 μL de AlCl_3 al 10% dejando reposar por 5 min. Después se adicionaron 500 μL de NaOH 1 N y 450 μL de agua destilada. La coloración roja en la mezcla de reacción fue indicativo de prueba positiva (Hossain y col., 2011).
- Leucoantocianidinas (Ensayo de Rosenheim). Se tomaron 0.5 mL de muestra en solución acuosa, se añadieron 250 μL de HCl concentrado y se calentó 10 minutos a 100°C . Una vez frío, se añadieron 0.2 mL de alcohol amílico, se agitó y se mantuvo en reposo para separar las fases. El color carmesí en la fase amílica es indicativo de prueba positiva (Martínez y col., 2008).
- Hidroxilos fenólicos (Ensayo del FeCl_3). Se tomaron 0.5 mL de solución acuosa o alcohólica, se añadió una gota de FeCl_3 al 1% y se mezcló. El desarrollo de coloración violeta, verde o azul es indicativo de prueba positiva (Martínez y col., 2008).
- Triterpenoides y/o esteroides (Ensayo de Liebermann-Burchard). Tomar 0.5 mL de solución clorofórmica de la muestra, se añadieron 0.5 mL de anhídrido acético y una gota de H_2SO_4 concentrado. El desarrollo de coloración violeta, verde o azul es positivo para la prueba (Martínez y col., 2008).
- Alcaloides. En la muestra disuelta en HCl al 5% o acuosa, se añadió una gota de reactivo de Draggendorf, Mayer y Valser (para ver la preparación de los reactivos, ver Apéndice A) (Martínez y col., 2008).
- Saponinas (Prueba de espuma). Tomar 1 mL de solución acuosa de la muestra, agitar durante 10 minutos vigorosamente. El desarrollo de una espuma mayor o igual a 2 mm de altura y su duración mayor a 15 minutos, es considerado prueba positiva (Martínez y col., 2008).
- Aminoácidos (Ensayo de ninhidrina). Colocar una gota de muestra en una tirilla de papel y agregar una gota de ninhidrina 0.002% en alcohol. Calentar en plancha de calentamiento a 105°C . El desarrollo de color rosa o violeta es indicativo de prueba positiva (Martínez y col., 2008).

6.2.2. Cuantificación de polifenoles totales.

Los compuestos fenólicos reaccionan bajo condiciones alcalinas, por lo que la disociación de protones de los fenólicos da lugar a un anión fenolato que es capaz de reducir al reactivo de Folin-Ciocalteu, se forma un complejo azul entre el fenolato y el reactivo independientemente de la estructura del compuesto fenólico (Figura 5).

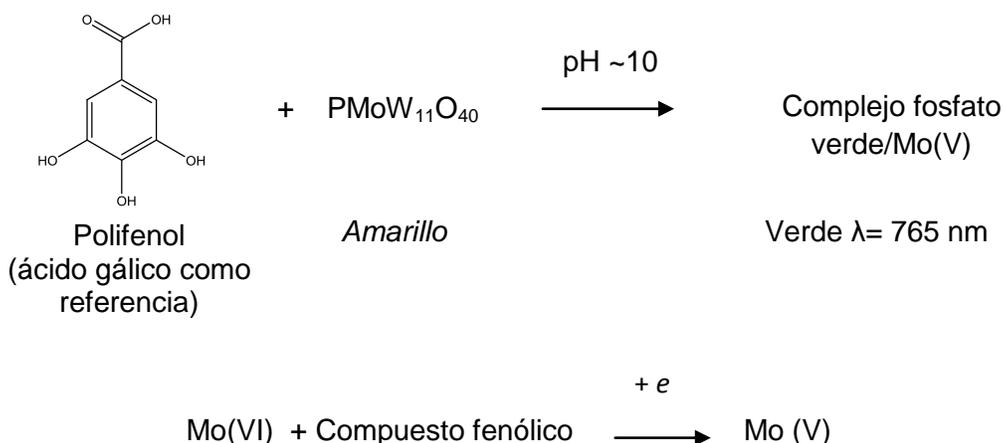


Figura 5. Reacción de los compuestos polifenólicos (ácido gálico usado como referencia) con el reactivo de Folin Ciocalteu para formar el cromóforo detectable a 765 nm.

La mezcla de reacción consistió en 500 μL de muestra con 4.5 mL de agua, se agregaron 200 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu y 500 μL de solución saturada de Na_2CO_3 , se agitaron los tubos y se adicionaron por último 4.3 mL de agua. Se leyó la absorbencia a 765 nm después de 1 h de reposo en la oscuridad. El contenido total de polifenoles fue calculado en equivalentes de ácido gálico (EAG) (Singleton y col., 1999).

6.2.3. Cuantificación de flavonoides.

Los grupos hidroxilo de las posiciones 3 y 5 en los flavonoides son revelados por desplazamiento batocrómico causado por la reacción con cloruro de aluminio (

Figura 6). Los flavonoides se determinaron usando rutina como compuesto de referencia. Se tomaron 100 μL del extracto de fruto en cada uno de los tres estados de madurez, se adicionaron 1250 μL de agua destilada y 75 μL de NaNO_2 al 5%. Tras reposar 6 min, se adicionaron 150 μL de AlCl_3 al 10% dejando reposar 5 min. Después de esto se adicionaron 500 μL de NaOH 1 M y 425 μL de agua destilada. La absorbencia fue leída inmediatamente a 510 nm. La curva patrón de rutina fue de 0 a 0.5 mg/mL (Apéndice C) (Hossain y col., 2011).

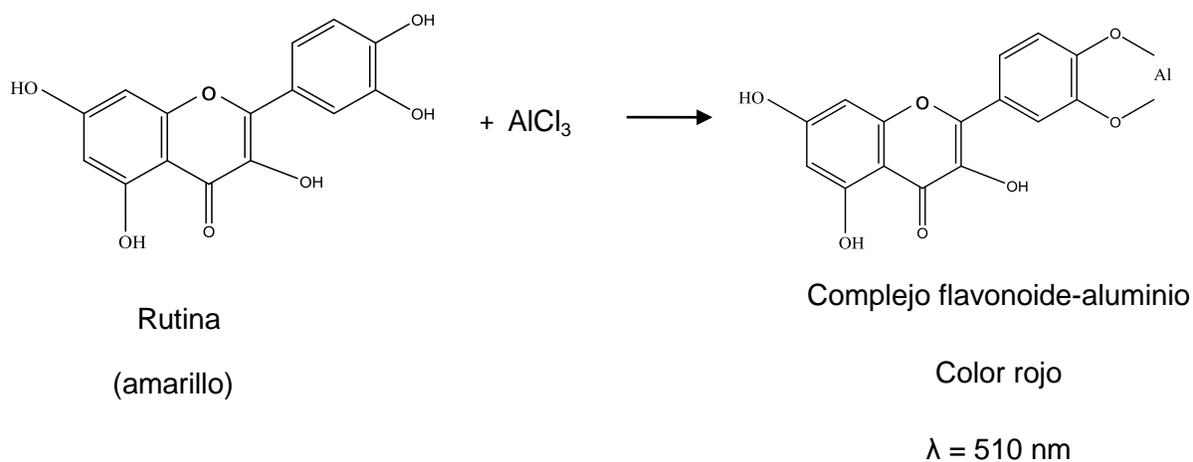


Figura 6. Reacción de flavonoides (rutina como referencia) con tricloruro de aluminio para la formación del cromóforo detectable a 510nm.

6.2.4. Cuantificación de taninos condensados.

Se cuantificaron taninos condensados por el método de vainillina-HCl (Price, 1978). La especificidad de este método se basa en que los flavonoles y dihidrochalconas tienen un enlace simple en las posiciones 2, 3, donde se une la vainillina creando el cromóforo rojo (Figura 7).

Se analizó la concentración de taninos condensados en el extracto acuoso de los frutos en los distintos estados de madurez. La mezcla de reacción consistió en 125 μL de muestra, a los que se añadieron 750 μL de reactivo de vainillina (4% w/v en metanol) y 325 μL de HCl concentrado. Como referencia, se utilizó una solución de catequina (cat) con concentraciones de 100 a 1000 ppm. La absorbencia fue detectada a una longitud de onda de 500 nm (Apéndice D).

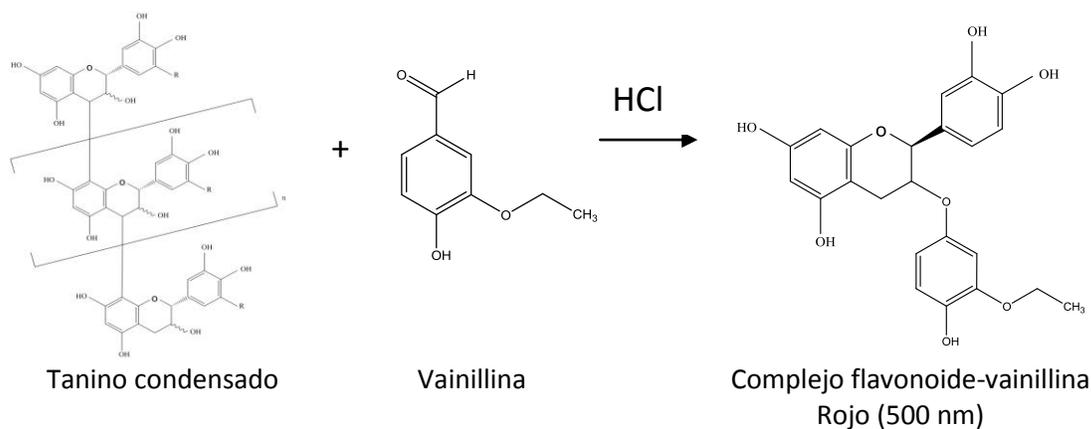


Figura 7. Fundamento de la técnica de vainillina-HCl para cuantificación espectrofotométrica de taninos condensados.

6.2.5. Cuantificación de taninos hidrolizables.

Se cuantificaron taninos hidrolizables por el método propuesto por Isaza y col. (2007), en donde los monómeros de los taninos son liberados por hidrólisis ácida y son cuantificados como liberación de ácido elágico (Figura 8). La mezcla de reacción consistió en 1 mL de extracto mezclado con 1.05 mL de HCl 12 N y 0.95 mL de isopropanol. La mezcla de reacción se mantuvo cerrada herméticamente en calentamiento a 80, 100 y 120°C por 1, 2 y 3 horas. Igualmente, se varió la concentración de HCl para determinar las mejores condiciones para la obtención de una mayor concentración de taninos hidrolizables. Por último, se tomó lectura de la absorbencia a 368 nm.

La curva estándar de taninos hidrolizables se realizó con ácido elágico (AE) de 1 a 20 ppm en medio ácido alcohólico (Apéndice E).

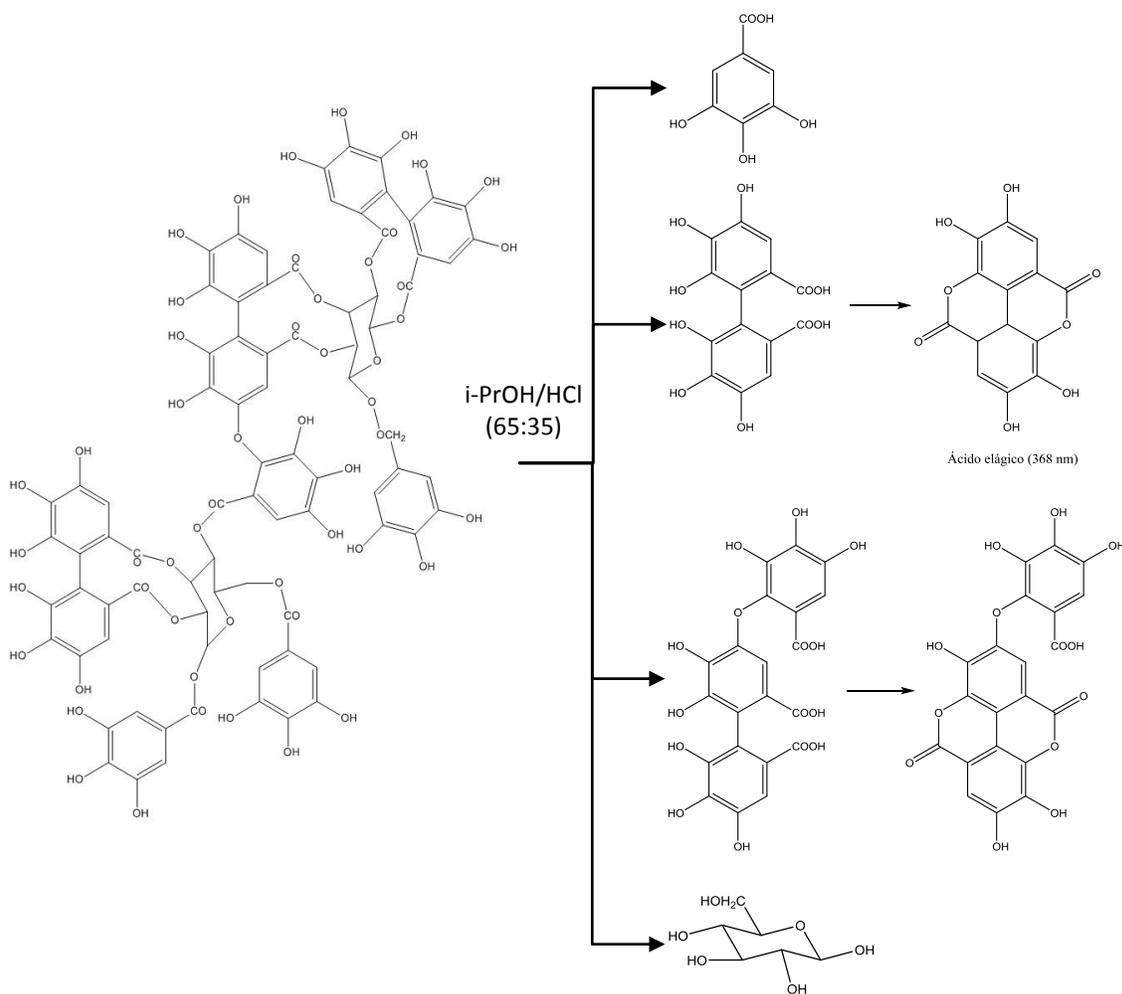


Figura 8. Fundamento de la técnica espectrofotométrica para la estimación de taninos hidrolizables mediante la cuantificación directa de ácido elálgico liberado por hidrólisis ácida.

6.2.6. Cuantificación de alcaloides.

Se cuantificaron alcaloides por el método propuesto por Sreevidya y Mehrotra (2003) para detección espectrofotométrica (Figura 9). Al extracto disuelto en HCl (pH 2-2.5) se le adicionaron 2 mL de reactivo de Dragendorff. Se centrifugó y lavó el precipitado con etanol. Después de centrifugar, se adicionaron 2 mL de Na_2S al 1%, se centrifugó y se redisolvió el residuo en 2 mL de HNO_3 y se aforó con agua a 10 mL. De esta solución, se tomó 1 mL y se adicionaron 5 mL de tiourea y se midió la absorbencia a 435 nm. La curva estándar se realizó con una solución de nitrato de bismuto en ácido nítrico y tiourea (Apéndice F).

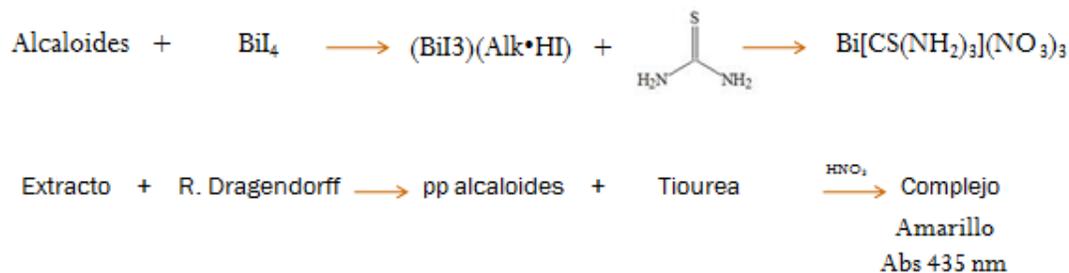


Figura 9. Fundamento de la reacción para la cuantificación espectrofotométrica de alcaloides con reactivo de Dragendorff.

6.3. Evaluación del contenido de proteínas y actividad proteolítica.

Se evaluaron tres métodos de extracción de proteína, propuestos por Padhye y Salunke (1979), Osborne (1924) y por último una extracción con álcali y precipitación ácida (Paredes-López y col., 1988).

Para desengrasar la harina, se realizó una pasta de fruto de muérdago en mortero al momento del análisis y se extrajo la grasa tres veces con acetona (5 mL/g) con agitación continua a temperatura ambiente por 16 horas y secada a temperatura ambiente. El fruto desengrasado se molió y tamizó por una malla del número 40 (420 micras) y se mantuvo a 4°C hasta su análisis.

A las muestras obtenidas por cada método de extracción se les cuantificó la concentración de proteína cruda por el método de Kjeldahl (AOAC, 2000) y la concentración de proteína adherida a colorante (Bradford, 1976). En el anexo G se muestra la metodología para la cuantificación de nitrógeno total y proteína cruda por el método de Kjeldahl y en el anexo H se muestra la curva estándar usando albúmina sérica bovina como referencia, para la cuantificación de proteína por Bradford.

6.3.1. Método de Padhye y Salunke.

La Figura 10 muestra el diagrama para la extracción de proteína de acuerdo a su solubilidad por el método de Padhye y Salunke (1979).

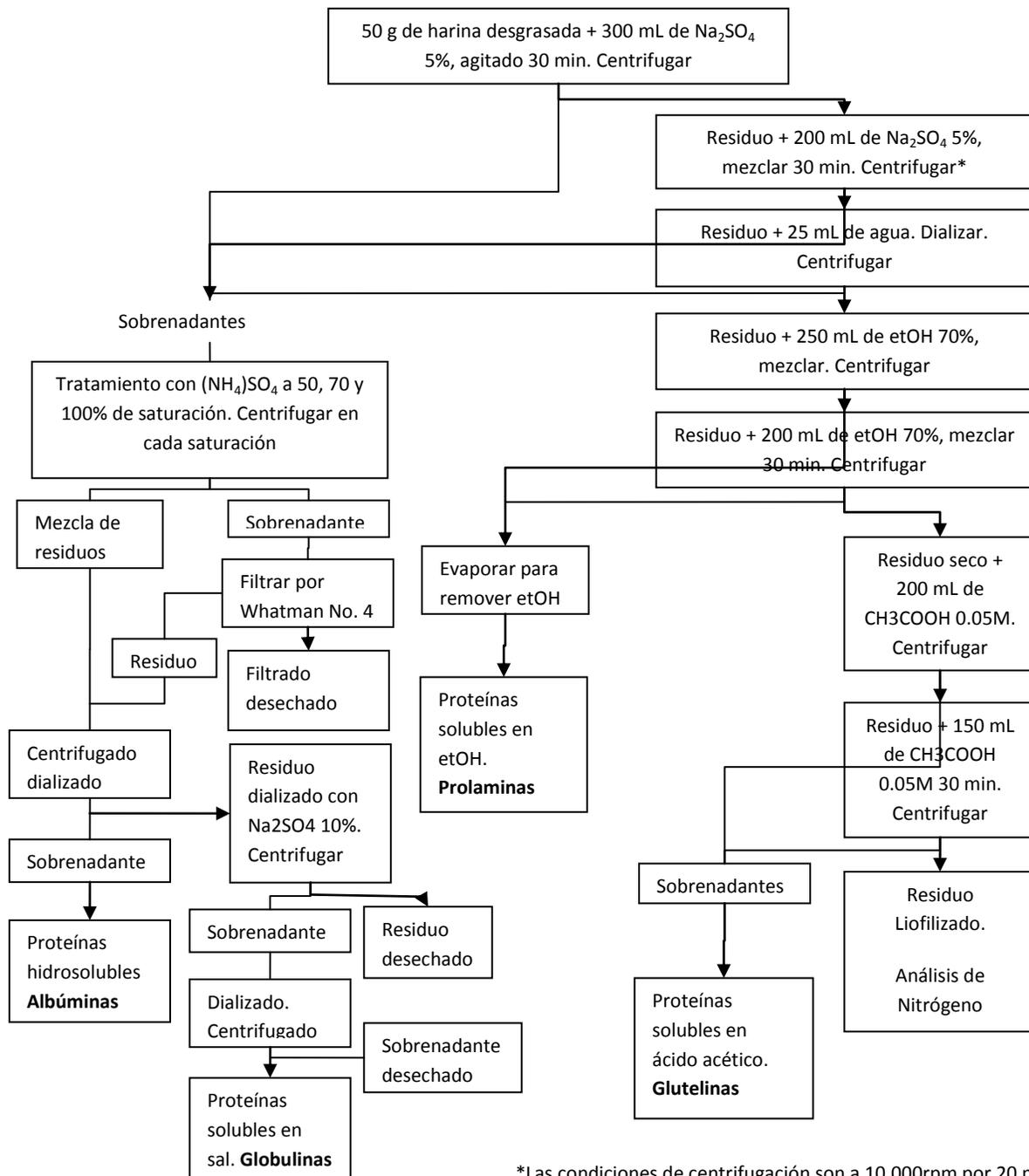


Figura 10. Método de extracción de proteínas de acuerdo a su solubilidad (Padhye y Salunke 1979).

6.3.2. Método de Osborne.

Para la extracción de proteínas por solubilidad por el método de Osborne (Figura 11), cada paso de extracción se realizó 2 veces a 4°C, en agitación durante 8 y 6 h, respectivamente usando la solución correspondiente:

Solución A: NaCl 0.1 M, K₂HPO₄ 0.01 M, pH 7.5, EDTA 0.001 M, NaN₃ 0.02%.

Solución B: NaCl 1M, K₂HPO₄ 0.01M, pH 7.5, EDTA 0.001 M, NaN₃ 0.02%.

Solución C: etanol 70%, K₂HPO₄ 0.01M, pH 7.5

Solución D: Ácido bórico 0.01 M, pH 9, SDS 1 %, 2-β-mercaptoetanol 1%.

En cada paso, se separó el extracto proteínico por centrifugación a 10,000 rpm por 20 min a 4°C (Osborne, 1924).

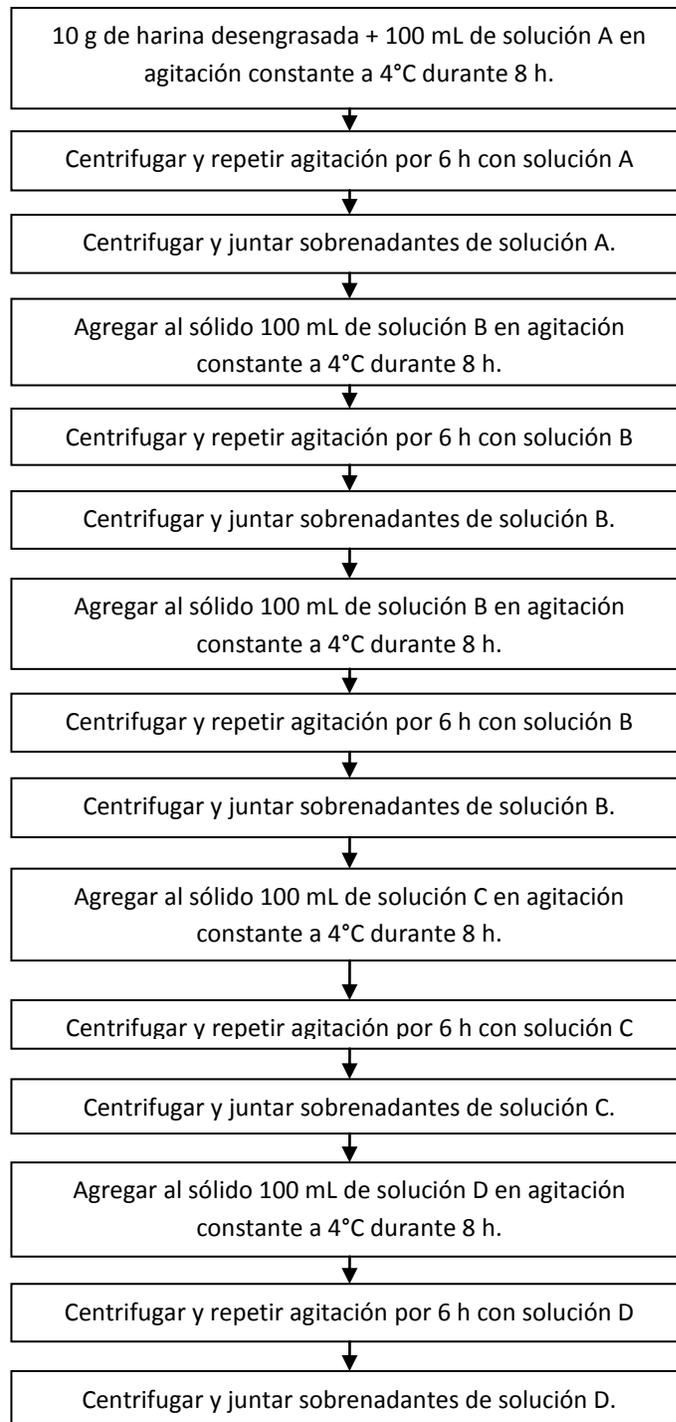


Figura 11. Método de extracción de proteína por solubilidad por el método de Osborne (1924).

6.3.3. Extracción con álcali y precipitación ácida.

La Figura 12 muestra el diagrama de flujo de la extracción de proteína total con álcali y precipitación ácida.

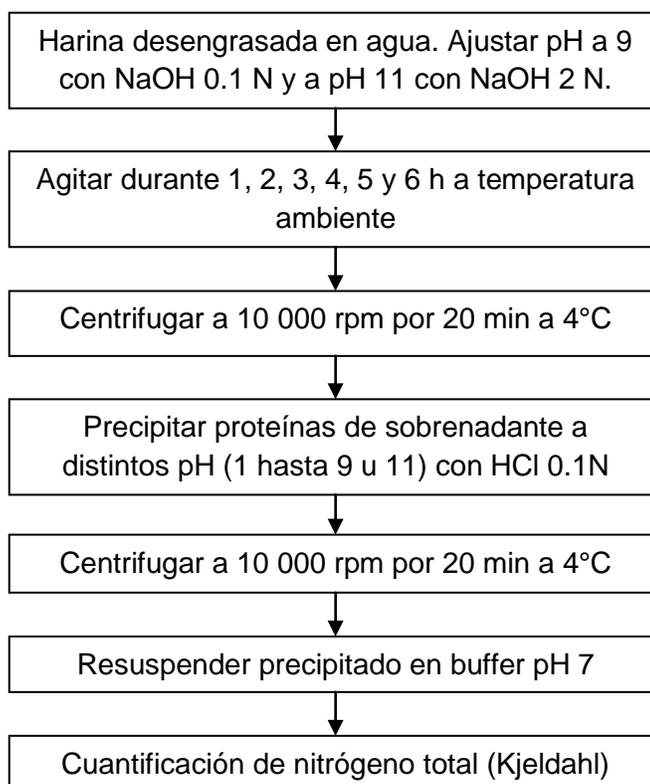


Figura 12. Método de extracción con álcali (Paredes-López y col., 1988).

6.3.5. Electroforesis.

Se realizó el perfil electroforético de las proteínas obtenidas por cada método de extracción en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio, de acuerdo al método de Laemmli (1970). La preparación de las soluciones stock para la elaboración de los geles, así como el buffer de muestra, se enumeran en el Apéndice I.

Las muestras se diluyeron 1:1 en buffer de muestra y se inyectaron 20 μ L en cada uno de los pozos del gel.

El marcador utilizado fue Sigma Marker™ con un rango de peso molecular de 6,500 a 66,000 Da. La concentración de proteína de cada muestra fue ajustada a 2 mg/mL en cada pozo, para llevar a cabo una corrida a 200 V por 40 min a temperatura ambiente. Las bandas de proteína fueron reveladas por tinción con azul de Coomassie.

6.3.6. Actividad proteolítica.

Para determinar la actividad proteolítica se utilizó caseína como sustrato de acuerdo al método propuesto por Pereira-Rodarte y col. (2011) con algunas modificaciones. Se mezclaron 250 µL de extracto de fruto de muérdago con 500 µL de caseína al 1% preparada en amortiguadores del 2 al 13, y se mantuvieron a diferentes temperaturas. La cinética se siguió durante 2 h, tomando muestras cada 20 min. La reacción se detuvo con 375 µL de ácido tricloroacético al 20% y se llevaron a baño de hielo. Una vez fríos, se centrifugaron a 10,000 rpm por 20 min a 4°C. La actividad proteolítica fue determinada por la lectura de absorbencia a 214 nm del sobrenadante. Se determinó la concentración de proteína no hidrolizada al final de la reacción (Pereira-Rodarte y col., 2011).

6.4. Evaluación de la viabilidad celular.

6.4.1. Cultivo celular

Se realizaron cultivos celulares de las líneas MCF7, MDA-MB-231 (adenocarcinoma de glándula mamaria) y MCF10A (fibrosis de glándula mamaria), cuyas características se muestran en la Tabla 4. Las células se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco; Cat. 12100-038) enriquecido al 5% con suero fetal de bovino (SFB) (Biowest; Cat. S1650-050). En el apéndice J se enumeran los componentes de los medios de cultivo.

Tabla 4. Características de distintas líneas celulares de cáncer de mama.

Características	MCF7	MDA-MB-231	MCF 10A
Tejido	Glándula mamaria; adenocarcinoma	Glándula mamaria; adenocarcinoma	Glándula mamaria; enfermedad fibroquística
Edad	69 años	51 años	36 años
Género	Mujer	Mujer	Mujer
Etnia	Caucásica	Caucásica	Caucásica
Morfología	Epitelial	Epitelial	Epitelial
Propiedades de crecimiento	Adherente	Adherente	Adherente
Tumorigénico	SI	SI	No
Receptores expresados	Receptor de estrógeno	Factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante (TGF α)	Insulina, glucocorticoides, enterotoxina del cólera y factor de crecimiento epidérmico
Otras características	El crecimiento se inhibe por TNF α . Expresa el oncogen WNT7B	Expresa el oncogen WNT7B	Expresa antígenos específicos detectados por reacción positiva con anticuerpos monoclonales MFA y MC-5

(ATCC, 2012).

Las células se mantuvieron en cajas o botellas a 37°C en atmósfera humidificada de CO₂ al 5% para mantener la acidez necesaria en el medio de cultivo.

Para la expansión del cultivo, se retiró el medio por succión y se cosecharon las células adicionando la solución de tripsina-EDTA por 5 min, seguido de DMEM con SFB. Después de centrifugar a 1000 rpm por 10 min, se resuspendieron las células en medio y fueron resembradas en cajas. El recuento de células se realizó en cámara de Neubauer con tinción con azul de tripano.

6.4.2. Curva dosis-respuesta y tiempo-respuesta de extracto acuoso de fruto rojo sobre cultivos de cáncer de mama.

Las células fueron sembradas en placas de 24 pozos a una densidad de 3×10^4 células por pozo. Después de 48 h de la siembra se aplicó el tratamiento con extracto acuoso de fruto a una concentración de 10, 5, 1, 0.5, 0.1 y 0.01 mg eq. AG/mL de medio de cultivo por triplicado, así como un control negativo, que consistió en medio con SFB y un control positivo con Iscador M Arg. al 10% en medio de cultivo, para las líneas MCF 7, MDA-MB-231 en DMEM y para la línea MCF10A disuelta en DEMEM/F12 con 5% de SFB para todas las líneas celulares. El extracto acuoso se encontraba liofilizado, por lo que la disolución del mismo, se hizo directo en el medio de cultivo. Después de 24, 48 y 72 h de tratamiento, el medio fue removido y las células se cosecharon con una solución de tripsina-EDTA. Las células fueron resuspendidas y contadas en cámara de Neubauer después de ser teñidas con azul tripano (Lyu, 2006).

Con los resultados obtenidos del recuento celular de cada tratamiento, se construyó la curva dosis-respuesta y se determinó la concentración letal media linearizando la curva de porcentaje de sobrevivencia (Microsoft Office Excel 2010).

6.4.3. Evaluación de viabilidad, proliferación y citotoxicidad celular.

Para la evaluación del efecto citotóxico del extracto acuoso del fruto de *C. Ioniceroides*, se utilizó el estuche CellCounting Kit-8 de Dojindo (Cat CK04-11) para evaluar proliferación y citotoxicidad. El kit contiene WST-8 (2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio, sal de monosodio) que se reduce en presencia de un donador de electrones, actividad de deshidrogenasas provenientes de la cadena respiratoria mitocondrial, produciendo una solución hidrosoluble de formazan de color anaranjado que se cuantificó a 450 nm. El apéndice K muestra el protocolo del CellCounting Kit-8.

6.5. Análisis estadístico.

A los resultados se les aplicó una prueba de análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguido de la prueba de comparación múltiple de medias de Tuckey con un nivel de significancia $p < 0.05$ (SPSS ver. 17).

7. Resultados y discusión.

7.1. Caracterización fitoquímica parcial.

7.1.1. Marcha fitoquímica.

Se realizó una marcha fitoquímica en fruto verde, rojo y senescente, con el fin de conocer de manera cualitativa qué compuestos fitoquímicos se encuentran en el fruto de *C. loniceroides* en distintos estados de madurez (Tabla 5).

Tabla 5. Perfil fitoquímico de fruto verde, rojo y senescente de *C. loniceroides*.

Fitoquímico	Fruto verde	Fruto rojo fresco	Fruto rojo senescente
Polifenoles	++	++	++
Flavonoides	+	++	++
Leucoantocianidinas	+	+	++
Esteroles	-	+	+
Alcaloides	+	+	+
Saponinas	-	-	-
Aminoácidos	+	+	+
Taninos	++	++	++
Hidroxilos fenólicos	+	+	+

(Negativo -, positivo +, francamente positivo ++).

Se observa la presencia de polifenoles en los tres estados de madurez del fruto, sin embargo, a medida que el fruto madura, la presencia de flavonoides es más notable, debido a que los flavonoides son los responsables de la coloración roja del fruto. Las leucoantocianidinas se encuentran en los tres estados de madurez, pero más concentradas en el fruto senescente, debido a que éste ya perdió humedad. Es notable la presencia de taninos en los tres estados de madurez, así como la de alcaloides, hidroxilos fenólicos, esteroles y aminoácidos. En ninguna de las muestras analizadas se halló la presencia de saponinas.

Varios autores han realizado el perfil fitoquímico de plantas con actividad biológica, ya que se sabe que varios compuestos fitoquímicos, especialmente polifenoles como flavonoides,

fenilpropanoides, ácidos fenólicos, taninos, entre otros, son conocidos por ser responsables del atrapamiento de radicales libres y por poseer actividad antioxidante, capacidad de inhibición de peroxidación y quelación de metales de transición (Amari y col., 2014).

Amari y col., (2014) estudiaron el perfil fitoquímico de *Thymelaea hirsuta*, planta tradicionalmente utilizada como antiséptico, antiinflamatorio y para el tratamiento de hipertensión. En ella encontraron la presencia de alcaloides, taninos, saponinas, cumarinas, terpenoides y antraquinonas en hojas, flores y tallos de la planta, todos estos compuestos pueden contribuir a la actividad terapéutica observada.

7.1.2. Contenido de polifenoles, flavonoides, taninos y alcaloides.

La Tabla 6 muestra la concentración de los fitoquímicos más importantes en el fruto en sus tres estados de madurez.

Tabla 6. Concentración de fitoquímicos en frutos de *C. loniceroides*.

Fitoquímico	Fruto verde	Fruto rojo	Fruto senescente
Polifenoles totales (mg EAG/g)	37.73 ± 0.47 ^{b1}	52.6 ± 1.47 ^a	38.83 ± 0.76 ^b
Flavonoides (mg eq. Rut/g)	0.15 ± 0.004 ^b	0.23 ± 0.003 ^a	0.14 ± 0.002 ^b
Taninos condensados (mg eq. Cat/g)	33.1 ± 0.98 ^a	14.78 ± 0.25 ^b	13.8 ± 0.28 ^b
Alcaloides (mg/g)	0.893 ± 0.007 ^b	0.666 ± 0.002 ^c	0.956 ± .002 ^a

¹Las letras indican diferencias significativas entre columnas dentro de una misma fila (Tuckey; $p \leq 0.05$).

La concentración de polifenoles totales fue mayor conforme madura el fruto, alcanzando una concentración máxima en el fruto rojo de 52.6 ± 1.47 mg EAG/g, comparado con los

frutos verde y senescente que no mostraron diferencias significativas entre ellos. Lo anterior concuerda con el hecho de que la concentración de polifenoles está conferida principalmente, por el color rojo característico del fruto maduro, que se refleja también en la mayor concentración de flavonoides (0.23 ± 0.003 mg eq. Rut/g) observada en el fruto rojo. Por otro lado, en el fruto verde se encuentra una mayor concentración de taninos que desciende conforme éste madura. Estos fenómenos de aumento de flavonoides y descenso de taninos van de la mano, ya que los taninos condensados están formados por la polimerización de catequina (flavonoide), fracciones que se liberan conforme ocurre la maduración y como consecuencia se ve aumentada también la concentración de polifenoles totales.

Los taninos condensados se acumulan en las vacuolas, usualmente en las capas epidermales o subepidermales de hojas y frutos, mientras que los taninos hidrolizados se concentran en la pared celular. Los taninos en los frutos son responsables de su astringencia durante las primeras etapas de su desarrollo, funcionando como protectores del ataque de herbívoros, disminuyendo la digestión de proteínas en los depredadores, de ésta manera los frutos pueden llegar a su completo desarrollo completo (Barbahenn y Constabel, 2011; Tessmer y col., 2014).

Este fenómeno se observa en la mayoría de los frutos, Tlili y col., (2011) observaron que la concentración de polifenoles totales y otros fitoquímicos cambia durante el proceso de maduración de distintas variedades de sandía pasando de 42.4 en estado blanco (completamente inmaduro) a 137.2 mg EAG/kg en estado rojo (maduración completa) en la variedad Crimson, o de 126.8 a 260.2 mg EAG/g en la variedad Giza (Tlili y col., 2011), de manera que la composición fitoquímica durante el proceso de maduración es similar en varios frutos.

La concentración de alcaloides fue significativamente mayor en el fruto senescente, debido a que esta muestra presenta menor cantidad de agua y todos los compuestos se pueden apreciar de manera más concentrada. Evaluar la concentración de alcaloides resulta importante debido a que son compuestos alcalinos, que contienen uno o más átomos de hidrógeno y usualmente tienen un efecto fisiológico importante sobre el organismo, como antiproliferativos, antibacteriales, antivirales y efectos antimetastásicos, hablando únicamente del cáncer (Shi y col., 2014). Park y col. (1999) demostraron un fuerte efecto citotóxico de alcaloides aislados de *Viscum album* en las líneas celulares

HCT-8 (adenoma ileocecal humano), L1210 (leucemia linfocítica de ratón), DLD-1 (adenoma de colon humano) y K562 (leucemia mieloide humana). Se han reportado varios efectos farmacológicos que permiten especular acerca de la función de los alcaloides en las plantas que los contienen. Al ser metabolitos secundarios, no se ha encontrado una función particular en los tejidos vegetales, sin embargo, juegan un papel importante en la defensa contra el oxígeno singulete, producido en los tejidos vegetales en presencia de la luz. Por esto, es importante la evaluación de la presencia y la concentración de alcaloides, tanto por su actividad antioxidante, como por el efecto biológico, que en sinergia con los demás componentes del fruto, le podrían conferir actividad biológica.

7.1.3. Taninos hidrolizables.

Se realizó la hidrólisis de extractos acuosos del fruto en sus tres estados de madurez llevando a cabo la reacción bajo tres concentraciones distintas de HCl y a diferentes temperaturas en tres tiempos de hidrólisis. De esta manera, se buscó determinar las mejores condiciones de obtención de taninos hidrolizables en cada estado de madurez del fruto.

Se obtuvo la concentración de taninos hidrolizables promedio bajo cada condición de extracción y se realizó un análisis de varianza y una comparación múltiple de medias de Tuckey con un nivel de significancia $p \leq 0.05$ con lo que se obtuvo que la mejor condición de extracción para los tres estados de madurez fue con HCl 4N, a 120°C durante 3 h. La Figura 13 muestra la concentración de taninos hidrolizables obtenidos en fruto verde, comparando temperaturas y tiempos de extracción con HCl 4N.

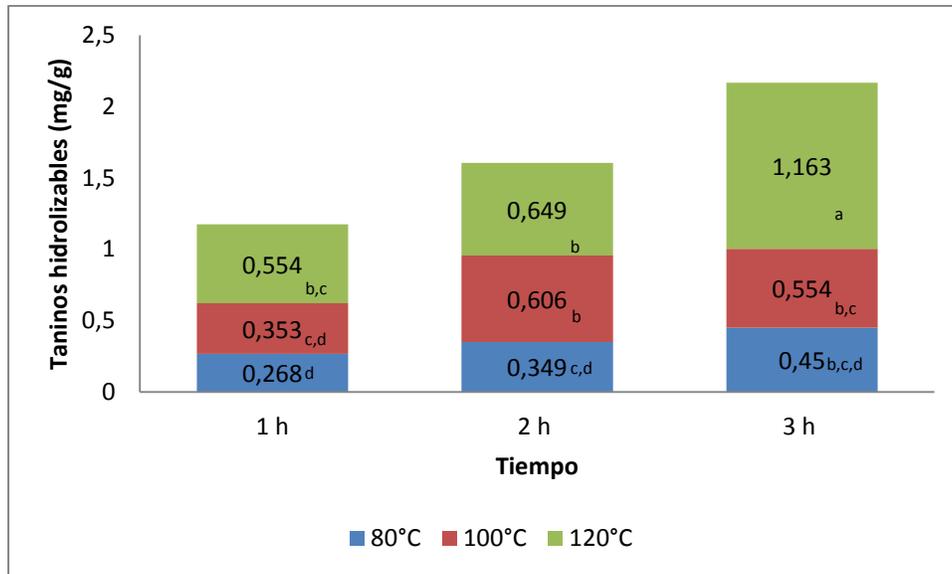


Figura 13. Concentración de taninos hidrolizables en fruto verde a 80, 100 y 120°C en tres tiempos de extracción. Las letras como subíndice indican diferencias significativas entre todos los tratamientos de extracción (Tuckey; $p \leq 0.05$).

Las mejores condiciones de extracción de taninos hidrolizables fueron 3 h de hidrólisis a 120°C, mientras que no se observaron diferencias significativas entre 1 y 2 h de hidrólisis a la misma temperatura y las 2 y 3 h a 100°C. Los tratamientos más deficientes para lograr la extracción fueron a 80°C en cualquiera de los tiempos probados.

En el caso del fruto rojo, la Figura 14 muestra el rendimiento de extracción de taninos utilizando HCl 4 N.

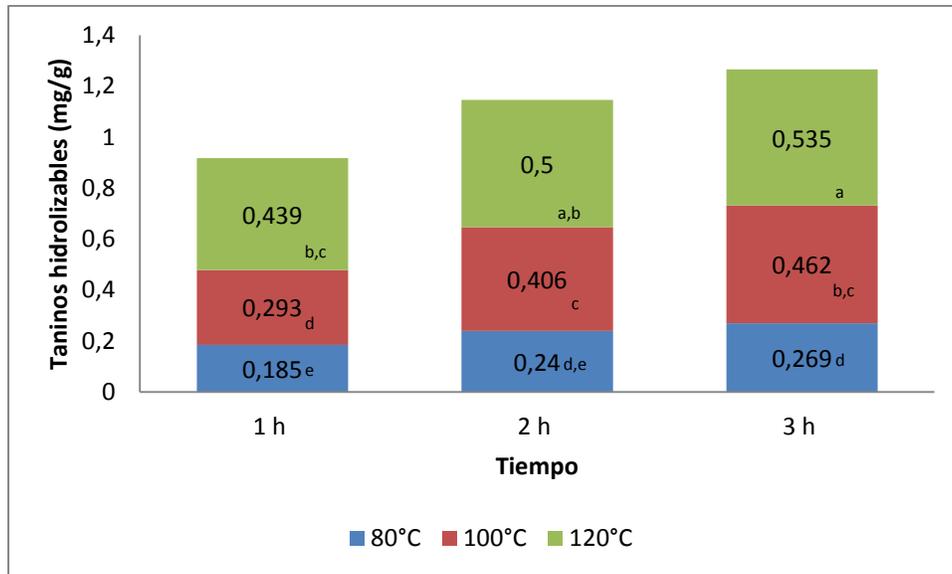


Figura 14. Concentración de taninos hidrolizables en fruto rojo a 80, 100 y 120°C en tres tiempos de extracción. Las letras como subíndice indican diferencias significativas entre todos los tratamientos de extracción (Tuckey; $p \leq 0.05$).

Se observa que la extracción a 120°C durante 3 h fueron, al igual que en el fruto verde, las mejores condiciones de extracción. No se observaron diferencias significativas entre las 2 y 3 h de extracción a dicha temperatura, mientras que las peores condiciones se obtuvieron a 80°C durante 1 y 2 h de hidrólisis.

La Figura 15 indica la concentración de taninos hidrolizables en fruto senescente bajo las distintas condiciones de hidrólisis.

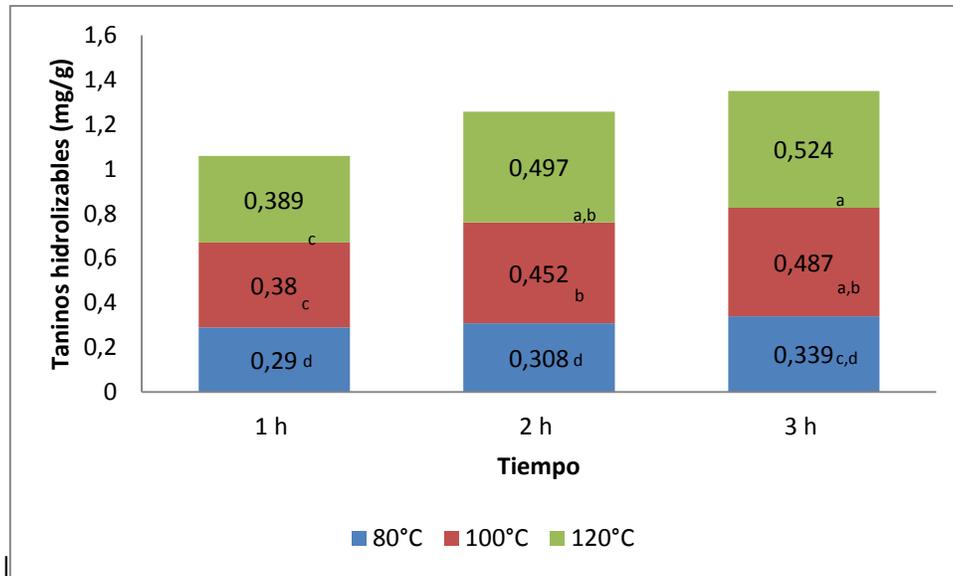


Figura 15. Concentración de taninos hidrolizables en fruto senescente a 80, 100 y 120°C en tres tiempos de extracción. Las letras como subíndice indican diferencias significativas entre todos los tratamientos de extracción (Tuckey; $p \leq 0.05$).

Se observa el comportamiento similar a los otros dos estados de madurez, siendo a mayor tiempo y mayor temperatura el rendimiento máximo en la extracción de taninos hidrolizables, medidos como equivalentes de ácido elágico, mientras que a menor temperatura y menor tiempo de hidrólisis, se obtiene una concentración significativamente menor.

Considerando los tres estados de madurez, y las condiciones óptimas a las que se extrajo una mayor concentración de taninos, el fruto verde es aquél en el que se presenta la concentración significativamente mayor, seguido de los otros dos estados. Esto sucede, ya que los frutos no maduros contienen una mayor concentración de taninos que va disminuyendo mientras madura y se liberan los compuestos fenólicos.

7.2. Composición proteínica y actividad proteolítica en diferentes estados de madurez.

7.2.1. Extracción de proteína

Las proteínas son unos de los compuestos interesantes debido a las propiedades biológicas que presentan, como tóxicas, citotóxicas, antitumorales y anticancerígenas. Por lo anterior, estudiar la presencia de proteínas y sus características en el fruto de muérdago resulta de gran importancia para lograr la caracterización y la explicación de su actividad biológica.

Se compararon tres métodos distintos de extracción de proteína. En el método de Osborne (1924) se definen cuatro grupos proteínicos obtenidos por extracción secuencial en agua (albúminas), solución salina diluida (globulinas), solución etanólica (prolaminas) y ácido diluido (glutelinas). En el método propuesto por Padhye y Salunke (1947) la separación de los grupos proteínicos también está en función de la solubilidad y se obtienen estos mismos cuatro grupos, sin embargo, el método incluye concentración de proteínas por medio de precipitación con sulfato de amonio y diálisis. El último método fue la extracción con álcali y precipitación ácida, en donde se extrajo proteína total.

En la Tabla 7 se muestra la concentración de proteína cruda evaluada por el método de Kjeldahl (AOAC, 2000) (%N x 6.25) y proteína ligada a colorante (Bradford, 1976) en los extractos proteínicos obtenidos de los tres estados de madurez del fruto por cada método

Tabla 7. Concentración de proteínas obtenidas por métodos distintos en los tres estados de madurez.

Fruto	Extracto	Proteína cruda (mg/g)	Proteína Bradford (mg/g)
Verde	Álcali-ácido	24.17 ± 1.63	0.727 ± 0.00
	Albúminas Osborne	11.97 ± 1.88	0.09 ± 0.00
	Albúminas Padhye	9.6 ± 0.99	0.336 ± 0.00
Rojo	Álcali-ácido	17.2 ± 2.10	0.41 ± 0.02
	Albúminas Osborne	5.9 ± 0.26	0.059 ± 0.01
	Albúminas Padhye	3.04 ± 0.21	0.248 ± 0.00
Senescente	Álcali-ácido	32.88 ± 0.21	0.533 ± 0.00
	Albúminas Osborne	5.9 ± 0.26	0.139 ± 0.00
	Albúminas Padhye	1.09 ± 0.00	0.355 ± 0.01

En ambos métodos de extracción por solubilidad (Osborne y Padhye y Salunke), la fracción proteínica que se aisló en mayor concentración fueron las albúminas (11.97 mg/g en el fruto verde, 5.9 mg/g en el rojo y senescente para método Osborne y 9.6 mg/g para el verde, 3.04 mg/g en el rojo y 1.09 mg/g en el senescente por el método de Padhye y

Salunke), seguida de las prolaminas que fueron cercanas a cero. En ninguno de los dos métodos se extrajeron glutelinas ni globulinas.

El fruto verde contiene la mayor concentración de albúminas, debido a que las semillas contienen muchas proteínas que metabólicamente se encuentran inactivas y que funcionan como reservas, las cuales varían según la especie (Moreno, 1996), sin embargo, es muy probable que las principales proteínas de reserva de la semilla de *C. lonicerooides* sean albúminas ya que han sido halladas en mayor concentración. En un fruto verde, al ser un fruto inmaduro, la concentración de proteína es mayor debido a que aún no ha terminado su desarrollo y el embrión requiere de enzimas que le permitan germinar en un nuevo hospedero.

El método de extracción con álcali-ácido se realizó a varios tiempos, desde 1 hasta 6 h de reacción en solución alcalina, sin embargo no se observaron diferencias significativas a lo largo del tiempo de extracción (Figura 16) por lo que se llevó a cabo la extracción a 6 h de reacción en todas las muestras. Bajo este método de extracción se obtuvo la mayor concentración de proteína debido a que se extrajo proteína total comparada con las fracciones proteínicas obtenidas en los métodos de solubilidad. En el fruto senescente se obtuvo la mayor concentración (32.88 ± 0.21 mg/g) debido a que la concentración de componentes en esta muestra se eleva por la baja humedad y debido a que las plantas activan varios mecanismos de defensa contra estrés biótico o abiótico durante la maduración, como las síntesis de proteínas relacionadas con la patogénesis, que son proteínas que funcionan como defensa, prevención o limitación de la multiplicación y dispersión de patógenos (López-Miranda y col., 2011) ya que los frutos, mientras mayor madurez alcancen, son más susceptibles de sufrir el ataque de hongos, principalmente.

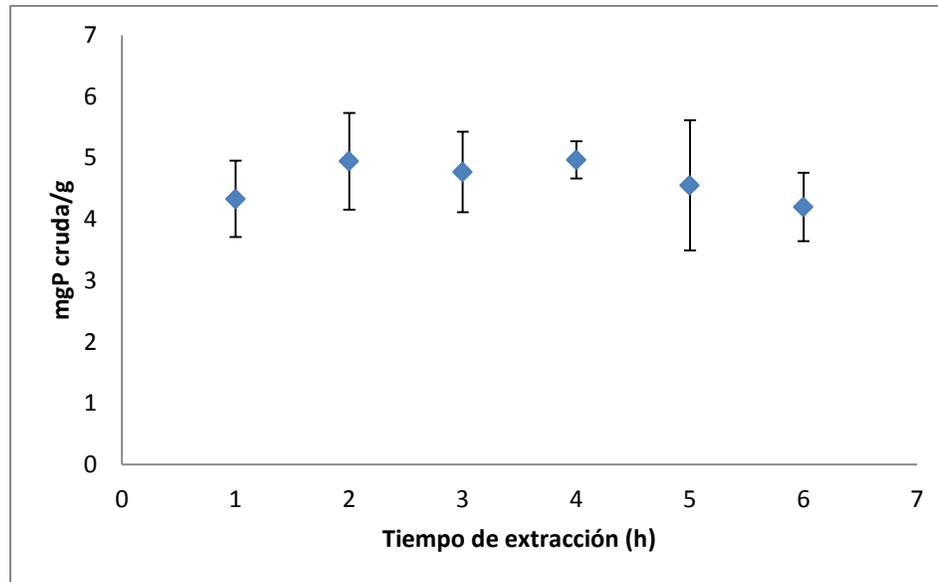


Figura 16. Extracción total de proteína de fruto rojo a diferentes tiempos de extracción.

El fruto verde es aquel que contiene la menor concentración de proteína (24.17 ± 1.63 mg/g) debido a que el fruto y el embrión necesitan proteínas de reserva para su desarrollo en caso de encontrar condiciones óptimas para su germinación.

En general, la concentración de proteína en el fruto de *C. loniceroides* fue muy baja comparándola con frutos similares, como el de *Viscum album*. Las preparaciones de muérdago que se comercializan en Europa, se estandarizan principalmente, por su concentración de lectinas, es decir, el principal componente de estas terapias alternativas son proteínas. Es por esto que se cuantificaron en el fruto y extracto de *C. loniceroides*.

En el caso de *C. loniceroides* la testa de la semilla está ausente. La testa es un tejido grueso que sirve de protección y está conformado por proteínas, sin embargo, en el embrión de *C. loniceroides* sólo se presenta el pericarpio del fruto, una capa mucilaginosa que recubre al embrión y el embrión, por lo que la concentración de proteínas podría verse disminuida por esta razón (Cid-Villamil, 2006).

De acuerdo a la información reportada por Cid-Villamil (2006), el fruto presenta cloroplastos dentro del tejido del exocarpo y en el embrión, por lo que produce clorofila. La molécula de clorofila (Figura 17) dentro de su estructura química presenta cuatro átomos

de nitrógeno unidos al centro de magnesio, por lo que la determinación de proteína cruda mediante el método de Kjeldahl, pudo verse afectada debido a la concentración de clorofila presente dentro de los tejidos del fruto. La clorofila es el pigmento principal en la cáscara o piel de frutos inmaduros o maduros verdes y tiende a disminuir su concentración durante la maduración, en general, está ausente en frutas maduras (Rodrigo y col., 2013), sin embargo *C. Ioniceroides* lo produce en todas sus etapas de desarrollo.

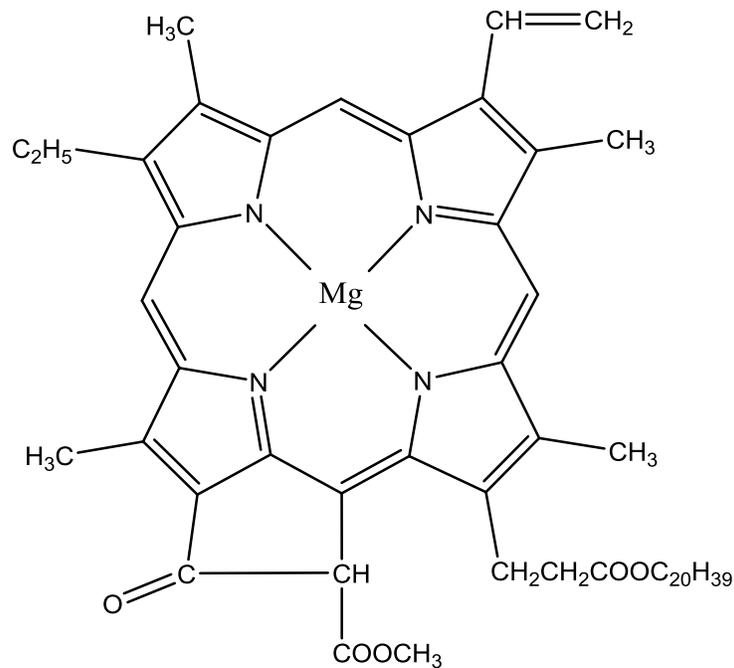


Figura 17. Estructura de la clorofila. Muestra en el centro de la molécula un átomo de Magnesio unido a 4 átomos de Nitrógeno, que posiblemente aumenten la concentración de nitrógeno cuantificada por el método de Kjeldahl.

Los frutos de *C. Ioniceroides* son bayas de forma ovoidal, que van del color verde al negro dependiendo de su estado de madurez. Comparando las bayas del muérdago con otro tipo de bayas, se encuentran las uvas. Gazzola y col. (2014) realizaron el fraccionamiento e identificación de proteínas de uva (*Vitis vinífera* L.), obteniendo en mayor concentración una combinación de albúminas y globulinas (202.11 mg/g), la concentración de prolaminas y glutelinas fue significativamente menor con respecto a la fracción soluble en solución salina. En general, las semillas de plantas contienen diferentes tipos de proteínas, la mayoría corresponden a proteínas de almacenamiento, una reserva de

nitrógeno que permite que la semilla se desarrolle (Gazzola y col., 2014). A pesar de la falta de testa, las proteínas de la semilla de muérdago contienen igualmente, la mayor concentración de proteínas totales como hidrosolubles.

En plantas, las proteínas se encuentran distribuidas en raíz, tallo, hojas y semillas. La raíz y el tallo presentan el contenido menor (1-1.5%) en peso fresco, mientras que en las hojas, la mayor concentración de proteína se encuentra en los cloroplastos (Sinha, 2004). En el fruto de *C. loniceroides* se encuentran cloroplastos, por lo que la proteína que se encontró en los frutos puede ser también la proteína RuBisCO de los cloroplastos. Por lo tanto en la cuantificación de nitrógeno total o proteína cruda cuantificada por el método de Kjeldahl, lo que se pudo haber detectado fue RuBisCO y el nitrógeno de la clorofila, que aunque no es proteína, su nitrógeno puede cuantificarse por la digestión y posterior destilación a amoníaco que es el fundamento del método de Kjeldahl.

De las preparaciones de muérdago utilizadas como terapia complementaria, se adquirió Iscador M (Weleda Lab), extracto obtenido del muérdago *Viscum album*, utilizado como coadyuvante en el tratamiento de enfermedades neoplásicas, y se evaluó el contenido de proteína cruda y Bradford, sin embargo, no se detectaron proteínas por ninguno de estos métodos.

En la Figura 18 se muestra el perfil de absorbancias de Iscador en el espectro UV (190 a 420 nm), en donde se puede apreciar que este medicamento tiene una absorbancia máxima a 218 nm, que no corresponde al máximo característico que presentan las proteínas a 280 nm debido a aminoácidos aromáticos.

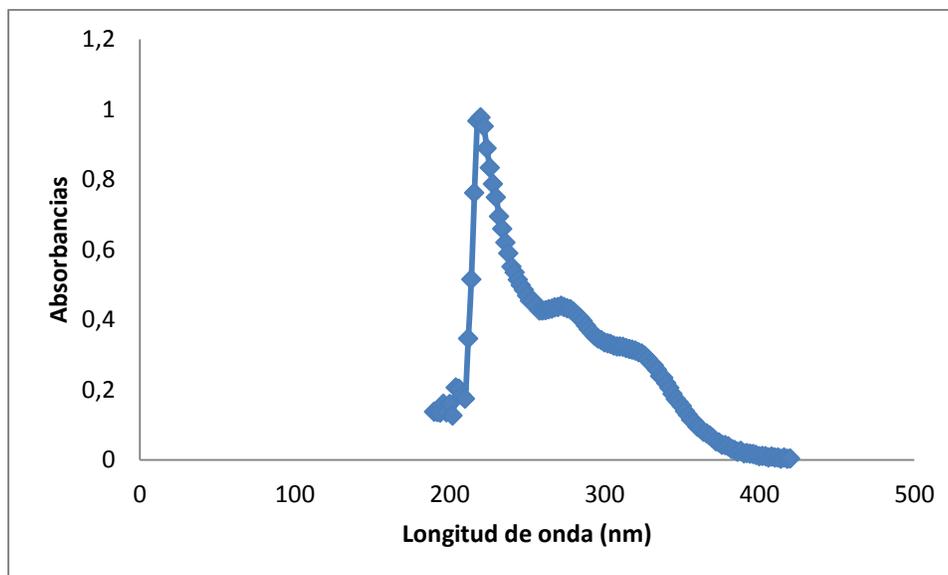


Figura 18. Perfil de absorbancias de Iscador M en el espectro UV (190 a 420 nm). Máximo de absorción a 218 nm.

7.2.3. Electroforesis.

Se realizaron geles de electroforesis SDS-PAGE para determinar la presencia de proteínas en los extractos obtenidos de la extracción total con álcali y de las albúminas obtenidas por el método de Padhye y Salunke y de Osborne, con la finalidad de encontrar proteínas y para comprobar que los resultados obtenidos de la cuantificación por el método de Kjeldahl no fueran falso negativo, ya que el colorante de Bradford también puede adherirse a compuestos fenólicos (Kilkowski y Gross, 1998) con lo que puede generarse también la lectura de falsos positivos. Por esto, la electroforesis es el mejor método de identificación de proteínas en los extractos.

Se realizó electroforesis de la extracción de proteína total con álcali y de las albúminas obtenidas por ambos métodos. En la Figura 19 se muestra el gel de electroforesis de la extracción con álcali teñido con azul de Coomassie. Las bandas que se identificaron en los tres carriles fueron de pesos aproximados de 59, 48 y 36 KDa.

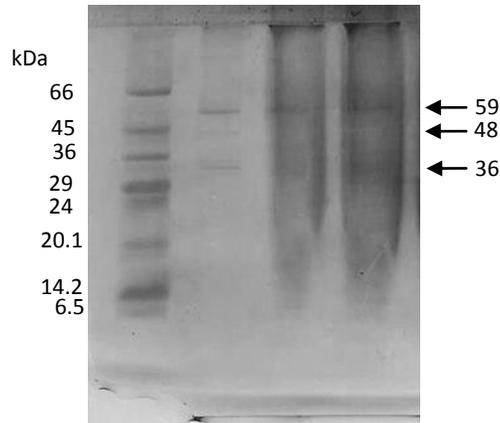


Figura 19. Gel de electroforesis de la extracción de proteína con álcali teñido con azul de Coomassie. Carril 1: marcador, 2: fruto verde, 3: fruto rojo, 4: fruto senescente.

En la Figura 20 se muestra el gel de electroforesis para las albúminas extraídas por el método de Padhye y Salunke, donde los pesos de las bandas son 55, 48 y 35 KDa.

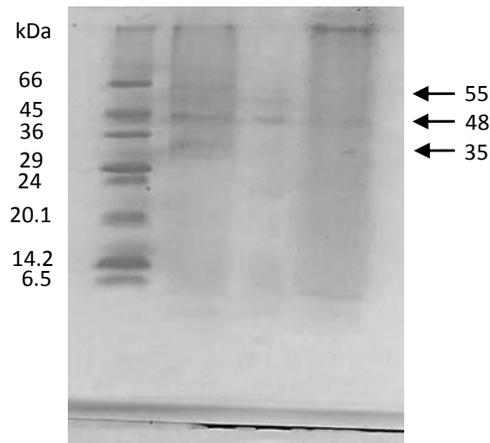


Figura 20. Gel de electroforesis de albúminas obtenidas por el método de Padhye y Salunke, las bandas fueron detectadas con azul de Coomassie. Carril 1: marcador, 2: fruto verde, 3: fruto rojo, 4: fruto senescente.

La Figura 21 es el gel de electroforesis de albúminas obtenidas por el método de Osborne, donde los pesos de cada banda son 62, 55 y 35 KDa.

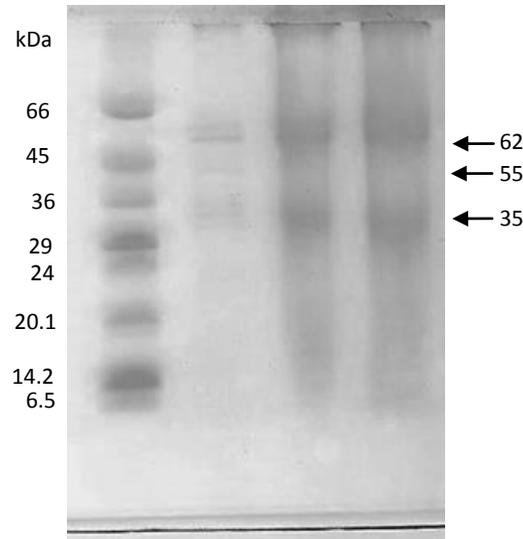


Figura 21. Gel de electroforesis de albúminas obtenidas por el método de Osborne, las bandas fueron detectadas por azul de Coomassie. Carril 1: marcador, 2: fruto verde, 3: fruto rojo, 4: fruto senescente.

En los tres geles se presentan grupos de proteínas con pesos moleculares muy parecidos, por lo que es probable que por cualquier método de extracción se estén obteniendo las mismas proteínas, lo que comprueba que la mayor parte de las proteínas del fruto sean albúminas.

7.2.4. Actividad proteolítica.

Por el proceso de maduración, ocurre una reacción de hidrólisis de las proteínas de conformación del fruto, con lo que es posible explicar por qué la concentración de proteínas en el fruto rojo es menor que en estado de madurez verde. Por esta razón se evaluó la actividad proteolítica de los extractos acuosos del fruto en los diferentes estados de madurez para determinar si la baja concentración de proteína es debida a la hidrólisis, o bien, a que el fruto contiene en su composición, una baja concentración, de acuerdo a los métodos utilizados para la extracción.

Las Figura 22, Figura 23 y Figura 24 muestran las cinéticas de actividad proteolítica del extracto de fruto verde, rojo y senescente a diferentes temperaturas y pH, para detectar las condiciones óptimas en las que podrían estar actuando las enzimas del fruto.

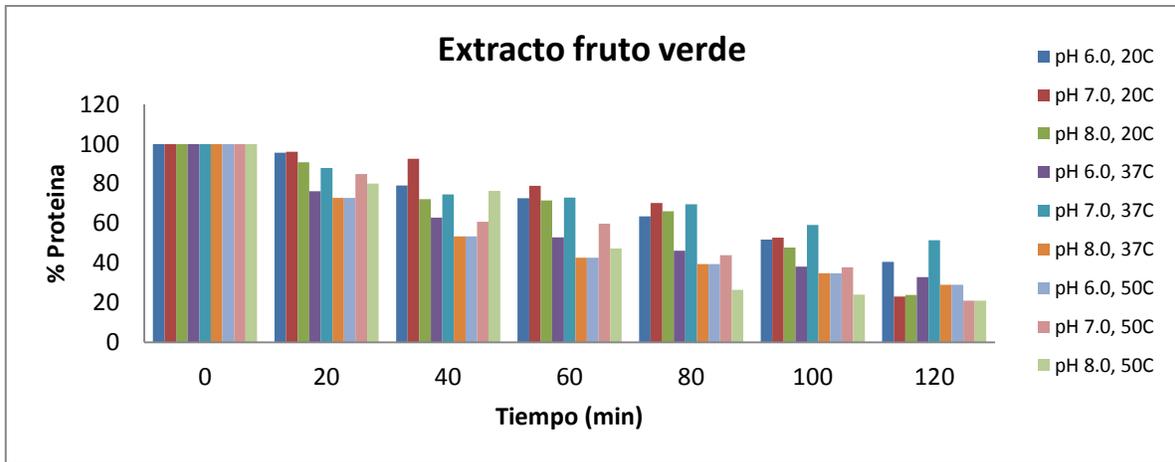


Figura 22. Cinética de actividad proteolítica de extracto de fruto verde a diferentes pH y temperaturas.

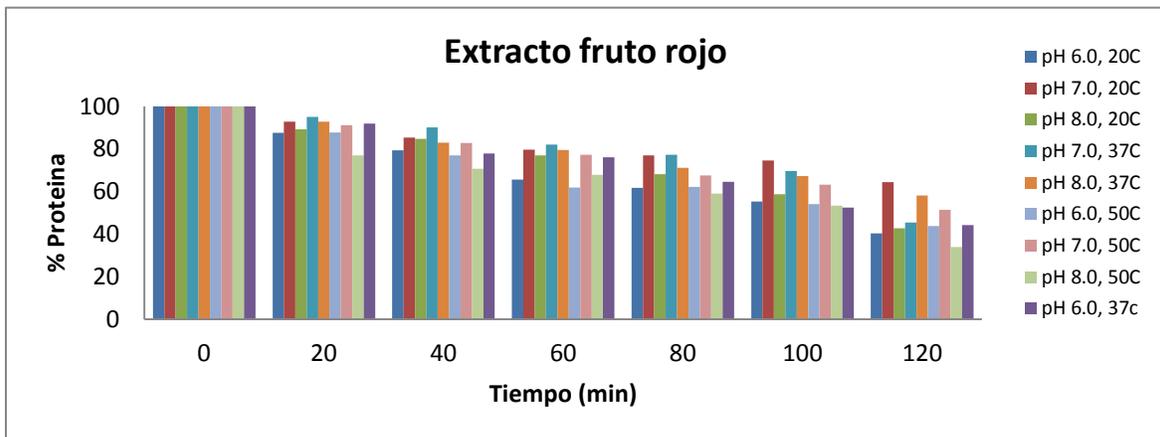


Figura 23. Cinética de actividad proteolítica de extracto de fruto rojo a diferentes pH y temperaturas.

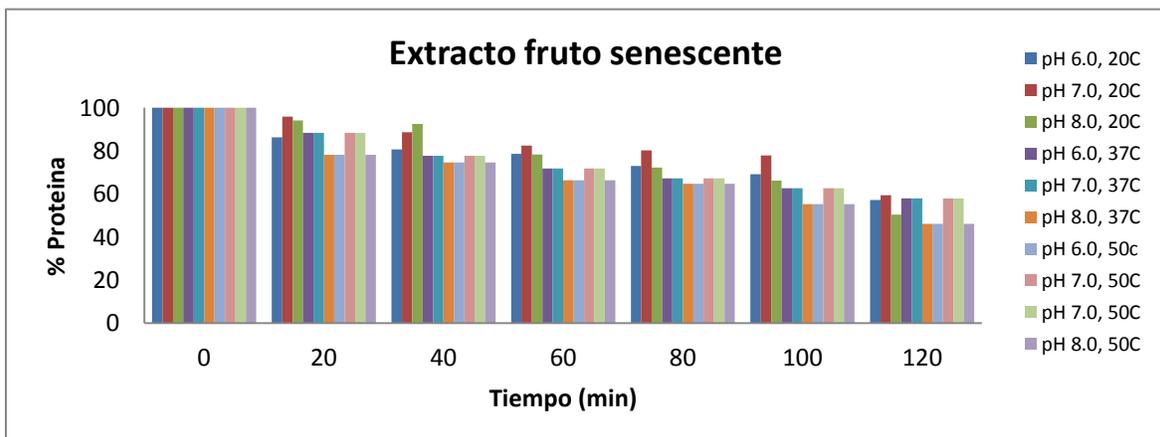


Figura 24. Cinética de actividad proteolítica de extracto de fruto senescente a diferentes pH y temperaturas.

Se realizó un análisis de comparación múltiple de medias de Tuckey ($p \leq 0.05$) en el que se mostró que entre los tiempos de reacción de 0 y 20 min no hay diferencias significativas en ninguno de los estados de madurez, sin embargo, sí hay diferencias entre los primeros tiempos de la cinética de reacción y los minutos 100 y 120, por lo tanto, después de 2 h de reacción, se aprecia una considerable baja en la concentración de proteína en el medio de reacción. La temperatura a la que se encontró una mayor actividad proteolítica fue a 50°C, en los 3 pH evaluados y en cualquier estado de madurez. Sin embargo las condiciones de almacenamiento del fruto fueron en refrigeración y el pH del fruto va de 4.9 a 5.3, por lo que es poco probable que la proteólisis haya ocurrido durante el tiempo que transcurrió desde la recolección hasta su estudio.

Después de los tiempos de reacción indicados previamente para llevar a cabo la cinética se midió la absorbencia a 214 nm, para detectar los enlaces peptídicos que continuaban presentes después de la reacción de hidrólisis, por lo que se cuantificó proteína remanente después de las condiciones bajo las que se realizó la hidrólisis. De esta manera, los extractos del fruto verde presentan una actividad hidrolítica significativamente mayor que los frutos rojo y senescente, alcanzando después de 2 h de reacción hasta cerca de 20% de proteína remanente.

El proceso de maduración de frutos incluye dos fenómenos importantes que son la pérdida de firmeza y desarrollo del color. Para que estos cambios positivos ocurran, es necesaria la participación de varias enzimas durante este proceso, como son pectinasas, poligalacturonasas, celulasas, amilasas, entre otras, que en general son enzimas que rompen carbohidratos, sin embargo, durante el proceso actúan también proteasas que son las responsables del incremento de aminoácidos libres y amidas en el fruto. Debido a esto, la actividad proteolítica del fruto se ve reflejada en mayor medida en el fruto verde, ya que los cambios bioquímicos aunque se están llevando a cabo a lo largo de todo el proceso de maduración, es probable que durante las primeras etapas se estén sufriendo mayores cambios de síntesis y degradación.

7.3. Efecto sobre la muerte celular de un extracto acuoso de *C. Ioniceroides*.

7.3.1. Elección del extracto.

Para evaluar el efecto citotóxico se utilizó el extracto de fruto rojo debido a que este extracto presentó la mayor concentración de compuestos polifenólicos, flavonoides y taninos condensados. Además presentó la menor concentración de alcaloides que podrían resultar tóxicos aún a bajas concentraciones. En el caso de los taninos hidrolizables, son significativamente menores con respecto al fruto verde, lo que resulta útil porque podría presentar una baja precipitación de las proteínas del medio de cultivo.

Se realizó una infusión de fruto rojo, con 5 mL de agua a ebullición por gramo de fruto. Se mantuvo en oscuridad hasta que se enfrió hasta temperatura ambiente y se filtraron los sólidos. Para eliminar el resto de sólidos se centrifugó a 10,000 rpm por 20 min a 4°C. El extracto se congeló y liofilizó. Una vez obtenido el polvo, la muestra se almacenó en refrigeración en frasco ámbar protegido de la luz, hasta su uso.

7.3.2. Concentración letal media

Se evaluó la concentración letal media (CL₅₀) para la línea celular MCF7 (adenocarcinoma glandular) a diferentes tiempos de tratamiento. La Figura 25, Figura 26 y Figura 27 indican las curvas de porcentaje de muerte celular a 24, 48 y 72 horas de tratamiento.

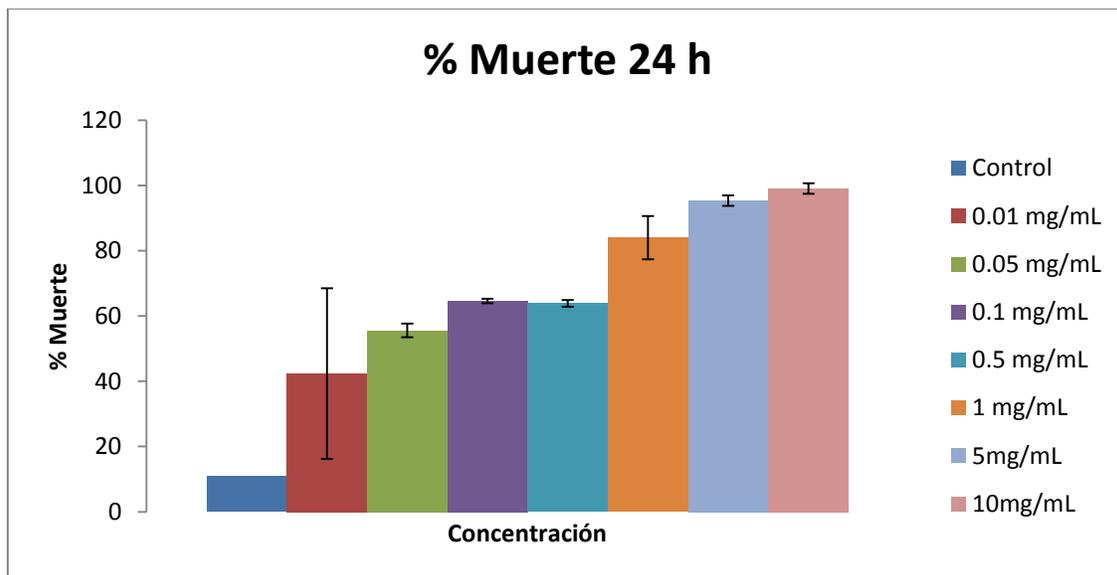


Figura 25. Perfil de muerte celular de la línea MCF7 después de 24 h de tratamiento con diferentes concentraciones de extracto liofilizado de fruto rojo de *C. loniceroides*, a partir del cual se obtuvo una concentración letal media (CL₅₀) de 0.0264 mg EAG/mL de medio de cultivo.

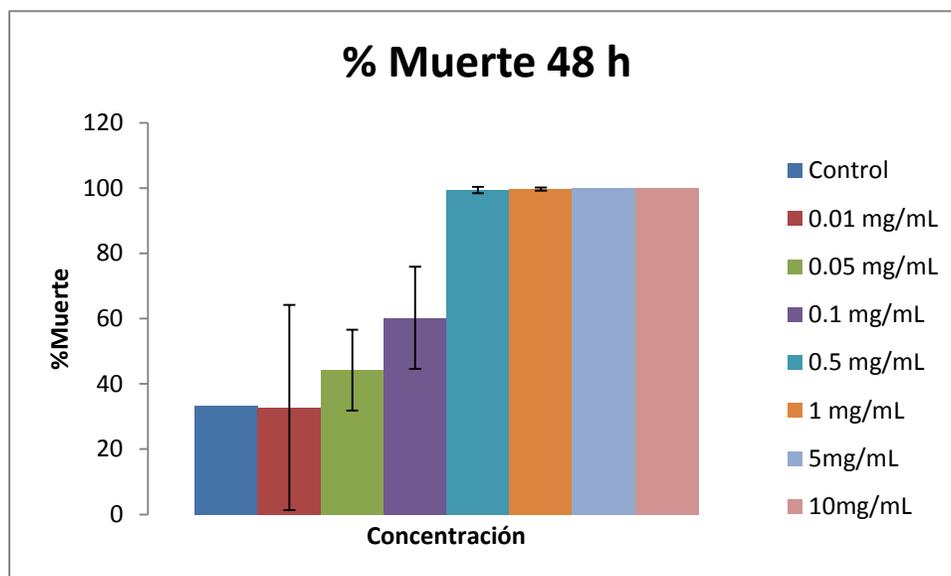


Figura 26. Perfil de muerte celular de la línea MCF7 después de 48 h de tratamiento con diferentes concentraciones de extracto liofilizado de fruto rojo de *C. loniceroides*.

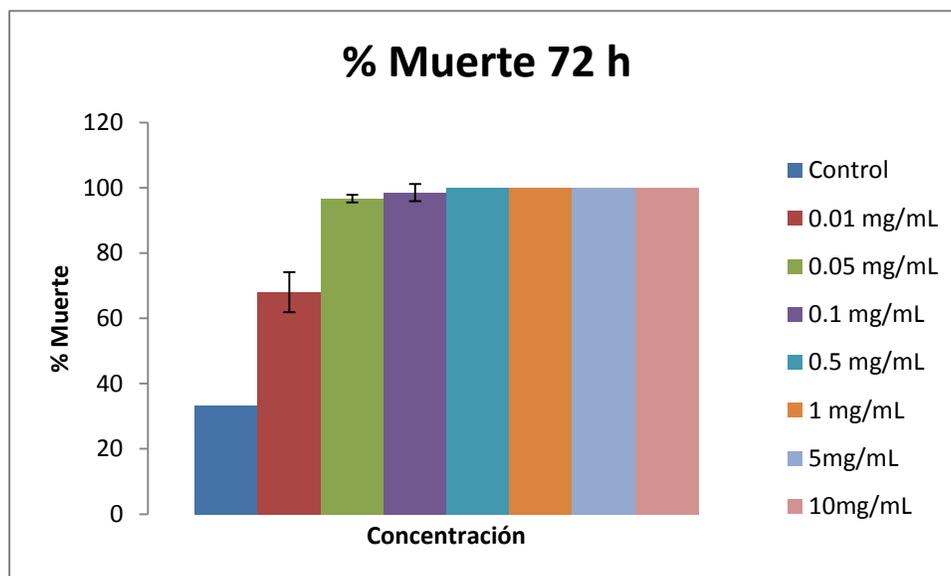


Figura 27. Perfil de muerte celular de la línea MCF7 después de 72 h de tratamiento con diferentes concentraciones de extracto liofilizado de fruto rojo de *C. loniceroides*.

En la Figura 28 se muestra la comparación del comportamiento de los tres tiempos de tratamiento en la línea celular MCF7, donde no se observan diferencias significativas entre 24 y 48 h de tratamiento sino hasta la concentración de 0.5 mg/mL que sufre un incremento significativo en 48 h de tratamiento. Después de 72 h de tratamiento, ya no se observó el comportamiento sigmoide de incremento del porcentaje de muerte celular, por lo que para las siguientes líneas celulares únicamente se realizó la evaluación a 24 y 48 h de tratamiento.

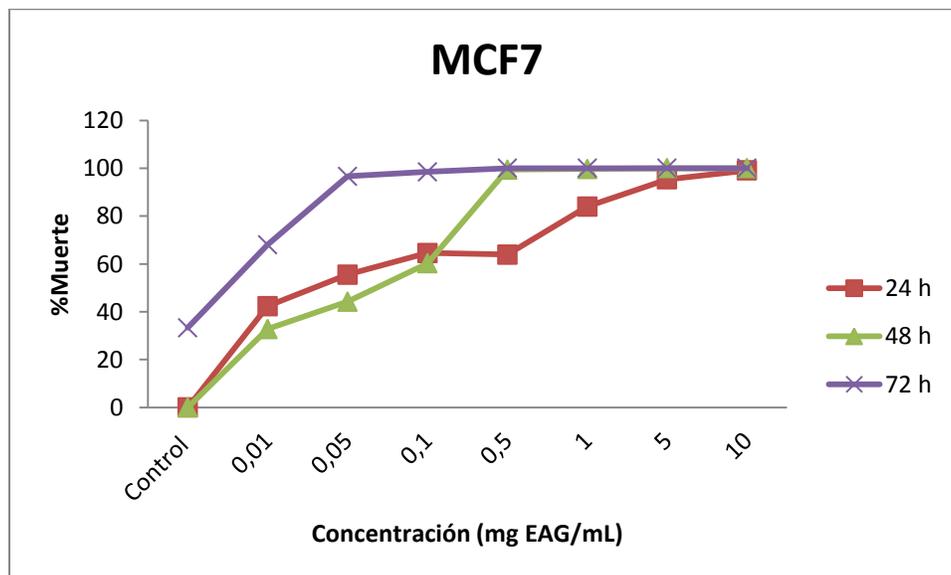


Figura 28. Comparación de la curva de porcentaje de muerte de la línea celular MCF7 con tratamiento de 24, 48 y 72 h con concentraciones de 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5 y 10 mg EAG/mL de extracto acuoso de fruto de C. loniceroides en el medio de cultivo.

Se construyó la curva dosis-respuesta para la línea celular MDA-MB-231, con 24 y 48 h de tratamiento con el extracto acuoso de fruto de muérdago, como se muestra en las Figura 29 y Figura 30.

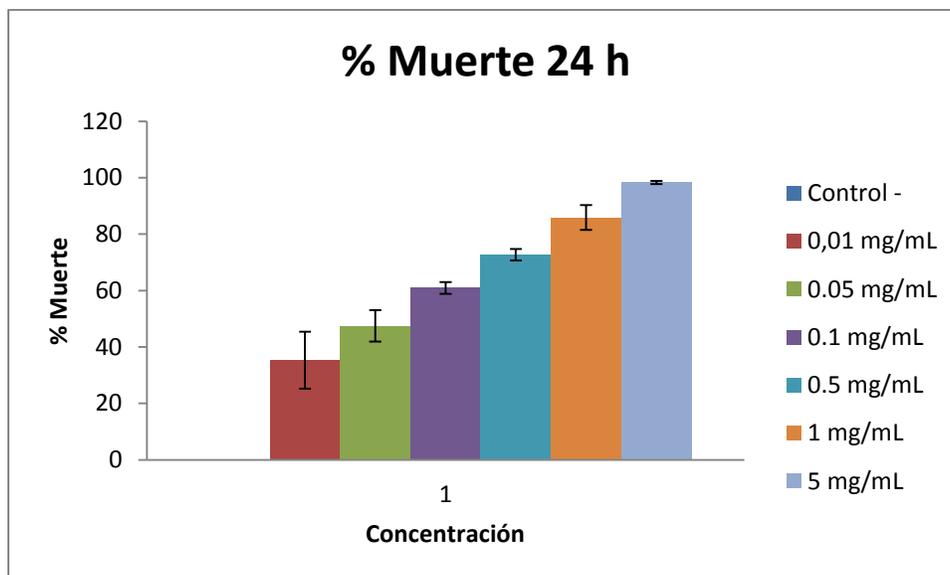


Figura 29. Perfil de muerte celular de la línea MDA-MB-231 después de 24 h de tratamiento con diferentes concentraciones de extracto liofilizado de fruto rojo de *C. loniceroides*, a partir del cual se obtuvo una concentración letal media (CL_{50}) de 0.045 mg EAG/mL de medio de cultivo.

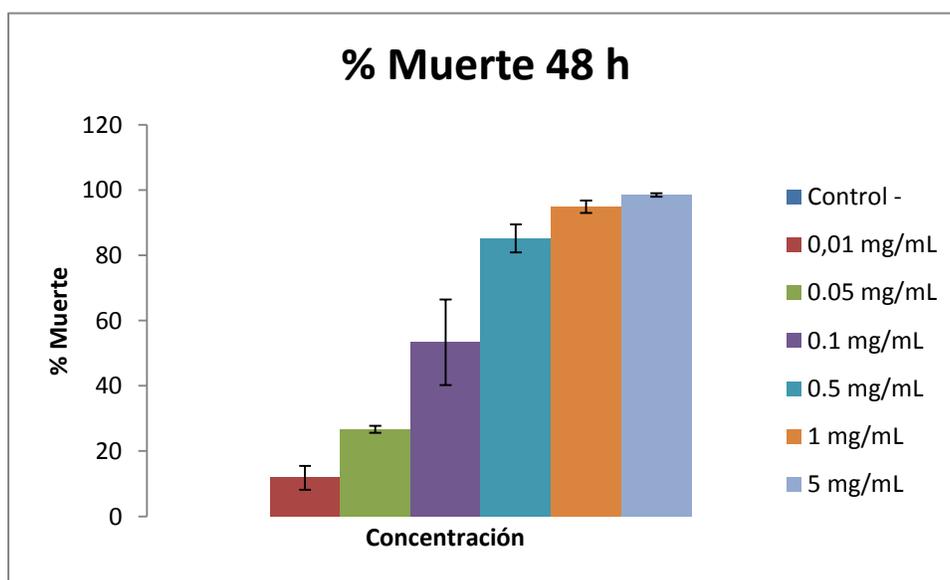


Figura 30. Perfil de muerte celular de la línea MDA-MB-231 después de 48 h de tratamiento con diferentes concentraciones de extracto liofilizado de fruto rojo de *C. loniceroides*.

En la Figura 31 se muestra la comparación del comportamiento de los dos tiempos de tratamiento en la línea celular MDA-MB-231, donde no se observan diferencias significativas entre los tiempos de tratamiento, es decir, la muerte celular es independiente del tiempo de aplicación del tratamiento.

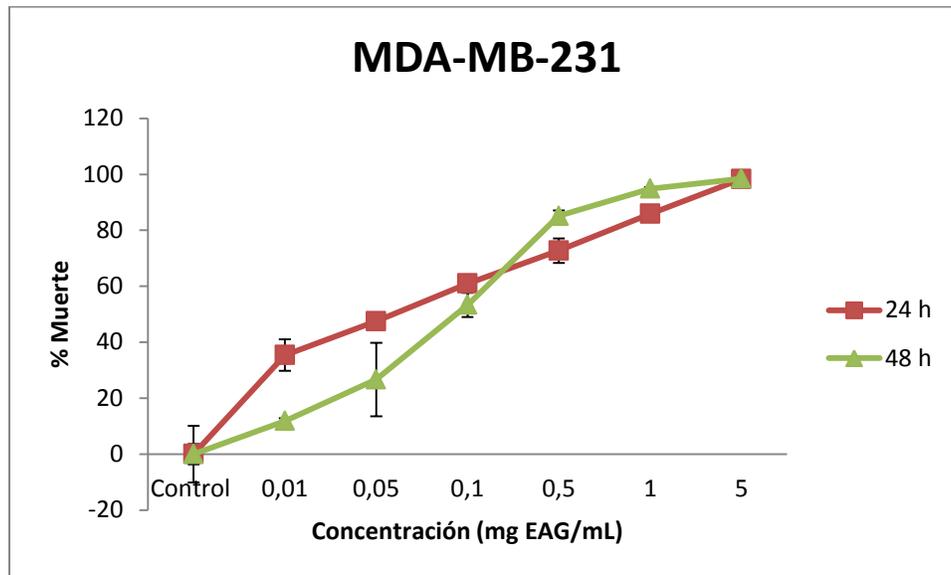


Figura 31. Comparación de la curva dosis-respuesta de la línea celular MDA-MB-231 con tratamiento de 24 y 48 h con concentraciones de 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 y 5 mg EAG/mL de extracto acuoso de fruto de *C. loniceroides*.

Igualmente, se construyó la curva de dosis respuesta para la línea celular MCF10A, línea utilizada como control negativo (no cancerosa), a 24 y 48 h de tratamiento, como se muestra en las Figura 32 y Figura 33.

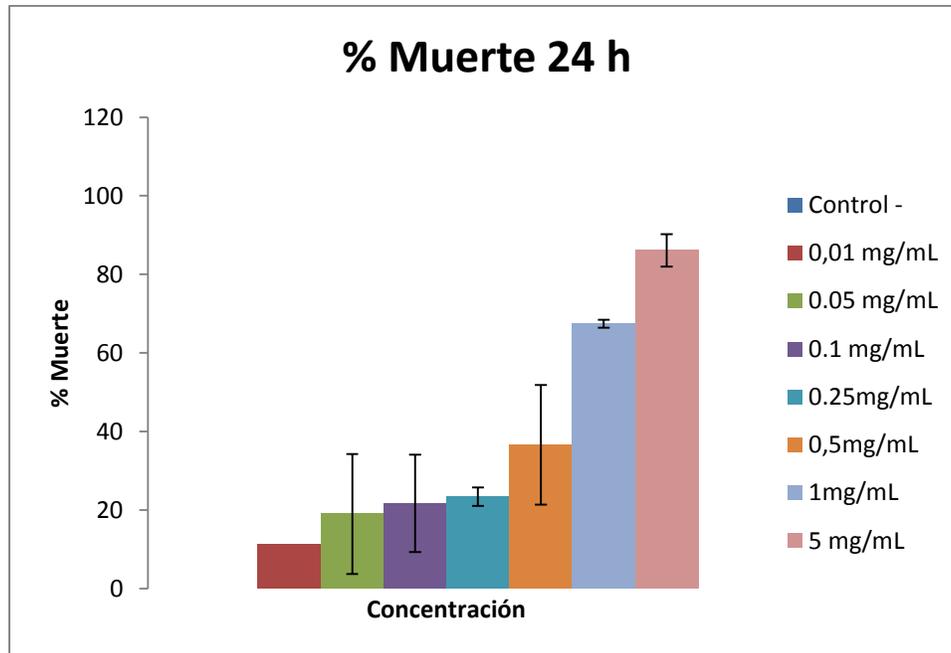


Figura 32. Perfil de muerte celular de la línea MCF10A después de 24 h de tratamiento con diferentes concentraciones de extracto liofilizado de fruto rojo de *C. Ioniceroides* ($CL_{50} = 0.5964$ mg EAG/mL).

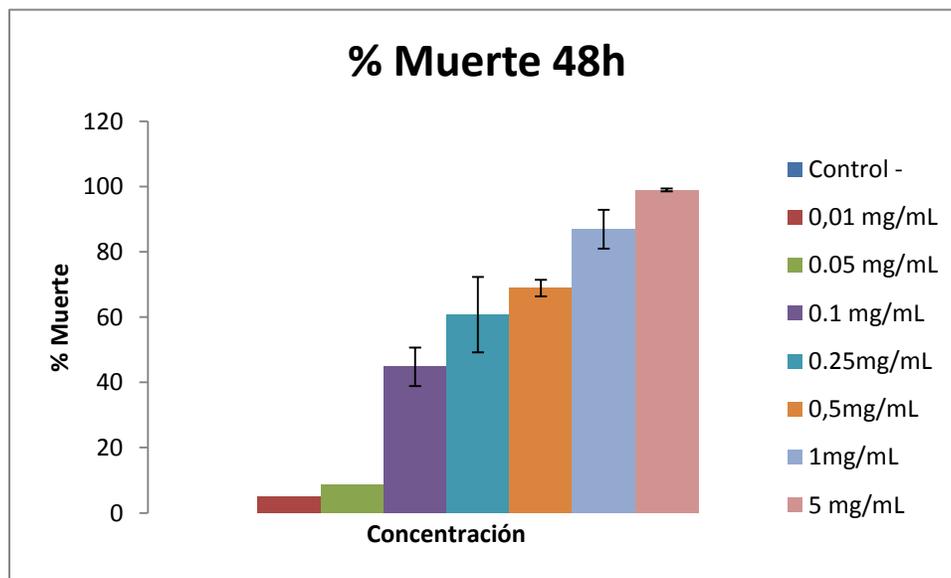


Figura 33. Perfil de muerte celular de la línea MCF10A después de 48 h de tratamiento con diferentes concentraciones de extracto liofilizado de fruto rojo de *C. Ioniceroides*.

Por último, en la Figura 34, se muestra la gráfica comparativa de los dos tiempos de tratamiento aplicados a MCF10A, en donde se puede apreciar que a 24 h de tratamiento,

la sobrevivencia celular se mantiene constante en 20% de muerte celular hasta 0.5 mg EAG/mL.

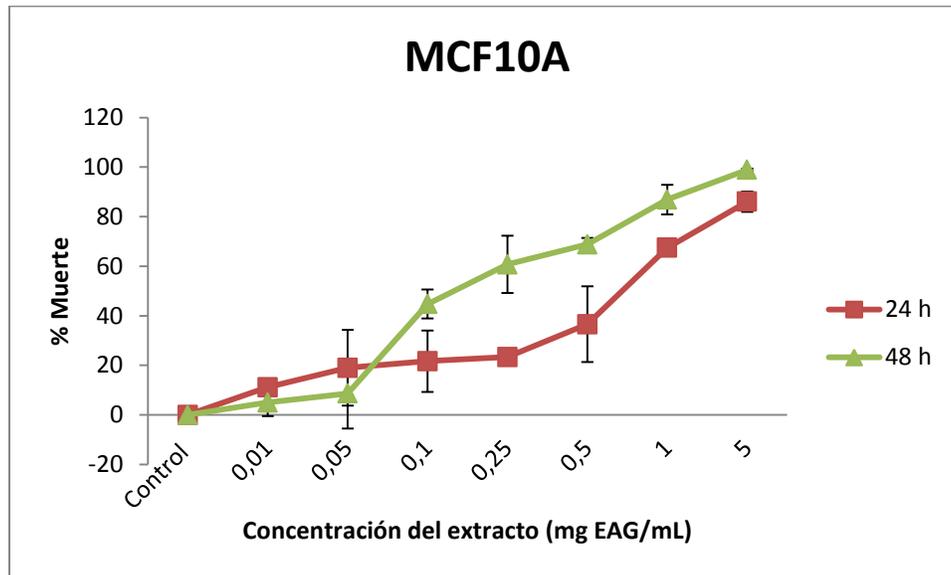


Figura 34. Comparación de la muerte celular ocurrida en la línea celular MCF10A después de 24 y 48 h de tratamiento con concentraciones de 0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1 y 5 mg EAG/mL de extracto acuoso de fruto de *C. loniceroides*.

A continuación, la figura 35 muestra el comportamiento de muerte de las líneas celulares después de 24 h de tratamiento, donde se puede apreciar que las líneas cancerosas son más sensibles al tratamiento con el extracto, ya que necesitan menores concentraciones de extracto para obtener mayor muerte celular.

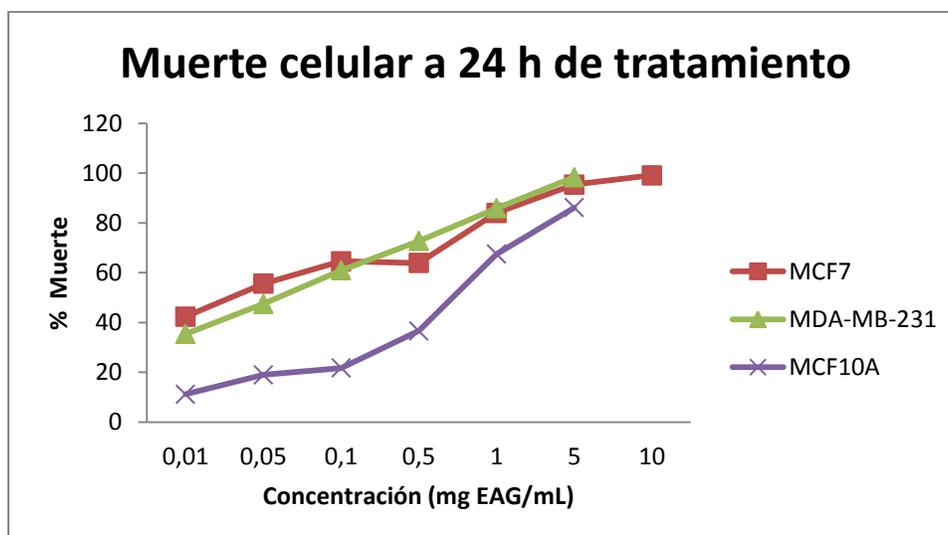


Figura 35. Muerte de las líneas celulares estudiadas después de 24 h de tratamiento a diferentes concentraciones de extracto de fruto de *C. Ioniceroides*.

A manera de resumen, la Tabla 8 muestra la concentración letal media (CL_{50}) de las líneas celulares después de 24 h de tratamiento.

Tabla 8. Concentración letal media de las líneas celulares estudiadas.

Línea celular	Concentración letal media (CL_{50}) ($\mu\text{g EAG/mL}$)
MCF 7	26.4
MDA-MB-231	45
MCF10A	59.6

El extracto ocasionó muerte celular sobre las dos líneas de cáncer de mama, de las cuales, la línea MCF7 es más sensible, es decir, reacciona ante una menor concentración, con una CL_{50} de 26.4 $\mu\text{g EAG/mL}$, mientras que la línea MDA-MB-231 es más resistente con una CL_{50} de 45 $\mu\text{g EAG/mL}$, ya que la línea MDA-MB-231 es fisiológicamente más resistente.

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea donde su clasificación se basa en el tipo histológico, el grado del tumor, el estado del nodo linfático y la presencia de marcadores como receptor de estrógenos (ER), el receptor del factor de crecimiento

epidermal humano 2 (HER2), receptor de progesterona, de manera que se pueden clasificar en luminal A, luminal B, basal, baja claudina y HER2. De acuerdo a sus características, cada subtipo tiene distinta prognosis y respuesta al tratamiento. En el caso de las luminal A y B son tratables con terapia hormonal, como en el caso de MCF7, que pertenece al grupo luminal A, que generalmente responde a la quimioterapia. De manera similar el grupo de líneas celulares perteneciente a HER2 son candidatos potenciales a la terapia con trastuzumab (Holliday y Speirs, 2011).

En ausencia de blancos terapéuticos reconocidos, los tumores basales son difíciles de tratar, son más agresivos y generalmente hay una pobre prognosis. Cuando se presenta la falta de expresión de ER α , receptor de progesterona y HER2 se conoce como triple negativo (Holliday y Speirs, 2011), tal es el caso de la línea celular MDA-MB-231, que al ser triple negativo quiere decir que es más resistente a los tratamientos y fácilmente invade otros tejidos (metástasis), por lo que resulta alentador que en el presente estudio ocurra la muerte de ésta línea celular con menor concentración de extracto en el medio de cultivo de lo requerido para ocasionar la muerte de la línea MCF10A no cancerosa.

De acuerdo a la figura 35, si se aplica un tratamiento con extracto a 0.1 mg EAG/mL, se tendrá más de un 60% de muerte celular en las líneas cancerosas MCF7 y MDA-MB-231, mientras que en el caso de MCF10A se provoca el daño de sólo el 20% del cultivo.

Tomando como referencia los trabajos de otros autores con el uso y aplicación de extractos naturales para estudiar la muerte de cultivos celulares de cáncer, se encontró que Barraón y col. (2010) investigaron la actividad antioxidante y efecto citotóxico del extracto acuoso de *Cistaceae* spp en las líneas celulares de cáncer de mama SKBr3, MCF-7 y JIMT-1 y encontraron que la concentración letal media (CL₅₀) se encontró entre 0.53 y 16 mg/mL, concentración mayor comparada con la que se requiere del extracto acuoso de *C. loniceroides* para lograr el mismo porcentaje de muerte celular (Barraón-Catalán, 2010).

Nisa y col. (2013), mencionan que el carácter anfífilico de los compuestos fenólicos permite su interacción con las membranas celulares, lo que podría provocar el efecto inhibitorio en su crecimiento, ya que es posible que los componentes del extracto crudo crucen la membrana, interaccionen con enzimas y proteínas de la misma y produzcan un flujo de protones hacia el exterior de las células lo que provoca cambios en las células y

su posterior muerte (Nisa, 2013; Moghadam, 2010). Por otro lado, otros compuestos antioxidantes, los taninos, tienen la habilidad de unirse, formar complejos y precipitar proteínas lo que puede modificar las características del medio de cultivo y el metabolismo celular (Sergent, 2012).

7.3.3 Evaluación de actividad mitocondrial.

Se evaluó, como indicativo de citotoxicidad, la actividad mitocondrial de las líneas MCF7, MDA-MB-231 y MCF10A por medio de la medición de la reducción de sales de tetrazolio por medio del CellCounting Kit-8. Este experimento permitió determinar la actividad mitocondrial y la viabilidad celular de los cultivos por medio de la reducción de la sal de tetrazolio, de acuerdo al principio que se ilustra en la Figura 35.

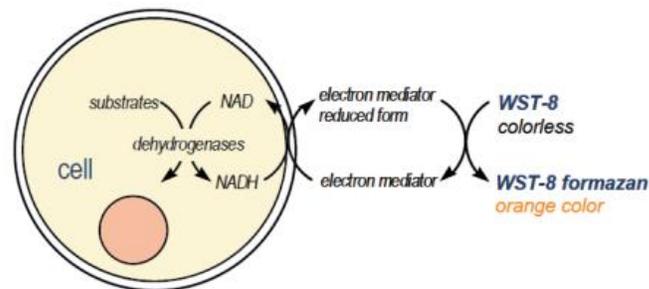


Figura 35. Principio de detección de viabilidad celular por medio de la reducción de sal de tetrazolio a sal de formazan (color anaranjado), detectable a 450 nm.

En la Figura 36 se muestra la actividad mitocondrial de las líneas celulares MCF7, MDA-MB-231 y MCF10A.

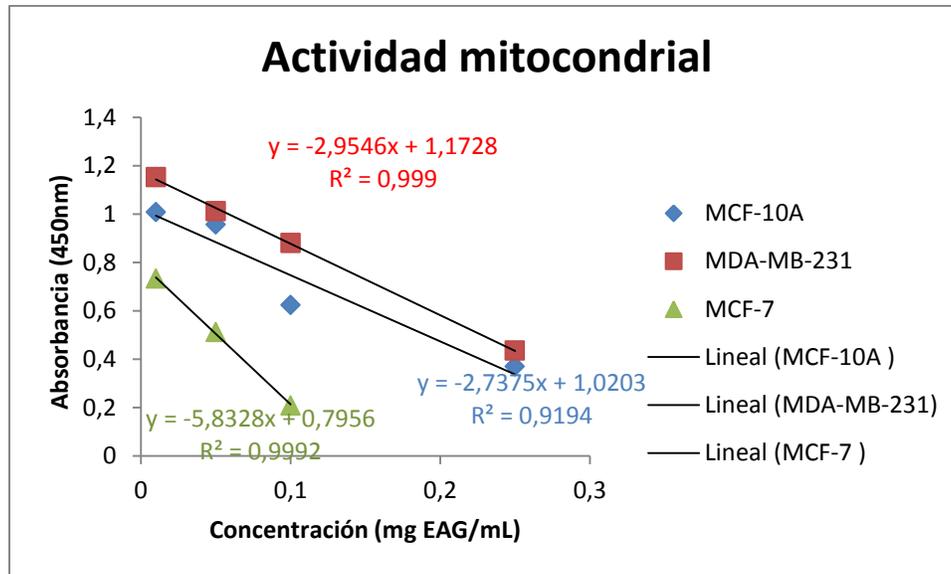


Figura 36. Curvas comparativas de actividad mitocondrial en las tres líneas celulares estudiadas a diferentes concentraciones de extracto de fruto de *C. Ioniceroides*.

La pendiente de la curva de viabilidad indica la sensibilidad de cada línea celular al tratamiento recibido. Se observa que la línea celular MCF7 es significativamente más sensible que MDA-MB-231, lo cual concuerda con la CL_{50} calculada previamente. La línea MCF10A mostró la menor pendiente, con lo que se corrobora la mayor resistencia de esta línea celular al tratamiento con extracto de muérdago.

Este estudio fue el primer reporte acerca de los fitoquímicos y la actividad biológica de los extractos de fruto de *C. Ioniceroides*. Son necesarias futuras investigaciones para determinar mecanismos de acción y bioactividad *in vivo* del extracto para sugerir el uso de esta planta como coadyuvante en terapias contra el cáncer.

8. Conclusión.

- El fruto de *C. Ioniceroides* presenta flavonoides, taninos, alcaloides, leucoantocinidinas, hidroxilos fenólicos y aminoácidos libres en sus tres estados de madurez. Sin embargo, el fruto rojo contiene la mayor concentración de polifenoles totales y flavonoides (52.6 ± 1.47 mg eq. AG/g y $230 \mu\text{g}$ eqrut/g, respectivamente). El fruto verde contiene la mayor concentración de taninos condensados (33.1 mg eq. Cat/g), hidrolizables (1.163 mg eq AE/g) y alcaloides ($893 \pm 7 \mu\text{g/g}$).
- El fruto contiene una baja concentración de **proteínas**: el fruto senescente presentó 32.88 ± 0.21 mg/g, seguido del verde (24.17 ± 1.63 mg/g) y del rojo (17.2 ± 2.10 mg/g). La fracción proteínica que se aisló en mayor concentración fueron albúminas (11.97 mg/g en el fruto verde, 5.9 mg/g en el rojo y senescente), estas muestras revelaron en el gel de electroforesis SDS-PAGE bandas con pesos aproximados de 60, 50 y 35 kDa en todas las extracciones de los tres estados de madurez. Además el extracto acuoso del fruto verde presentó actividad proteolítica a pH 8 y 50°C , por lo que no se llevó a cabo hidrólisis de las proteínas durante el almacenamiento del fruto.
- El extracto acuoso de fruto rojo provocó la muerte celular de las líneas MCF7 con una CL_{50} de $26.4 \mu\text{g/mL}$, MDA-MB-231 ($45 \mu\text{g/mL}$) y MCF10A ($59.64 \mu\text{g/mL}$) utilizada como control negativo, siendo ésta última la más resistente al tratamiento después de 24 h de incubación con el extracto de fruto de muérdago, demostrada además por la actividad mitocondrial.
- Un extracto acuoso del fruto rojo de *Cladocolea Ioniceroides* que contiene polifenoles, flavonoides, taninos y alcaloides, es capaz de disminuir la viabilidad *in vitro* de distintas líneas celulares de cáncer de mama, sin afectar significativamente células no cancerosas.

9. Referencias

Al-Dabbas, M., Suganuma, T., Kitahara, K., Hou, D. y Fujii, M. (2006). Cytotoxic, antioxidant and antibacterial activities of *Varthemia iphionoides* Boiss. extracts. *Journal of Ethnopharmacology* **108**: 287-293.

Alvarado-Rosales, D., Saavedra-Romero, L. y Cárdenas-Soriano, E. (2009). Anatomía de la Interacción *Cladocolea loniceroides* (van Tieghem) Kuijt – *Salix bonplandiana* Kunth. *Revista Ciencia Forestal Mexicana* **34**(106): 191-203.

Amari, N., Bouzouina, M., Berkani, A. y Lotmani, B. (2014). Phytochemical screening and antioxidant capacity of the aerial parts of *Thymelaea hirsute* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. **4**(2): 104-109.

A.O.A.C. (2000). Official Methods of Analysis. 17th edition. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C.

ATCC, 2012. The essentials of life science research. Globally delivered. (<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=HTB-22&Template=cellBiology>). Fecha de consulta: 26 de noviembre de 2012.

Barbehenn, R. y Constabel, P. (2011). Tannins in plant-herbivore interactions. *Phytochemistry*, **72**: 1551-1565.

Barrajón-Catalán, E., Fernández-Arroyo, S., Sara, D., Guillén, E., Fernández-Gutiérrez, A., Segura-Carretero, A. y Micol, V. (2010). *Cistaceae* aqueous extracts containing ellagitannins show antioxidant and antimicrobial capacity, and cytotoxic activity against human cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*. **48**: 2273-2282.

Bar-Sela, G. (2011). White-berry mistletoe (*Viscum album* L.) as complementary treatment in cancer: Does it help? *European Journal of Integrative Medicine*. **3**: e55-e62.

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. **72**: 248.
- Caamal-Fuentes, E., Torres-Tapia, L., Simá-Polanco, P., Peraza-Sánchez, S. y Moo-Puc, R. (2011). Screening of plants used in Mayan traditional medicine to treat cancer-like symptoms. *Journal of Ethnopharmacology* **135**: 719-724.
- Cházaro, B., Oliva, R., Ramón, F. y Vázquez, G. (2005). *Cladocolea oligantha* (Loranthaceae) un nuevo registro para Veracruz, México y datos generales sobre este taxón. *Polibotánica* **20**: 1-15.
- Cid-Villamil, R. (2006). Biología reproductiva de *Cladocolea loniceroides* (van Tieghem) Kuijt (Loranthaceae). Tesis de doctorado UNAM, posgrado en ciencias biológicas.
- De la Paz Pérez, C. y Ceja, J. R. (2005). Branches anatomy of *Flaxinus uhdei* (Wenzing) Lingelsheim and *Prunus persica* Batsch. Infected by *Cladocolea spp.* (mistletoe). *XVII International Botanical Congress*. Viena, Austria. 17 a 23 de julio.
- De la Paz Pérez, C., Ceja, J y Vela, G. (2006). Árboles y muérdagos: una relación que mata. *Contactos*. **59**: 28-34.
- Domínguez, L. (2004). Principios generales de carcinogénesis: carcinogénesis química y hormonal. *Biocáncer*. **1**.
- Dubin, M. y Stoppani, A. (2000). Muerte celular programada y apoptosis. Función de las mitocondrias. *Medicina*. **60**: 375-386.
- Durán-Rodríguez, G., Zúñiga-Ruíz, B., Muñoz-Ocotero, V., Herrera-Santoyo, J., Guevara-Fefer, P. y Pérez-Amador, M. (2010). *Cladocolea loniceroides* (Loranthaceae), hemiparásita con actividad antimicrobiana. *XVII Congreso Mexicano de Botánica*. Guadalajara, Jalisco. México 21 al 27 de noviembre.
- Gazzola, D., Vicenzi, S., Gastaldon, L., Tolin, S., Pasini, G. y Curioni, A. (2014). The proteins of the grape (*Vitis vinífera* L.) seed endosperm: fractionation and identification of the major components. *Food Chemistry* **115**: 132-139.

- Ghazarian, H., Idoni, B. y Oppenheimer, S. (2011). A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta histochemica*, **133**: 236-247.
- Gilani, A. y Atta-ur-Rahman. (2005). Trends in ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* **100**: 43-49.
- Go, V., Butrum, R. y Wong, D. (2003). Diet, nutrition and cancer prevention: the postgenomic era. *American Society of Nutrition Science* **2003**: 3830S-3836S.
- Hernández-Cruz, P., Pérez-Campos, E., Martínez-Martínez, L., Ortiz, B. y Martínez, G. (2005). Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato. *Revista de Educación Bioquímica*, **24**(1): 21-27.
- Hossain, M.A., Muhammad, M.D., Charles, G. y Muhammad I. (2011). *In vitro* total phenolics, flavonoids contents and antioxidant activity of essential oil, various organic extracts from the leaves of tropical medicinal plant *Tetra stigma* from Sabah. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. **4**(9): 717-721.
- Ignat, I., Volf, I. y Popa, V. (2011). A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*. **126**: 1821-1835.
- INEGI (2014). *Estadísticas a propósito de... Día mundial contra el cáncer (4 de febrero). Datos nacionales*. Revisado el 12 de julio de 2014 en: <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2014/cancer0.pdf>
- Isaza, J., Veloza, L., Ramírez, L. y Guevara, C. (2007). Estimación espectrofotométrica de taninos hidrolizables y condensados en plantas melastomatáceas. *Scientia et Technica*. **XIII (33)**: 261-266.
- Kilkowski, W. y Gross, G. (1998). Color reaction of hydrolysable tannins with Bradford reagent, Coomassie brilliant blue. *Phytochemistry*, **51**: 363-366.
- Krishnaiah, D., Devi, T., Bono, A. y Sarbatly, T. (2009). Studies on phytochemical constituents of six Malaysian medicinal plants. *Journal of Medicinal Plants Research*. **3**(2): 67-72.

- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685.
- Lamont, B. (1983). Mineral nutrition of mistletoes. En: The biology of mistletoes. Calder, M and P. Berhardt (Eds.). Academic Press. Sidney, Australia. pp. 185-204.
- Liu, R. H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *Journal of Nutrition* **134**(12): 3479s-3485s.
- López de Buen, L. (2005). Propuesta de manejo integral y aprovechamiento del muérdago *Psittacanthus schiedeanus*, para la conservación de las aves silvestres. *1er. Congreso internacional de casos exitosos de desarrollo sostenible del trópico*. Boca del Río, Veracruz. México, 2 al 4 de mayo, 1-10.
- López-Miranda, S., Hernández-Sánchez, P., Serrano-Martínez, A., Hellín, P., Fenoll, J. y Núñez-Delicado, E. (2011). Effect of ripening on protein content and enzymatic activity of Crimson Seedless table grape. *Food Chemistry* **127**: 481-486.
- Lyu, S., Park, W. (2006). Mistletoe lectin (*Viscum album coloratum*) modulates proliferation and cytokine expressions in murine splenocytes. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. **39**(6):662-670.
- Marchal-Valencia, D. (2009). El muérdago en la Ciudad de México. *Arbolama*. **2**: 10-30.
- Martínez, A., Valencia, G., Jiménez, N., Mesa, M. & Galeano, E. (2008). Manual de prácticas de laboratorio de farmacognosia y fitoquímica. *Universidad de Antioquia Facultad de Química Farmacéutica*. Departamento de farmacia. Medellín. 80-90.
- Mejía, J., Flores, H., Juárez, I., Vásquez, J., Games, J., Pérez, M. (2005). Edad de aparición de los diferentes tumores malignos de la infancia. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, **43**(1): 25-37.
- Moghadam, M.S., Maleki, S., Darabpour, E., Motamedi, H., Mansour, S., Nejad, S. (2010). Antimicrobial activity of eight Iranian plant extracts against methicillin and cefixime resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. **3**: 262-265.

Morales-Carballo, C., Durán-Rodríguez, G., Zúñiga-Ruíz, B., Muñoz-Ocotero, V., Herrera-Santoyo, J. & Guevara-Fefer, P. (2010). Estudio de la actividad citotóxica de *Cladocolea loniceroides* y *Struthanthus interruptus* (Loranthaceae). *XVII Congreso Mexicano de Botánica*. Guadalajara, Jalisco. México. 21 al 27 de noviembre de 2010.

Morales, J., Fernández, A., Bautista, M., Vargas, N. & Madrigal, E. (2009). Epidemiología de las enfermedades crónico degenerativas. En: *Los antioxidantes y las enfermedades crónico degenerativas*. Edit. Ciencia al Día. México. 269-310.

Moreno-Casasola, P. (1996) Estructura y formación de las semillas En: *Vida y obra de granos y semillas*. Fondo de Cultura Económica, col. Ciencia para todos. México, 208 pp.

National Cancer Institute (2014). Defining cancer: <http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer> (12 de julio 2014).

Nisa, H., Kamili, A., Bradh, S., Amin, S., Lone, B. y Parray, J. (2013). Phytochemical screening, antimicrobial and antioxidant efficacy of different extracts of *Rumex dentatus* L. – A locally used medicinal herb of Kashmir Himalaya. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. **3**(6): 464-440.

Olaku, O y White, J. (2011). Herbal therapy use by cancer patients: A literature review on case reports. *European Journal of Cancer* **47**: 508-514.

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2013). *Cáncer. Nota descriptiva No. 297*. Recuperado el 5 de diciembre de 2013, de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>

Osborne, T. B. (1924). The vegetable proteins. En: *Monographs on Biochemistry*, 2nd ed.; Loongmans, Green: New York.

Padhye, V. y Salunke, D. K. (1979). Extraction and characterization of rice proteins. *Cereal chemistry*, **56**: 389.

Paredes-López, O., Ordorica-Falomir, C. y Cárabez-Trejo, A. (1988). Production of safflower protein isolates: physicochemical characterization. *Food Science and Technology*, **21**(6): 328-333.

Park, J., Hyun, C. y Shin, H. (1999). Cytotoxic effects of the components in heat-treated mistletoe (*Viscum album*). *Cancer letters*, **139**: 207-213.

Pereira-Rodarte, M., Ribeiro-Dias, D., Marques-Vilela, D. y Freitas-Schwan, R.(2011). Proteolytic activities of bacteria, yeasts and filamentous fungi isolated from coffee fruit (*Coffea Arabica* L.). *Maringá*.**33**(3): 457-464.

Price, M., van Scoyoc, S. y Butler, L. (1978). A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **26**: 1214-1218.

Rodrigo, M., Alquézar, B., Alós, E., Lado, J. y Zacarías, L. (2013). Biochemical bases and molecular regulation of pigmentation in the peel of Citrus fruit. *Scientia Horticulturae*, **163**: 46-62.

Sánchez, V. (2001). Mecanismos reguladores de la muerte celular no necrótica. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*. **20**: 266-274.

Secretaría de Salud [SSA], Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud [SPPS]. (2013). *Los 5 tipos de cáncer que más afectan a mexicanos*. Recuperado el 10 de enero de 2014, de: <http://www.spps.salud.gob.mx/noticias/1445-5-tipos-cancer-mas-afectan-mexicanos.html>

Sergent, T., Vanderstraeten, J., Winand, J., Beguin, P. y Scheneider, Y. (2012). Phenolic compounds and plant extracts as potential natural anti-obesity substances. *Food Chemistry*. **135**: 68-73.

Serrano-Maldonado, M. J., Guerrero-Legarreta, I., De la Paz Pérez-Olvera, C. y Soriano-Santos, J. (2011). Actividad antioxidante y efecto citotóxico de *Cladocolea loniceroides* (van Thieghem) Kujit (Loranthaceae). *Revista Mexicana de Ingeniería Química* **10**(2):161-170.

Shi, Q., Hui, S., Ai-Hua, Z, Hong-Ying, X., Guang-Li, Y., Ying, H y Xi-Jun, W. (2014). Natural alkaloids: basic aspects, biological roles and future perspectives. *Chinese Journal of Natural Medicines*, **12**(6): 0401-0406.

- Singleton, V. L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventos, R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu's reagent. *Methods in Enzymology*.**299**: 152-178.
- Sinha, R.K. (2004). Protein metabolism. En: Modern plant physiology. Ed. AlphaScience, U.K.
- Sreevidya, N. y Mehrotra, S. (2003). Spectrophotometric method for estimation of alkaloids precipitable with Dragendorff's reagent in plant materials. *Journal of AOAC International*, **86** (6): 1124-1127.
- Surh, Y. J. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat. Rev. Cancer*, **3**: 768-780.
- Tessmer, M., Kluge, R. y Appezzato-da-Glória, B. (2014). The accumulation of tannins during the development of 'Giombo' and 'Fuyu' persimmon fruits. *Scientia Horticulturae*, **172**: 292-299.
- Tlili, I., Hdider, C., Lenucci, M., Ilahy, R., Jebari, H. y Dalessandro, G. (2011). Bioactive compounds and antioxidant activities during fruit ripening of watermelon cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*.**24**: 923-928.
- Tsao, R. y Yang, R. (2003). Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: Towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **1018**: 29-40.
- Vázquez, C., y Cibrián, T. (1996). Guía para evaluar rodales infestados por muérdago enano *Arceuthobium* spp. *Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias*. México, D.F. México. Agenda Técnica **1**: 1-12.
- Wink, M. (2007). Molecular modes of action of cytotoxic alkaloids: from DNA intercalation, spindle poisoning, topoisomerase inhibition to apoptosis and multiple drug resistance. En: *The alkaloids vol. 64*. Edit. Elsevier.

Wolfe, K. y Hai, R. (2007). Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **30**, A-L.

Zamora, J., Otárola, I. y Brenes, O. (2005). La apoptosis y su relación con diversos nutrientes. *Revista chilena de nutrición*, **32**(3): 178-190.

APÉNDICE A

PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA MARCHA FITOQUÍMICA

- Reactivo de Kedde.
 - o Solución 1: Ácido 3,5 dinitrobenzoico al 2% en metanol.
 - o Solución 2: Hidróxido de potasio al 5.7% en agua.
- Reactivo de Dragendorff. En matraz, disolver 8g de nitrato de bismuto pentahidratado con 20mL de ácido nítrico (30%). En otro matraz, 27.2g de yoduro de potasio con 50mL de agua. Mezclar ambas soluciones y dejar reposar por 24 h. Decantar y separar los cristales de nitrato de potasio y aforar a 100 mL.
- Reactivo de Meyer: 13.6 g de cloruro de mercurio en 60mL de agua. En otro matraz, 5g de yoduro de potasio en agua. Mezclar soluciones y aforar a 100 mL.
- Reactivo de Valser. 10 g de yoduro de potasio y 5g de yoduro de mercurio II en 100 mL de agua destilada. Dejar reposar y filtrar.

APÉNDICE B

CURVA ESTÁNDAR DE ÁCIDO GÁLICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES.

En la tabla A se muestran las concentraciones de ácido gálico utilizadas para la elaboración de la curva estándar para la determinación de polifenoles totales en los extractos de fruto de muérdago. Asimismo, en la figura A se muestra la curva de ácido gálico (mg/L) versus absorbencia a 765 nm, de la cual se obtuvo la ecuación de la recta para la determinación de polifenoles en equivalentes de ácido gálico.

Tabla A. Concentración de ácido gálico y absorbencia a 765 nm.

Concentración (mg/L)	Absorbencia (765 nm)
25	0,107 ± 0.0015
50	0,219 ± 0.0055
100	0,441 ± 0.0072
150	0,677 ± 0.0025
200	0,898 ± 0.0098

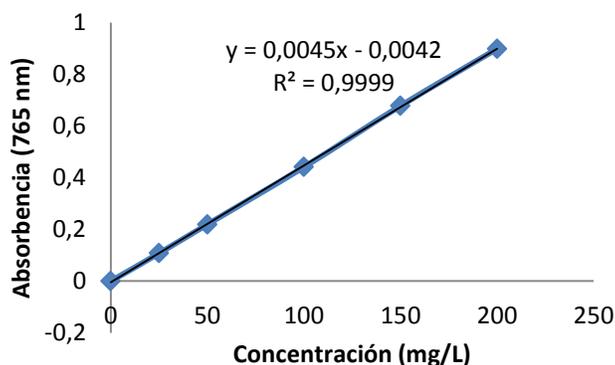


Figura A. Curva estándar de ácido gálico para determinación de polifenoles totales.

APÉNDICE C

CURVA ESTÁNDAR DE RUTINA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES.

En la tabla B se muestran las concentraciones de rutina utilizadas para la elaboración de la curva estándar para la determinación de flavonoides en los extractos de fruto de muérdago. Asimismo, en la figura B se muestra la curva de rutina (mg/L) versus absorbencia a 510 nm, de la cual se obtuvo la ecuación de la recta para la determinación de flavonoides en equivalentes de rutina.

Tabla B. Concentración de rutina y absorbencia a 510 nm.

Concentración (mg/mL)	Absorbancia (510nm)
0	0
0.1	0.202
0.2	0.351
0.3	0.521
0.4	0.622
0.5	0.754

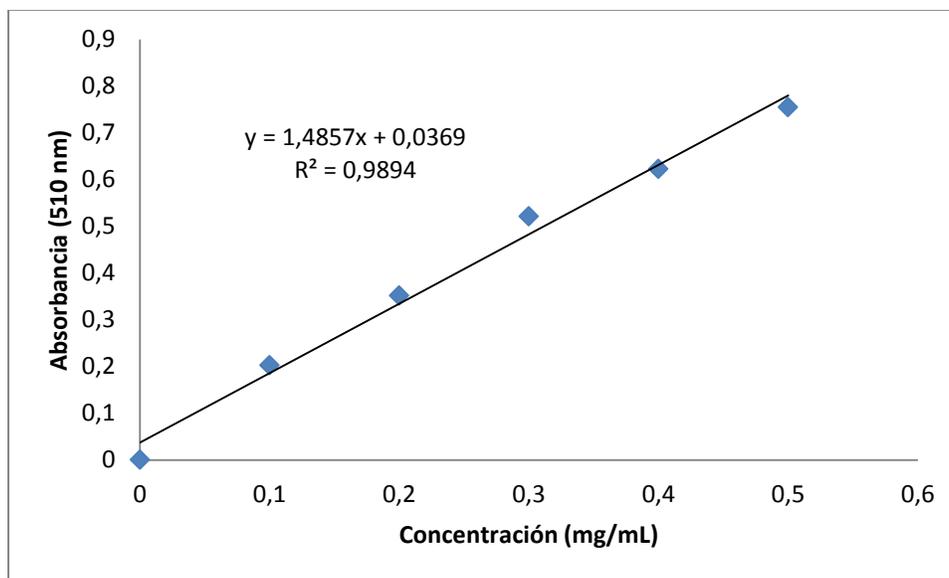


Figura B. Curva estándar de rutina para determinación de flavonoides.

APÉNDICE D

CURVA ESTÁNDAR DE CATEQUINA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE TANINOS CONDENSADOS.

En la tabla C se muestran las concentraciones de catequina utilizadas para la elaboración de la curva estándar para la determinación de taninos condensados en los extractos de fruto de muérdago. Asimismo, en la figura C, se muestra la curva de catequina (mg/L) versus absorbencia a 500 nm, de la cual se obtuvo la ecuación de la recta para la determinación de taninos condensados.

Tabla C. Concentración de catequina y absorbencia a 500 nm.

Concentración (ppm)	Absorbencia (500nm)
100	0.196 ± 0.005
200	0.348 ± 0.007
400	0.613 ± 0.030
500	0.722 ± 0.049
600	0.831 ± 0.039
800	1.019 ± 0.023
1000	1.16 ± 0.005

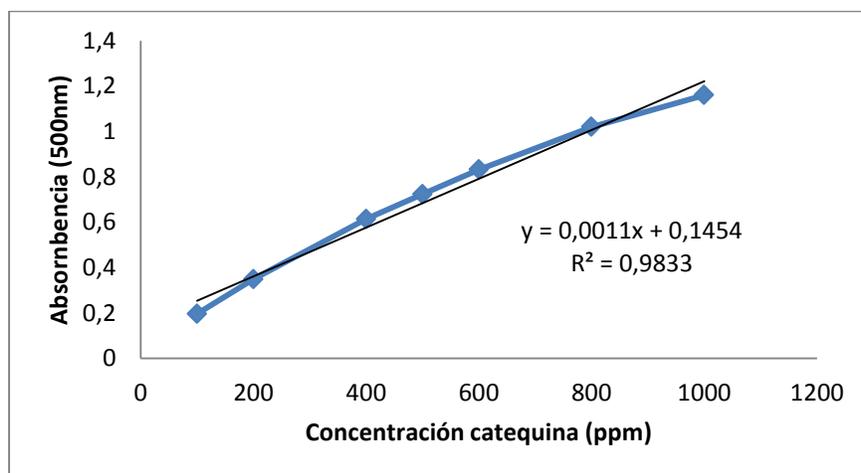


Figura C. Curva estándar de catequina para la determinación de taninos condensados.

APÉNDICE E.

CURVA ESTÁNDAR DE ÁCIDO ELÁGICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE TANINOS HIDROLIZABLES.

En la tabla D se muestran las concentraciones de ácido elágico utilizadas para la elaboración de la curva estándar para la determinación de taninos hidrolizables en los extractos de fruto de muérdago. Asimismo, en la figura D, se muestra la curva de ácido elágico (ppm) versus absorbencia a 368 nm, de la cual se obtuvo la ecuación de la recta para la determinación de taninos hidrolizables.

Tabla D. concentración de ácido elágico y absorbencia a 368 nm.

Concentración (ppm)	Absorbencia (368 nm)
4	0,179
8	0,409
12	0,568
16	0,789
20	0,991

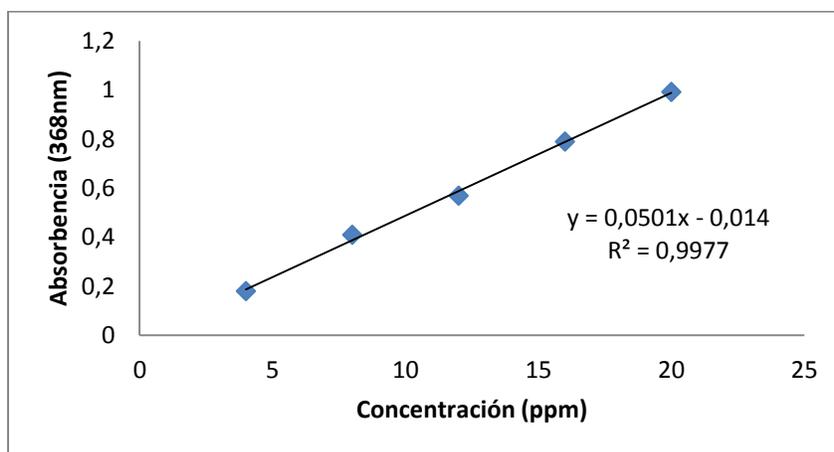


Figura D. Curva estándar de ácido elágico para la cuantificación de taninos hidrolizables.

APÉNDICE F.

CURVA ESTÁNDAR DE NITRATO DE BISMUTO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ALCALOIDES.

En la tabla E se muestran las concentraciones de nitrato de bismuto utilizadas para la elaboración de la curva estándar para la determinación de alcaloides en los extractos de fruto de muérdago. Asimismo, en la figura E, se muestra la curva de nitrato de bismuto (ppm) versus absorbencia a 435nm, de la cual se obtuvo la ecuación de la recta para la determinación de alcaloides.

Tabla E. concentración de nitrato de bismuto y absorbencia a 435 nm.

Concentración (ppm)	Absorbencia (435nm)
100	0.088 ± 0.001
200	0.235 ± 0.004
400	0.510 ± 0.003
500	0.652 ± 0.001
600	0.790 ± 0.009
800	1.072 ± 0.008
1000	1.367 ± 0.021

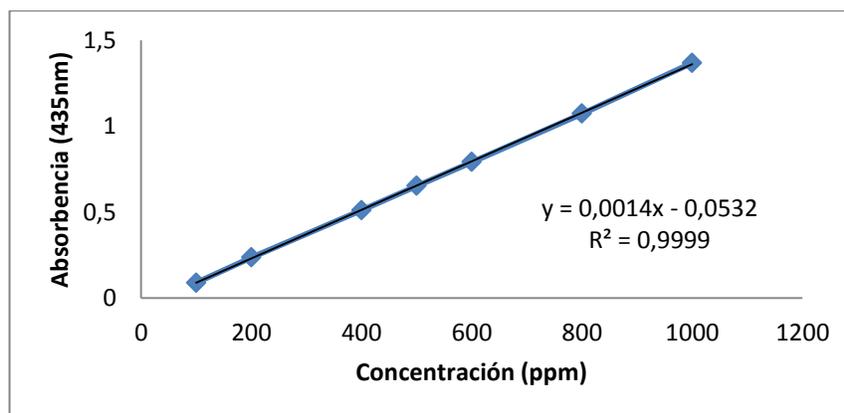


Figura E. Curva estándar de nitrato de bismuto para la cuantificación de alcaloides.

APÉNDICE G

CUANTIFICACIÓN DE NITRÓGENO TOTAL Y PROTEÍNA CRUDA POR EL MÉTODO DE KJELDAHL (NO. 2.049, AOAC, 2000).

El nitrógeno es el elemento químico que permite diferenciar a las proteínas de grasas y carbohidratos, sin embargo, la fracción proteínica de una muestra no es la única fuente de nitrógeno, ya que puede venir de péptidos, aminoácidos libres y compuestos nitrogenados ni proteínicos. El contenido de nitrógeno en una muestra, es convertido en sales de amonio por digestión de la muestra con ácido sulfúrico concentrado.

Se colocaron 0.15 g de muestra o 3 mL de muestra líquida con 0.8 g de catalizador ($\text{CuSO}_4\text{-K}_2\text{SO}_4$ (1:9)) y 3 mL de H_2SO_4 en un matraz Kjeldahl. Se realizó la digestión de la muestra hasta no desprender humo bajo una campana de extracción. Una vez terminada la digestión, se transfirió la muestra a un destilador microkjaldahl con 5 mL de agua, posteriormente se agregaron 15 mL de NaOH al 40% y para recibir la destilación se colocó un vaso con 10 mL de H_3BO_3 al 2% con 3 gotas de rojo de metilo y azul de metileno como indicadores. Terminada la destilación, se tituló la muestra con HCl 0.01N.

El contenido de nitrógeno en la muestra se obtuvo por la siguiente fórmula:

$$\%N = \frac{\text{mL de HCl gastados en la muestra}}{W} \times \text{meq N} \times N_{\text{HCl}} \times 100$$

Y el contenido de proteína cruda se calculó multiplicando el contenido de nitrógeno por el factor 6.25:

$$\% \text{ proteína cruda} = \%N \times 6.25$$

Donde:

meq N: miliequivalentes de nitrógeno.

N_{HCl} : normalidad del ácido clorhídrico.

%N: porcentaje de nitrógeno.

W: peso o volumen de la muestra.

APÉNDICE H

CURVA ESTÁNDAR DE BRADFORD PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA ADHERIDA A COLORANTE

La tabla F, muestra las concentraciones de albúmina sérica bovina utilizada como referencia para la construcción de la curva estándar para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford. Asimismo, en la figura F se muestran los resultados con la ecuación de la recta utilizada para la evaluación cuantitativa de proteínas.

Tabla F. concentración de albúmina sérica bovina y absorbencia a 595 nm.

Concentración (mg)	Absorbencia (595 nm)
10	0,216 ± 0.030
20	0,385 ± 0.032
30	0,486 ± 0.040
40	0,698 ± 0.041
50	0,83 ± 0.049

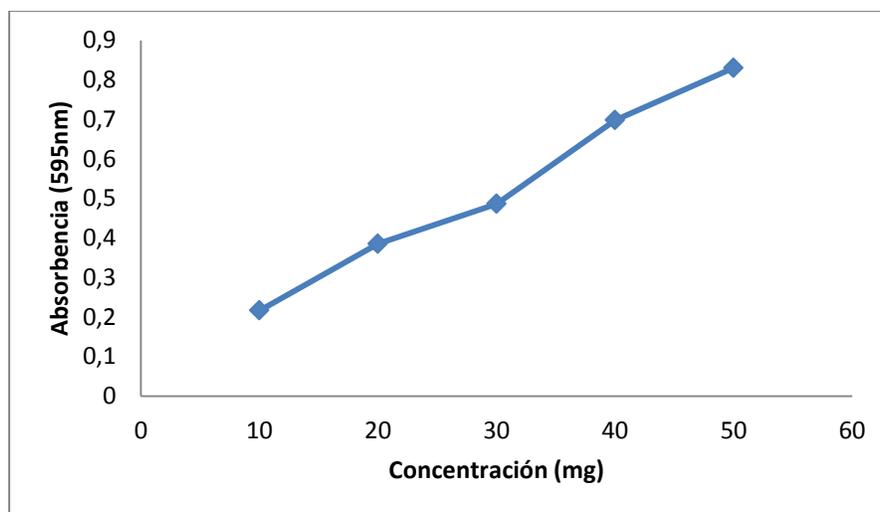


Figura F. Curva estándar de albúmina para la determinación de proteína verdadera adherida a colorante.

APÉNDICE I

SOLUCIONES PARA LA PREPARACIÓN DE GELES DE ELECTROFORESIS SDS-PAGE

La tabla G muestra las soluciones stock para la preparación de geles de electroforesis SDS-PAGE.

Tabla G. Soluciones para la preparación de SDS-PAGE.

Solución	Tris (M)	Glicina (g/L)	pH	SDS (%)
Tris-HCl	0.5	-	6.8 ^c	-
Tris-HCl	1.5	-	8.8 ^c	-
Buffer de corrida	15 (g/L)	72	8.3	0.5
SDS	-	-	-	10
Mezcla de acrilamida-bisacrilamida 30 % T ^a , 2.67% C ^b		% acrilamida (p/v) 29.2	% bisacrilamida (p/v)	0.8

- %concentración de acrilamida y bisacrilamida.
- %concentración de entrecruzamiento de acrilamida-bisacrilamida.
- Ajustar el pH con HCl concentrado.

La tabla H muestra la composición de los geles de electroforesis SDS-PAGE.

Tabla H. Composición de los geles de electroforesis SDS-PAGE.

Solución o reactivo	Gel concentrador (4%)	Gel de separación (12%)
Agua desionizada	6.1 mL	3.5 mL
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	2.5 mL	-
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	-	2.5 mL
SDS 10%	100 µL	100 µL
Solución de acrilamida-bisacrilamida (30%T, 2.67% C)	1.3 mL	4 mL
Persulfato de amonio (10%) a	75 µL	75 µL
TEMED	15 µL	8 µL

- Preparar el mismo día.

La tabla I muestra la composición del buffer de muestra para electroforesis SDS-PAGE.

Tabla I. Composición del buffer de muestra.

Solución o reactivo	Volumen (mL)
Agua desionizada	4
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1
Glicerol	0.8
SDS 10%	1.6
2- β -mercaptoetanol	0.4
Azul de bromofenol 0.05% (p/v)	0.2

APÉNDICE J

PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO DE LAS LÍNEAS CELULARES

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium). Gibco 31053-028.

Suplementos:

Piruvato de sodio. Gibco 11360-070.

L-glutamina. Gibco 25030-081.

Antibiótico (Pen-strep). Gibco 15140-122.

MEM NEAA (Non essential amino acids). Gibco 11140.

Suero fetal bovino. Gibco 16000-044.

Tabla H. Protocolo de preparación de medio de cultivo para línea celular MCF10A:

Suplemento	Volumen
L-glutamina	5 mL
MEM NEAA	5 mL
Antibiótico (Pen-Strep)	5 mL
Piruvato	5 mL
Suero fetal bovino	50 mL
Hidrocortisona (FlebocortidJanssen-Cilag)	4 μ L
Insulina	600 μ L
Factor de crecimiento	5 μ L
	70.609 mL
HAM 12 (1 parte)	107.347 mL
DMEM (3 partes)	322.044 mL
	429.391 mL

APÉNDICE K

METODOLOGÍA DE KIT CCK-8

1. En placas de 96 pozos se sembraron 100 μ L de suspensión celular con 10,000 células/pozo y la placa se mantuvo en incubación por 48 h a 37°C y 5% de CO₂.
2. Se sustituyó el medio de cultivo, por los tratamientos a diferentes concentraciones de extracto acuoso de fruto.
3. Después de 48 h de tratamiento, se añadieron 10 μ L de solución CCK-8 en cada pozo.
4. Incubación por 1 h.
5. Medir la absorbancia a 450 nm en lector de microplacas.
6. Se construyó una curva de las diferentes concentraciones de extracto con CCK-8 para evitar la interferencia de los tratamientos en la lectura de la placa.

APÉNDICE K

PRODUCTOS DE TRABAJO

Actividad antioxidante y efecto citotóxico de *Cladocolea Ioniceroides* (van Tieghem) Kuijt (Loranthaceae). Serrano-Maldonado, M. J., Guerrero- Legarreta, I., De la Paz Pérez-Olvera, C. y Soriano-Santos, J. Revista Mexicana de Ingeniería Química, 10 (2): 161-170, 2011.

2do. Lugar en la categoría posgrado del Premio a los Trabajos de Investigación en el Área de Salud 2010-2011. Universidad Autónoma Metropolitana, Red de Académicos La UAM en la Salud. Enero 2012.

4th. International Congress on Food Science and Food Biotechnology in Developing Countries. 29 de noviembre a 1 de diciembre de 2010. Boca del Río, Veracruz. "Citotoxicactivity of Mexican Mistletoe (*Cladocolea Ioniceroides*)". Serrano-Maldonado, M.J., Guerrero-Legarreta, I. y Soriano-Santos, J.

11^a. Reunión de Ciencias Médicas. 30, 31 de marzo y 1 de abril de 2011. León, Guanajuato. "Actividad antioxidante *in vivo* y citotoxicidad de extractos de *Cladocolea Ioniceroides*". Serrano-Maldonado, M.J., Guerrero-Legarreta, I., De la Paz Pérez Olvera, C., García-Gasca, T. y Soriano-Santos, J.

II Congreso Nacional de Innovación en Salud y Química Médica. 13 a 16 de abril de 2011. San Miguel de Allende, Guanajuato. "Efecto citotóxico de extracto de fruto de muérdago *Cladocolea Ioniceroides*". Serrano-Maldonado, M.J., García Gasca, T., De la Paz Pérez Olvera, C., Guerrero-Legarreta, I. y Soriano-Santos, J.

XXXII Encuentro Nacional y 1er. Congreso Internacional de la AMIDIQ. 3 a 6 de mayo de 2011. Riviera Maya, Quintana Roo. "Cytotoxic effect of aqueous fruit extract of mistletoe (*Cladocolea Ioniceroides*). Serrano-Maldonado, M. J., García-Gasca, T., De la Paz Pérez-Olvera, C., Guerrero-Legarreta, I. y Soriano-Santos, J.

XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. 19 a 24 de junio de 2011. Juriquilla, Querétaro. "Actividad antioxidante *in vivo* y citotoxicidad de extractos de

Cladocolea Ioniceroides". Serrano-Maldonado, M.J., García-Gasca, T., Guerrero-Legarreta, I., De la Paz Pérez-Olvera, C. y Soriano-Santos, J.

XIV National Congress of Biochemistry and Plant Molecular Biology and 7th Symposium Mexico-USA. 29 noviembre a 2 de diciembre de 2011. Campeche, Campeche. "Cell death induction of a breast cancer cell line by an antioxidant extract of mistletoe (*Cladocolea Ioniceroides*). Serrano-Maldonado, M.J., Arce-Vázquez, M.B., De la Paz Pérez-Olvera, C., García-Gasca, T. y Soriano-Santos, J.

VII Congreso Internacional XVIII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica X Jornadas Científicas de Biomedicina y Biotecnología Molecular. 28 a 30 de marzo de 2012. Ixtapa-Zihuatanejo, Guerrero. "Caracterización proteica de muérdago (*Cladocolea Ioniceroides*) y evaluación de su actividad antioxidante". Serrano-Maldonado, M.J., García-Gasca, T., Ortiz-Hernández, A., Ramos-Palma, A., De la Paz Pérez-Olvera, C. y Soriano-Santos, J.

XXXIII Encuentro Nacional y 2do. Congreso Internacional de la AMIDIQ. 1 a 4 de mayo de 2012. Los Cabos, Baja California Sur. "Inducción de muerte celular en tejidos de cáncer de mama por extractos de muérdago *Cladocolea Ioniceroides*". Serrano-Maldonado, M.J., De la Paz Pérez-Olvera, C., Damián Matzumura, P., García-Gasca, T. y Soriano-Santos, J.

III Congreso Internacional Avances de las Mujeres en las Ciencias, las Humanidades y todas las Disciplinas. Ciencia, Sociedad y Tecnología: Desafíos y Alternativas. 20 a 22 de junio de 2012. Xochimilco, Distrito Federal. "Estudio del efecto citotóxico del fruto de muérdago (*Cladocolea Ioniceroides*) en cultivos celulares de cáncer de mama y colon". Serrano-Maldonado, M.J. y Soriano-Santos, J.

5th International Congress of Food Science and Food Biotechnology in Developing Countries. 24 a 26 de octubre de 2012. Nuevo Vallarta, Nayarit. "Partial characterization of proteins from the fruit of mistletoe (*Cladocolea Ioniceroides*)". Serrano-Maldonado, M. J. y Soriano-Santos, J.

World Biotechnology Congress. 3 a 6 de junio de 2013. Boston, Massachusetts, EUA. "Cell death induced by a fruit mistletoe extract (*Cladocolea Ioniceroides*) on different breast cancer cultures". Serrano-Maldonado, M. J., Damián-Matzumura, P. G., De la Paz Pérez-Olvera, C., García-Gasca, T. y Soriano-Santos, J.

III Foro Institucional y I Congreso Nacional Universidad y la Salud 2013. 19 a 21 de junio. Rectoría General UAM, Distrito Federal, México. “Muerte celular inducida por un extracto crudo de fruto de muérdago (*Cladocolea loniceroides*) sobre diferentes cultivos de cáncer de mama. Serrano-Maldonado, M. J., Damián-Matzumura, P. G. y Soriano-Santos, J.

XV National Congress of Biotechnology and Bioengineering, 12th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms. 23 a 28 de junio de 2013. Cancun, Quintana Roo, México. “Mistletoe fruit extract as death inductor in breast cancer cell cultures”. Serrano-Maldonado, M. J., Damián-Matzumura, P. G., Paredes-Ruíz, F., Soriano-Santos, J.

Experimental Biology 2014. 26 a 30 de abril de 2014. San Diego, California. “Mistletoe (*Cladocolea loniceroides*) fruit extract on viability of breast cancer cell cultures”. Serrano-Maldonado, M. J., Damián-Matzumura, P.G. García-Gasca, T. y Soriano-Santos, J.