



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

FACULTAD DE BIOLOGÍA

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**“Efecto protector del extracto de *Callistemon
citrinus* en un modelo de cáncer de colon inducido
en rata”**

TESIS

Que como requisito para obtener el grado académico de:
Maestro en Ciencias Biológicas

Presenta:

Biól. Alejandro López Mejía

Asesor:

Dra. Patricia Ríos Chávez

Morelia, Michoacán, México, marzo de 2018



**FACULTAD
DE
BIOLOGIA**
TZIPEQUAHRENGUA

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Fitobioquímica de la Facultad de Biología (UMSNH), bajo la dirección de la **Dra. Patricia Ríos Chávez**



ÍNDICE GENERAL

	Página
Índice de figuras	i
Índice de tablas	ii
Abreviaciones	iii
Resumen	v
Abstract	vi
1. Introducción general	1
1.1 Generalidades del cáncer	2
1.2 Cáncer colorrectal	4
1.3 Quimioprevención del cáncer	7
1.4 <i>Callistemon citrinus</i> (Curtis) Skeels	10
1.4.1 Usos, atribuciones y composición química	11
1.4.2 Estudios de <i>C. citrinus</i> que crece en México	12
2. Justificación	13
3. Hipótesis	14
4. Objetivos	15
4.1 Objetivo general	15
4.2 Objetivos particulares	15
5. Estrategia experimental	16
6. Resultados	17
6.1 Capítulo I: Caracterización fitoquímica, determinación de la capacidad antioxidante <i>in vitro</i> e identificación de compuestos con propiedades anticancerígenas en los extractos de <i>Callistemon citrinus</i>	17
Resumen	17
Abstract	17
Introducción	18
Materiales y métodos	19
Material biológico	19
Preparación de los extractos	19
Análisis de fitoquímico: cromatografía de gases y espectrometría de masas.	20
Determinación de los fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu	20
Determinación de flavonoides	20



Capacidad antioxidante	21
Técnica ABTS	21
Técnica DPPH	21
Técnica FRAP	21
Análisis estadístico	22
Resultados y discusión	22
Contenido e identificación de compuestos terpénicos en <i>C. citrinus</i>	22
Contenido de fenoles totales y flavonoides	25
Capacidad antioxidante <i>in vitro</i> de los extractos de <i>C. citrinus</i>	25
Conclusión	29
Literatura citada	29
6.2 Capítulo II Efecto de los extractos de <i>Callistemon citrinus</i> en el desarrollo cáncer de colon inducido con 1,2 dimetilhidrazina	32
Resumen	32
Abstract	32
Introducción	33
Materiales y métodos	34
Preparación de los extractos	34
Animales	34
Modelo de carcinogénesis colónica experimental	35
Análisis macroscópico de tumores	36
Focos de criptas aberrantes	36
Estudio histológico	37
Proteínas totales y albúmina sérica	37
Análisis estadístico	37
Resultados y discusión	38
Modelo de carcinogénesis	38
Focos de criptas aberrantes	41
Control de peso	43
Proteínas y albumina en suero	44
Conclusión	45
Literatura citada	46



6.3 Capitulo III Inducción de enzimas antioxidantes y de fase II por los extractos de <i>Callistemon citrinus</i> en un modelo de cáncer colorrectal.	48
Resumen	48
Abstract	48
Introducción	49
Materiales y métodos	50
Modelo de cáncer de colon y muestras biológicas	50
Preparación de homogenados citosólicos	50
Determinaciones enzimáticas de la fase II	51
Quinona reductasa (QR)	51
Glutación s-transferasa (GT)	51
Determinaciones enzimáticas del sistema de defensa antioxidante	51
Superoxido dismutasa (SOD)	51
Catalasa (CAT)	52
Glutación peroxidasa (GPx)	53
Niveles del glutación reducido	53
Cuantificación de proteínas	54
Análisis estadístico	54
Resultados y discusión	54
Actividad de las enzimas de defensa antioxidantes	54
Superoxido dismutasa (SOD)	54
Catalasa (CAT)	56
Glutación peroxidasa (GPx)	57
Actividad de enzimas de la fase II	61
Quinona reductasa	61
Glutación s-transferasa	62
Contenido de glutación reducido	66
Conclusión	68
Literatura citada	69
7. Discusión general	72
8. Conclusión general	78
9. Bibliografía complementaria	79
10. Anexos	89



ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Desarrollo del cáncer colorrectal y su base genética	4
Figura 2. El metabolismo de la 1,2 dimetilhidrazina (DMH)	7
Figura 3. Mecanismo de quimiopreención de los sistemas enzimáticos de fase II y antioxidantes tomando como ejemplo el metabolismo de la 1,2 dimetilhidrazina (DMH)	8
Figura 4. <i>Callistemon citrinus</i> (Curtis) Skeels	10
Figura 5. Estrategia experimental	16
Figura 6. Contenido de fenoles totales en los extractos de flores y hojas de <i>C. citrinus</i> medido por la técnica de Folin-Ciocalteu	25
Figura 7. Contenido de flavonoides en los extractos de flores y hojas de <i>C. citrinus</i> medido por la técnica del cloruro de aluminio	26
Figura 8. Capacidad antioxidante de los extractos de flores y hojas de <i>C. citrinus</i> expresado en equivalentes de trolox por miligramo de peso del extracto medido por tres técnicas distintas: DPPH, ABTS y FRAP.	27
Figura 9. Diagrama del modelo de inducción de cáncer de colon con 1,2 dimetilhidrazina (DMH).	35
Figura 10. Imagen representativa de los tumores del modelo de carcinogénesis colonica experimental.	38
Figura 11. Histología del colon.	41
Figura 12. Fosas normales del epitelio intestinal perteneciente a un individuo del grupo control (a); Foco de criptas aberrantes (FCA) de un individuo tratado con DMH (b).	42
Figura 13. Grafico que representa el peso inicial y final de los animales del experimento	44
Figura 14. Proteínas y albúmina sérica de los 4 grupos experimentales	45
Figura 15. Actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en los distintos tejidos: hígado y colon proximal, medio y distal.	55
Figura 16. Actividad enzimática de la catalasa (CAT) en distintos tejidos: hígado y colon proximal, medio y distal.	58
Figura 17. Actividad enzimática de la glutatión peroxidasa (GPx) en distintos tejidos: hígado y colon proximal, medio y distal.	60
Figura 18. Actividad enzimática de la quinona reductasa (QR) en distintos tejidos: hígado y colon proximal, medio y distal.	61
Figura 19. Actividad enzimática de la glutatión s-transferasa (GST) en distintos tejidos: hígado y colon proximal, medio y distal.	63
Figura 20. Contenido de glutatión reducido (GSH) en hígado, colon proximal, colon medio y colon distal.	67



ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Compuestos químicos aislados de plantas que presentan actividad anticancerígena	9
Tabla 2. Composición química de los extractos de flores y hojas de <i>Callistemon citrinus</i> medida por GS/MS	23
Tabla 3. Incidencia de masas tumorales en el colon tras 22 semanas de experimentación.	39
Tabla 4. Incidencia de FCA en las tres zonas del colon tras 22 semanas de experimentación	42



ABREVIACIONES

A	Absorbancia
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BSA	Albumina sérica bovina
°C	Grados centígrados
CAT	Catalasa
cm	Centímetro
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenceno
DCPIP	Dicloro-fenol-indol-fenol
DDMP	2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-ona
DMH	1,2-dimetilhidrazina
DMSO	Dimetilsulfoxido
DPPH	1,1-difenil2-picrilhidracil
DTNB	5,5'-ditiobis, 2-ácido nitrobenzoico
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
FAD ⁺	Flavin adenin dinucleótido oxidado
FCA	Fosas cripticas aberrantes
Fe ₂ SO ₄	Sulfato de hierro (III)
FRAP	Poder antioxidante de reducción férrica
G (g)	Gramo
GPx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación reducido
GST	Glutación-s-transferasa
Kg	Kilogramo
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HCl	Ácido clorhídrico
M	Molar
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sodio
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
nM	Nanomolar
nm	Nanómetro
NaCl	Cloruro de sodio



QR	Quinona reductasa
pH	Potencial de hidrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno (por sus siglas en inglés)
RPM	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato sódico
SOD	Superoxido dismutasa
TNB	5-mercapto-2-nitrobenzoico
U	Unidad de actividad enzimática
W	Watt
μL	Microlitro
μM	Micromolar
μm	Micrometro



RESUMEN

El cáncer colorrectal es uno de los tipos de cáncer más frecuentes y con mayor tasa de mortalidad por lo que se ha convertido en un grave problema de salud pública. La búsqueda de compuestos bioactivos con propiedades anticancerígenas y quimiopreventivas ocupa un lugar destacado en la investigación contra este padecimiento. *Callistemon citrinus* es una planta utilizada en México como ornamental. Estudios recientes han demostrado que posee una amplia gama de propiedades biológicas con posibles aplicaciones terapéuticas, destacando la actividad antioxidante. El objetivo principal de este estudio fue determinar el efecto protector de extractos etanólicos de hojas y flores de *C. citrinus* en un modelo de cáncer de colon inducido en ratas. Los extractos fueron analizados fitoquímicamente y se identificó la presencia de 20 compuestos químicos, la mayoría de tipo terpenico. El eucaliptol fue el compuesto más abundante en hojas (7.5%) y la 3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona (DMPP) en flores con 4.4%. Este compuesto no había sido reportado previamente en la literatura para *C. citrinus*. Ambos extractos presentaron un alto contenido de fenoles totales y flavonoides. La capacidad antioxidante *in vitro* de los extractos fue evaluada por tres técnicas: ABTS, DPPH y FRAP. Los extractos de flores presentaron una mayor capacidad antioxidante que los extractos de hojas. Los extractos fueron probados en un modelo de cáncer colorrectal inducido con 1,2 dimetilhidrazina (DMH) en ratas. Se establecieron cuatro grupos experimentales (n=8): uno control, y tres que fueron administrados con 5 dosis de 65 mg/kg de DMH. Dos de estos grupos fueron administrados con dosis oral diaria de 250 mg/kg de cada uno de los extractos (respectivamente) durante todo el experimento cuya duración fue de 22 semanas. Los animales fueron sacrificados y se determinó la presencia de tumores y de fosas crípticas aberrantes (FCA). El extracto de hoja tuvo un efecto en la disminución del número de animales con tumores en un 33% contra el 100 % del grupo únicamente tratado con la DMH. También se redujo el número de FCA en el grupo tratado con el extracto de hojas (15 contra 36) respecto al grupo DMH. En contraste, el extracto de flores tuvo un efecto negativo y solo sobrevivió un individuo de ese tratamiento. También se evaluó la actividad de tres enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa) y dos de fase II (quinona reductasa y glutatión S-transferasa) en hígado, colon proximal, medio y distal. Los extractos de *C. citrinus* promovieron la actividad enzimática, manteniéndola igual o superior al grupo control. En contraste, en el grupo tratado con DMH la actividad enzimática disminuyó en la mayoría de los tejidos analizados. Adicionalmente se evaluó el contenido de glutatión (GSH) como marcador de daño por estrés oxidativo. Nuevamente, el contenido de GSH disminuyó significativamente en el grupo control negativo y aumento o se mantuvo normal en los grupos tratados con los extractos respecto al control. Los resultados obtenidos demuestran que *C. citrinus* tiene un efecto protector vía inducción enzimática y combatiendo el daño por estrés oxidativo en el cáncer colorrectal.

Palabras clave: *Callistemon citrinus*, quimiopreención, cáncer colorrectal, inducción enzimática, capacidad antioxidante.



ABSTRACT

Colorectal cancer is an important public health issue because is one of the most frequent cancers and have a high mortality rate. The search of bioactive compounds from plants with anticancer and chemopreventive properties have a prominent place in research against this disease. *Callistemon citrinus* is used as ornamental in Mexico. Recent studies have shown that has a wide range of biological properties with possible therapeutic applications, highlighting the antioxidant activity. The main objective of this study was to determine the protective effect of ethanolic extracts of *C. citrinus* of leaves and flowers in a model of colorectal cancer induced in rats. The extracts were analyzed phytochemically and was identified 20 chemical compounds, mainly composed of terpenic. Eucalyptol was the most abundant compound in leaves (7.5%) and 3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one (DMPP) in flowers with 4.4%. This compound had not previously been reported in the literature for *C. citrinus*. Both extracts presented higher content of total phenolic and flavonoids compounds. The antioxidant capacity *in vitro* of the extracts was evaluated by three assays: ABTS, DPPH and FRAP. The extracts of flowers presented a higher antioxidant capacity than the leaves extracts. The extracts were tested in a model of colorectal cancer induced with 1,2 dimethylhydrazine (DMH) in rats. Four experimental groups (n = 8) were established: one control, and three that were administered with 5 doses (65 mg/kg) of DMH. Two of these groups were administered with daily oral doses (250 mg/kg) of leaves and flowers extracts (respectively) during the all the experiment, which lasted 22 weeks. The animals were sacrificed and the presence of tumors and aberrant cryptic foci (ACF) were determined. The leaf extract had an effect in reducing the number of animals with tumors by 33% against 100% of the group only treated with DMH. The number of ACF was also reduced in the group treated with the leaves extract (15 against 36) with respect to the DMH group. In contrast, the flower extract had a negative effect and only one individual survived that treatment. The activity of three antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase) and two of phase II (quinone reductase and glutathione S-transferase) in liver, proximal, middle and distal colon were also evaluated. The extracts of *C. citrinus* promoted the enzymatic activity, being equal to or higher to the control group. In contrast, in the DMH treated group, the enzymatic activity decreased in most of the tissues analyzed. Additionally, the content of glutathione (GSH) was evaluated as a marker of oxidative stress damage. Again, the GSH content decreased significantly in the negative control group and increased or remained normal in the groups treated with the extracts respect to the control. The results obtained show that *C. citrinus* has a protective effect via enzymatic induction and reduce oxidative stress damage in colorectal cancer.

Keywords: *Callistemon citrinus*, chemoprevention, colorectal cancer, enzymatic induction, antioxidant activity.



1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El cáncer colorrectal (CCR) es una enfermedad multifactorial y multietapas que de manera global es la segunda causa de muerte entre los distintos tipos de cáncer, por lo que se le considera un grave problema de salud pública (OMS, 2015). Su etiología incluye factores genéticos (10-15% de los casos) y ambientales (85-90%) (Piña, 2007). Los malos hábitos de vida y sobre todo la alimentación tienen un papel muy importante en el desarrollo de este tipo de cáncer (Chan y Giovannucci, 2010).

Un factor importante asociado a esta enfermedad es el estrés oxidativo producido por especies reactivas y radicales libres, así como la actividad de los complejos enzimáticos endógenos que se encargan de metabolizar los compuestos cancerígenos presentes en la dieta. Se le adjudica a los antioxidantes y anticancerígenos naturales, la capacidad de proteger contra el estrés oxidativo e inducir mecanismos enzimáticos destoxificantes e inactivando los procesos carcinogénicos por lo que juegan un papel muy importante en el cuidado de la salud (Piña, 2007; Maldonado-Saavedra *et al.*, 2010).

Hoy día, un importante número de fármacos son obtenidos de productos naturales, de ahí la importancia de buscar plantas que presente un compuesto con propiedades biológicas para ser usado en el desarrollo de nuevos fármacos, complemento o aditivo alimentario para proveer de protección frente a diferentes enfermedades, incluyendo el cáncer (Arredondo-Espinoza, 2011)

Callistemon citrinus es una planta usada ancestralmente en la medicina tradicional de Australia y países del sur de Asia, y que en los últimos años han sido evaluadas sus propiedades farmacológicas corroborando que tiene actividad antiinflamatoria, antidiabética, hipolipémica y antioxidante, entre otras (Kumar *et al.*, 2007). A pesar de estas propiedades, en México su único uso es el ornamental y son recientes las investigaciones biológicas y farmacológicas realizadas para esta planta en nuestro país.

Los estudios realizados por nuestro grupo de trabajo han demostrado que los extractos de *C. citrinus* contienen un alto número de compuestos de interés farmacológico, con un alto potencial antioxidante *in vitro* y que no poseen toxicidad aguda y subaguda a dosis de 1000 mg/kg durante 28 días. Además, tiene efecto hepatoprotector y antioxidante *in vivo* por lo que es una buena candidata para su estudio en enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo como el cáncer (López-Mejía, 2015; Pérez-Mora, 2016).



1.1 Generalidades del cáncer

Se define como cáncer a un conjunto de aproximadamente 100 enfermedades distintas que pueden desarrollarse a partir de casi cualquier célula y en todos los órganos y tejidos. Las células cancerosas comparten características en común, la principal de las cuales es el crecimiento excesivo y descontrolado de células. Este es ocasionado por la acumulación de una serie de mutaciones y alteraciones genéticas que suprimen los mecanismos que regulan normalmente el crecimiento, la proliferación y la muerte celular. Eventualmente, la continua división celular ocasiona el crecimiento de tumores malignos que tienen la capacidad de diseminarse a tejidos y órganos distantes. Este proceso, denominado metástasis, es la principal causa de muerte en personas con cáncer (**Lodish et al.**, 2003; **Ries et al.**, 2006; **Varadadhachary et al.**, 2006; **Stewart y Wilde** 2014; **OMS** 2015; **Chaparro et al.**, 2015).

Se han descrito seis principales características de las células cancerosas (**Hanahan y Weinberg**, 2000; **Stewart**, 2017):

- 1) Autosuficiencia de señales que promueven crecimiento celular.
- 2) Mecanismos de evasión de apoptosis (muerte celular programada).
- 3) Pérdida de la capacidad de respuesta anticrecimiento.
- 4) Crecimiento replicativo ilimitado
- 5) Capacidad de formar nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis)
- 6) Capacidad de invasión de otros tejidos y órganos (metástasis)

El proceso por el que una célula normal se convierte en una célula tumoral se denomina carcinogénesis y su desarrollo está asociado a dos grandes grupos de genes: los oncogenes y los genes supresores de tumores (**Croce**, 2008). Los primeros son genes que promueven el crecimiento celular y la mitosis, mientras que los genes supresores de tumores son los encargados de mantener controlado el crecimiento celular y la reparación del daño al ADN. Típicamente se requiere una serie de varias mutaciones afectando estos genes antes de que una célula normal pueda transformarse en una célula cancerosa (**Cho y Clarke**, 2008).

Cuando una célula normal es expuesta a un agente mutagénico que le ocasiona cambios en genes clave del control del ciclo celular, comienza una proliferación descontrolada. La



acumulación de mutaciones da origen a una lesión pre-neoplásica, que puede o no evolucionar a un tumor maligno. Si las mutaciones ocasionan una supresión de genes reparadores de daño, de genes supresores tumorales y/o la activación de proto-oncogenes, las células seguirán creciendo y diferenciándose hasta que dejen de cumplir las funciones normales del tejido a partir de donde se originaron. Se han identificado diferentes genes clave en el proceso de carcinogénesis. Los proto-oncogenes de la familia Ras (la cual comprende al H-Ras, N-Ras y K-Ras) son muy comunes, siendo encontradas entre el 20 al 30% de todos los tumores humanos. En el caso de los genes supresores tumorales el más estudiado es el gen que codifica para la proteína p53. La proteína p53 tiene dos funciones principales: por un lado, cumple un rol en el núcleo celular como factor de transcripción, y por otro lado cumple una función citoplasmática regulando el ciclo y división celulares y la apoptosis. Más de la mitad de los cánceres humanos están asociados a mutaciones en el gen p53, y se considera que, para algunos tipos de cáncer, como el de colon, esta mutación es la que finalmente ocasiona que una célula se transforme definitivamente en célula tumoral. (**Zing et al.**, 1999; **Croce**, 2008)

Una característica importante de los tumores malignos es la angiogénesis. Esto le permite al nuevo tumor seguir creciendo e invadir los tejidos sanos. Cuando los tumores alcanzan los vasos sanguíneos o del sistema linfático, es común que se desprendan células tumorales que viajen por el sistema circulatorio a diferentes partes del cuerpo, lo que ocasiona las metástasis (**Carmeliet y Jain**, 2000).

Los diversos tipos de cáncer tiene un origen multifactorial (**Irigaray et al.**, 2007). Entre un 90 y un 95% de los casos la enfermedad es causada por factores ambientales que producen mutaciones en el ADN. Estos factores de riesgo incluyen el tabaquismo (relacionado con el 80 al 90% de los casos de cáncer de pulmón, por ejemplo), la obesidad, el alcoholismo, la exposición a radiación, el estrés, enfermedades infecciosas y exposición a contaminantes ambientales. El resto (10-15%) tienen asociada una causa estrictamente genética (y generalmente hereditaria) (**Roukos**, 2009; **OMS** 2015).

El cáncer es considerado el mayor problema de salud mundial. En los países desarrollados, representa la segunda causa de muerte solo detrás de las enfermedades cardiovasculares (**Siegel et al.**, 2018). En 2015, se diagnosticaron en el mundo 14.1 millones de casos de cáncer y 8.8 millones de muertes por la enfermedad. El cáncer de pulmón es el más común (13.0%) seguido del cáncer de mama (11.9%) y el cáncer colorrectal (9.7%). La mayor tasa de



mortalidad en mujeres corresponde al de mama (14.7%) y en hombres al de pulmón (23.6%) (Forouzaunfar *et al.*, 2016). En México el cáncer es la segunda causa de muerte más importante. El INEGI, en el 2010, reportó más de 74,000 muertes por cáncer anualmente (13% total de las muertes) de las cuales el 5,2% son debido al cáncer colorrectal (CCR) (Aldaco, 2012).

1.2 El cáncer colorrectal

Dentro de los diversos tipos de cáncer, destaca el cáncer de colon y recto (CCR) como uno de los uno de los más frecuentes (la tercera en la población mundial) y supone casi el 15% de todos los nuevos cánceres. Anualmente causa la muerte de 694 000 personas lo que significa la 4ª causa a nivel mundial, principalmente en países desarrollados (Luk, 1993; OMS 2015)

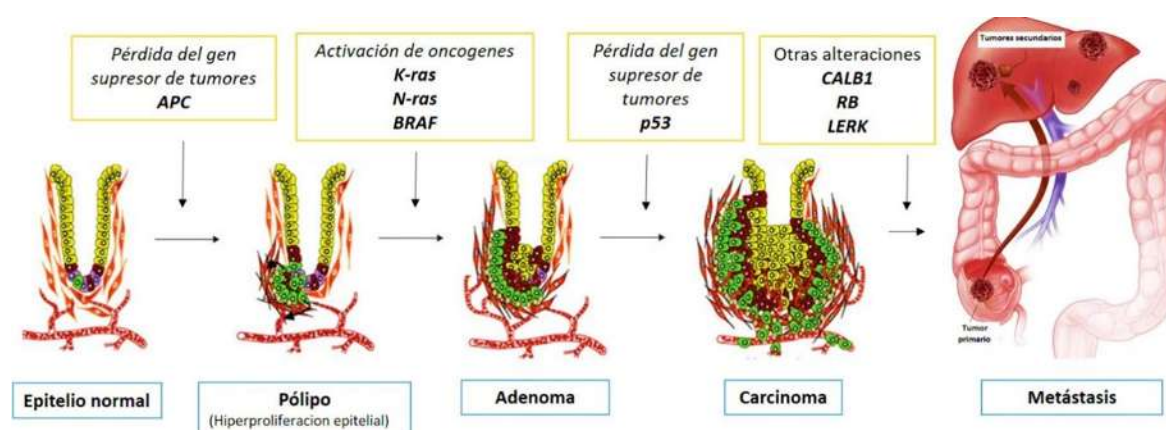


Fig. 1 Desarrollo del cáncer colorrectal y su base genética. La pérdida de la función del gen supresor de tumores APC promueve la división celular. Sucesivas mutaciones acumuladas promueven la activación de oncogenes (familia Ras y BRAF) formándose un tumor benigno o adenoma. La pérdida de la función del gen p53 que regula el ciclo celular da finalmente lugar a la transformación en un tumor maligno o carcinoma. Mutaciones adicionales pueden promover la diseminación a otros tejidos a través del sistema circulatorio formándose tumores secundarios o metástasis (Modificado de Vogelstein 1993 y Korcaya y Wicha, 2010)

El cáncer colorrectal se origina por una secuencia de eventos que comienza con la mucosa normal, continúa a través del desarrollo de pólipos adenomatosos y culmina en metástasis



(Ricciardiello *et. al.*, 2011). En las células del colon, la carcinogénesis inicia tras la acumulación de una serie de mutaciones o daño en el ADN que llevan a la pérdida o inactivación del gen APC, un gen que codifica para una proteína de supresión tumoral (Fig. 1). Este se considera clave en la carcinogénesis colónica debido a que entre un 80 y 90% de los casos de cáncer de colon se asocian con esta causa. Se inicia la formación de un adenoma y durante su desarrollo se producen mutaciones en diversos genes como los denominados protooncogenes (incluyendo los de la familia RAS y COX) a la par que aumenta el grado de displasia. Finalmente, la pérdida de la función del gen p53 (que media funciones como inducción de apoptosis) es lo que se piensa convierte un adenoma en un carcinoma (Piña, 2007; Juárez y Rosales, 2014). Por otro lado, la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) también está implicada en el desarrollo tumoral, pues las reacciones de los radicales libres y el ADN resultan en rupturas de la cadena, en la formación de bases oxidadas, así como en varias mutaciones (Corpet *et al.*, 2002).

La mayor parte de los casos ocurren de manera espontánea y únicamente se considera que el 20% se atribuyen a una causa genética heredable (OMS, 2015). Los mecanismos genéticos de carcinogénesis colónica han sido ampliamente estudiados y son diferentes en los casos espontáneos que en los hereditarios. Begleiter *et al.*, en el 2003, estimaron que hasta el 90% de los casos de CCR podrían prevenirse con cambios en la dieta y los hábitos de vida.

Según la **Organización Mundial de la Salud** (2015) entre los factores de riesgo que se asocian a la aparición de la enfermedad destacan:

- Antecedentes familiares de cáncer de colon, adenomatosis o la enfermedad de Crohn.
- Tener más de 50 años
- Los hábitos alimentarios que incluyen una baja ingesta de fibra, un pobre consumo de frutas y vegetales, un alto consumo de proteínas de origen animal y grasas
- Obesidad y un estilo de vida sedentario.
- Alcoholismo y tabaquismo.

A diferencia de otros tipos de cáncer, el sexo no es un factor de riesgo pues la incidencia es similar en hombres y mujeres (Martin-Cano, 2011).

El tratamiento a seguir para pacientes con CCR incluye cirugía para extirpar los tumores localizados, frecuentemente seguida de quimioterapia (solo se excluyen de quimioterapia los



pacientes con cáncer en etapa inicial o I). Los principales agentes quimioterapéuticos usados contra el CCR son la capecitabina, fluorouracilo, irinotecán, oxaliplatino y el UFT (Tegafur/uracilo). La radioterapia también es frecuentemente utilizada junto con la quimioterapia (**Kelly**, 2007; **Marin-Cano**, 2011).

La principal desventaja de los agentes quimioterapéuticos son los efectos adversos que incluyen náuseas, mareos, alopecia, malestar general, fatiga y supresión del sistema inmunológico (**Lotfi-Jam et al.**, 2011). El alto costo de los tratamientos contra el cáncer también es un grave problema de salud pública (**Hasset et al.**, 2006)

A pesar de los avances médicos, el cáncer de colon todavía ocupa el segundo lugar mundial entre las causas de muerte por cáncer (independientemente del sexo). Esta gran tasa de mortalidad es debido a que la mayor parte de los diagnósticos se da en estadíos avanzados de la enfermedad. La sobrevivencia promedio de un paciente con CCR no suele superar los 5 años (**Martin-Cano**, 2011). Por este motivo, la búsqueda de estrategias de prevención de este tipo de cáncer es de especial interés en la investigación (**Piña**, 2007).

Los modelos biológicos de estudio de CCR juegan un papel muy importante en la investigación para la prevención, el tratamiento y la cura de esta enfermedad. Los modelos animales, principalmente roedores, son los más apropiados para su estudio debido a la disponibilidad y los bajos costos que acarrearán (**King et al.**, 1959).

Existen diversas sustancias utilizadas para la inducción de cáncer colorrectal en animales. Las hidracinas y los compuestos azoxi son los más comunes, destacando la 1,2-dimetilhidracina (DMH) y su metabolito el azoximetano (AOM) (**Corpet y Tarché**, 2002). Independiente de la ruta de administración, se ha informado que la DMH produce una alta incidencia de adenomas y adenocarcinomas en el colon y recto de roedores debido a su actividad alquilante de los ácidos nucleicos del epitelio intestinal y sus propiedades mutagénicas. Este carcinógeno actúa modificando el genoma del enterocito ocasionando alteraciones como la pérdida de diferenciación celular, ganancia de invasividad y conducta proliferativa anormal (**Lodish et al.**, 2003). Su alta especificidad para producir carcinomas en el colon y recto, lo hace ideal para implementarlo en modelos que busquen estrategias de quimioprevención de CCR (Fig. 2).



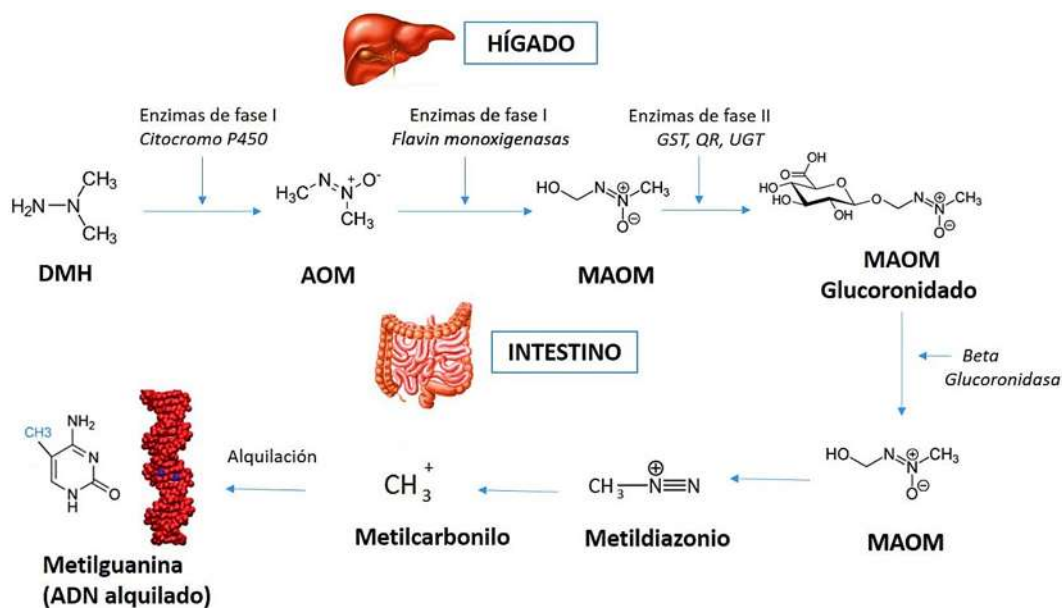


Fig. 2 El metabolismo de la 1,2 dimetilhidrazina (DMH). El DMH es oxidado en el hígado por las enzimas de fase I a azoximetano (AOM) y posteriormente a metilazoximetanol (MAOM). Este compuesto es glucoronidado por las enzimas de fase II y posteriormente es excretado a través de la bilis. En el intestino, en presencia de beta-glucuronidasa de los colonocitos o la microbiota es nuevamente transformado a MAOM que puede espontáneamente convertirse en metildiazonio, considerado el carcinogénico final, pues debido a que es capaz de alquilar las bases nitrogenadas

1.3 Quimiopreención del cáncer

La quimiopreención un proceso que implica la prevención, la demora o la reversión del proceso de carcinogénesis mediante la ingestión de agentes dietéticos o farmacéuticos (Cuendet *et al.*, 2006).

Los grandes avances en la investigación sobre los factores celulares y moleculares implicados en la carcinogénesis nos proporcionan una base para buscar nuevas estrategias en la prevención de esta enfermedad. (Kensler, 1997). Una estrategia de este tipo implica la supresión de la activación metabólica cancerígena o el bloqueo de la formación de carcinógenos vía inducción de enzimas de fase II o antioxidantes (Cuendet *et al.*, 2006). Los compuestos químicos que aumentan la actividad de estas enzimas son de particular interés debido a que estos sistemas enzimáticos tienen la capacidad de inhibir un amplio rango de compuestos carcinogénicos (Fig. 3) (Wattenberg, 1985).

De acuerdo a Wattenberg (1985), los compuestos quimioprotectores pueden agruparse en tres categorías, de acuerdo a su mecanismo de acción: compuestos que previenen la



formación de carcinógenos, compuestos que bloquean la acción de carcinógenos y agentes que suprimen la carcinogénesis una vez que ésta ha comenzado.

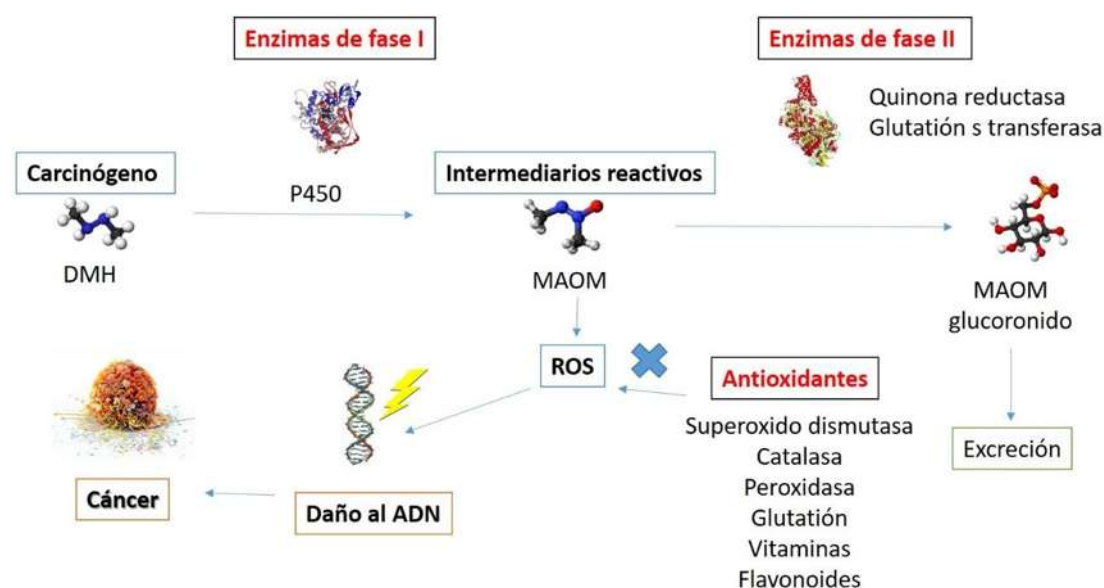
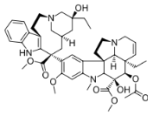
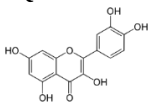
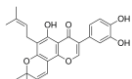
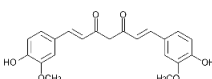
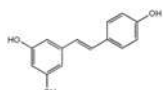
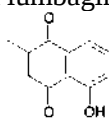


Fig. 3 Mecanismo de quimioprevención de los sistemas enzimáticos de fase II y antioxidantes tomando como ejemplo el metabolismo de la 1,2 dimetilhidrazina (DMH). Las enzimas de fase I como la citocromo P450 actúan activando compuestos cancerígenos. Los metabolitos intermediarios reactivos son posteriormente inactivados por las enzimas de fase II para su posterior eliminación, sin embargo en el proceso estos compuestos reactivos pueden originar radicales libres, que en exceso son capaces de producir daño al ADN y ocasionar a la larga un cáncer. Los mecanismos de defensa antioxidante previenen el daño por los radicales libres. En este grupo se encuentran enzimas antioxidantes, glutatión y compuestos provenientes de la dieta.

Los compuestos antitumorales intervienen directamente en el desarrollo de procesos carcinogénicos a través de mecanismos como la inducción de apoptosis, interrumpiendo el ciclo celular, modulando la actividad hormonal y la expresión o supresión de genes. Muchos anticancerígenos usados en el tratamiento quimioterapéutico contra el cáncer fueron aislados inicialmente de extractos de plantas (Tabla 1) (Chiao *et al.*, 2002; Piña, 2007).



Tabla 1. Algunos compuestos químicos aislados de plantas que presentan actividades anticancerígenas.

COMPUESTO	ORIGEN VEGETAL	ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA
Vinblastina 	<i>Catharanthus roseus</i> 	Inhibición del ciclo celular por su unión con la tubulina. Usada en el tratamiento de leucemias, linfomas y cáncer de pulmón (Newman <i>et al.</i>, 2000)
Quercetina 	<i>Allium cepa</i> 	Modulación del estrés oxidativo y vías de señalización implicadas en el crecimiento y diferenciación celular (Dajas, 2012) Inducción de apoptosis en líneas de cáncer de colon (Park <i>et al.</i>, 2006)
Pomiferina 	<i>Maclura pomifera</i> 	Inhibición de daño al ADN por estrés oxidativo (Svasti, <i>et al.</i>, 2015) Inhibición del crecimiento de células tumorales de colon, mama y estómago (Son <i>et al.</i>, 2007)
Curcumina 	<i>Curcuma longa</i> 	Inducción de apoptosis celular (Karunagaran <i>et al.</i>, 2005) Inhibición de la inflamación en procesos cancerígenos (Pandey <i>et al.</i>, 2011) Modulación de enzimas detoxificantes (Seo <i>et al.</i>, 2008)
Resveratrol 	<i>Vitis vinífera</i> 	Quimiopreención y protección contra la progresión del cáncer (Kalra <i>et al.</i>, 2008) Modulador de procesos inflamatorios (Carter <i>et al.</i>, 2009) Inducción de apoptosis celular (Roy <i>et al.</i>, 2009) Efecto antiproliferativo de cáncer colorrectal (Patel <i>et al.</i>, 2010)
Limoneno 	<i>Citrus sp.</i> 	Inducción de apoptosis y necrosis de células tumorales (Russo <i>et al.</i>, 2013) Inhibición de carcinógenos gástricos en ratas (Uedo <i>et al.</i>, 1999)
Plumbagina 	<i>Plumbago sp.</i> 	Efecto antiproliferativo en células de cáncer de mama (Zhang <i>et al.</i>, 2016) Inducción de apoptosis celular en células de cáncer colorrectal (Eldhose <i>et al.</i>, 2014)



1.4 *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels

El género *Callistemon* pertenece a la familia de las Mirtáceas (Myrtaceae) y es el género de plantas ornamentales más importantes de Australia. La planta más cultivada del género es *C. citrinus* (Álvarez et al., 2011).

Callistemon citrinus es conocido con el nombre común de árbol del cepillo o escobillón rojo (Crimson Bottlebrush, en inglés) (Fig. 4). Es un arbusto o árbol pequeño de 2-6 metros de altura. Las hojas son lanceoladas y coriáceas, las inflorescencias tienen forma de espiga abiertas y miden entre 6 y 12 cm de largo. Las flores son pequeñas, con 5 pétalos y 5 sépalos. Los sépalos algo rosados y los pétalos verdosos, con pelos en los bordes. Los estambres son numerosos, exsertos, con los filamentos largo y de color rojo brillante o rosado. El fruto es una cápsula leñosa. Es endémico de Australia, pero se cultiva en las regiones templadas y tropicales de todo el mundo (Greig, 1999; Montaña-Ñeco, 2011; Australian National Botanic Gardens, 2012).

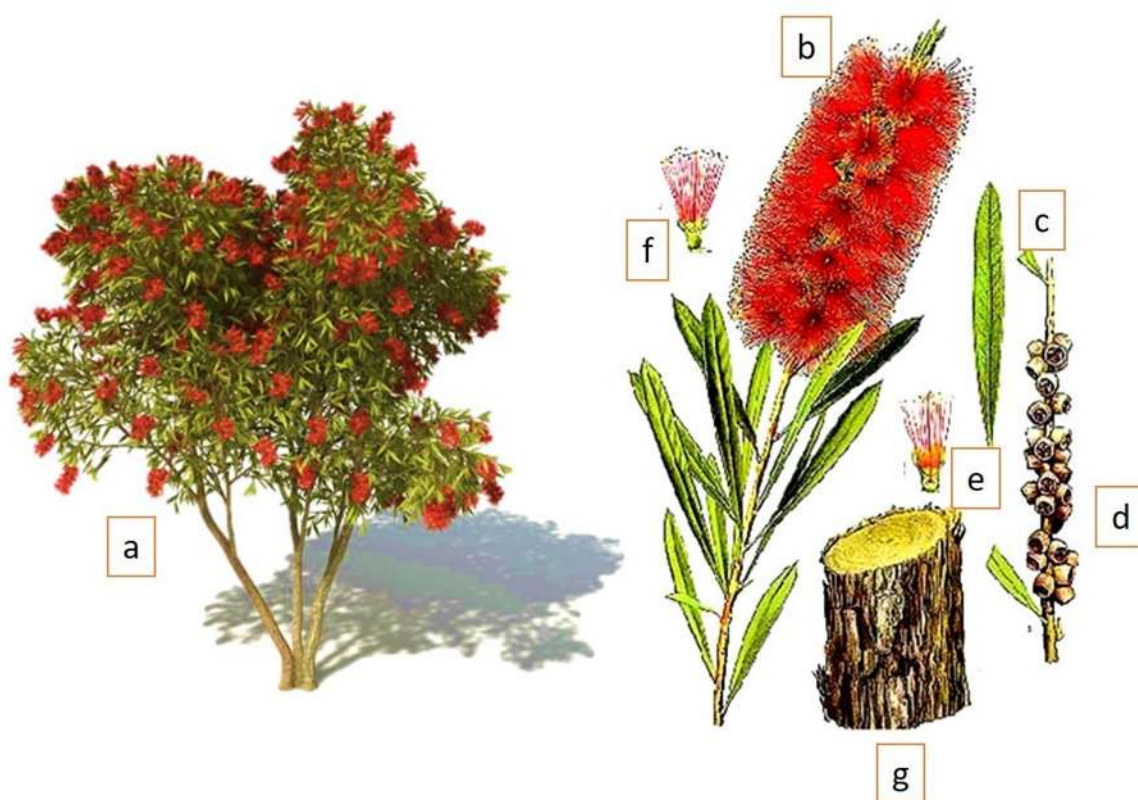


Fig. 4 *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels: a) porte; b) detalle de la inflorescencia; c) detalle de una hoja; d) frutos; e) flor vista transversalmente; f) detalle de una flor individual; g) detalle del tronco (Ilustración original de Edward Minchen, 1895)



1.4.1 Usos, atribuciones y composición química

Las flores de *Callistemon* son usadas como alimento por los aborígenes australianos, siendo masticadas para obtener el néctar o preparadas como bebidas dulces. También han jugado un importante papel como plantas medicinales para los pueblos originarios australianos. Las hojas, por ejemplo, eran usadas para curar infecciones del tracto respiratorio (**Cock**, 2008)

En la actualidad las especies del género *Callistemon* son utilizadas para la silvicultura, producción de aceites esenciales, como barrera contra vientos, para recuperación de tierras degradadas y en la horticultura ornamental. En China, especies del género, especialmente *C. viminalis* se usan en la medicina tradicional para el tratamiento de algunas afecciones como hemorroides (**Oyedeji et al.**, 1990). También se usan especies de *Callistemon* como insecticida, para controlar malezas y como bioindicadores de daño ambiental (**Rashedul et al.**, 2010). En países del sur de Asia, como la India y Bangladesh se le atribuyen varias propiedades medicinales, entre ellas el tratamiento para la diabetes (**Kumar et al.**, 2011). Además han sido reportadas actividades antimicrobiana, antiestafilococal, nematocida, larvicida y pupicida para el género (**Oyedeji et al.**, 2009).

Fitoquímicamente, el género *Callistemon* es rico en triterpenoides, flavonoides, esteroides y saponinas (**Gayali et al.**, 2012). Las investigaciones fitoquímicas de miembros de este género dieron como resultado la identificación de C- metil flavonoides, triterpenos y derivados del fluoroglucinol (**Wrigley y Fagg**, 1993).

Han sido reportados diversos estudios químicos del aceite esencial de *Callistemon citrinus*. El 1,8-cineol (eucaliptol) es el constituyente predominante de los aceites (47.9 – 82.0%). Otros compuestos significativos incluyen el α -pineno, β -pineno, mirceno, limoneno, linalol y geraniol (**Oyedeji et al.**, 2009), además han sido reportada la presencia de triterpenoides, flavonoides, ácidos grasos y taninos aislados en las hojas (**Jeong et al.**, 2009) así como glicosidos y fenoles, mientras que los alcaloides se encuentran ausentes (**Faris et al.**, 2011).

Los monoterpenos, como el eucaliptol (1,8-cineol), el linalool y sus ésteres poseen actividad anti-inflamatoria (**Dewherts**, 1980), el limoneno es conocido por inhibir el crecimiento de carcinomas de hígado, las mamas, la piel, los pulmones, el colon, el estómago, la próstata y el páncreas (**Crowell**, 1999), el fitol ha sido reportado con una alta capacidad antimicrobiana (**Inoue et al.**, 2005) y el 4-terpineol es usado como precursor en la preparación de repelentes contra mosquitos de baja toxicidad para los seres humanos (**Wang et al.**, 2008)



Además de los terpenos, muchos de los flavonoides, taninos y compuestos fenólicos aislados de *C. citrinus* muestran varios tipos de actividades biológicas importantes tales como atrapadores de radicales libres, bloqueo de los canales de calcio, actividad antimicrobiana, antifúngica, antidiabética, anticoagulante y herbicida (Das y Singh, 2012).

1.4.2 Estudios de *C. citrinus* que crece en México

Los estudios realizados hasta la fecha por nuestro grupo de trabajo incluyen la actividad antimicrobiana de hojas y flores (Montaño-Ñeco, 2011), la composición química (Petronhilo *et al.*, 2013), la purificación de los compuestos activos y citotoxicidad en *Artemia salina* (Guzmán-Hernández, 2013), sus propiedades antioxidantes *in vitro* (Cid-Estrada, 2014) y su micropropagación (Ramírez-Cervantes, 2015). López-Mejía (2015) realizó estudios de toxicidad aguda y subaguda de los extractos de hoja y flor de *C. citrinus*, encontrando que ambos extractos no presentan toxicidad alguna a la dosis de 1000 mg/kg, y también reporta un efecto hepatoprotector ante daño producido por sobredosis de paracetamol. Finalmente, Pérez-Mora (2016), realizó estudios de las capacidades atrapadora de radicales libres y el efecto de los extractos etanólicos de hojas y flores en el sistema de defensa antioxidante en hígado de ratas. Ambos extractos disminuyeron la lipoperoxidación comparados con el grupo control y no tuvieron un efecto negativo en la actividad de enzimas antioxidantes

A pesar del alto contenido de compuestos bioactivos y de las múltiples actividades farmacológicas que se le atribuye, hasta la fecha no hay estudios dirigidos a estudiar el efecto *in vivo* de los extractos de *Callistemon citrinus* en modelos de cáncer, donde podría tener un efecto protector debido a la alta capacidad antioxidante que presenta y los compuestos con propiedades anticancerígenas que contiene.



2. JUSTIFICACIÓN

La prevalencia del cáncer colorrectal como uno de los más comunes a nivel mundial, el alto costo asociado a los tratamientos y la baja tasa de curación total una vez diagnosticada la enfermedad lo hacen un grave problema de salud pública, por lo que la prevención se ha convertido en la principal herramienta para atacar el CCR.

La búsqueda constante de plantas que presenten compuestos con actividades biológicas que promuevan la quimioprevención del cáncer ocupa un lugar destacado en la investigación contra el cáncer. *Callistemon citrinus* es una planta que posee un fuerte poder antioxidante y otras propiedades biológicas debido a la presencia de terpenos, fenoles y flavonoides, lo que la convierte en un excelente candidato para determinar su posible actividad quimioprotectora en un modelo de cáncer de colon inducido.



3. HIPÓTESIS

Los extractos de hojas y flores de *Callistemon citrinus* tienen compuesto bioactivos capaces de ejercer funciones quimioprotectoras vía inducción de enzimas antioxidantes y de fase II, en un modelo de carcinogénesis colónica experimental en ratas.



4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Determinar el efecto quimioprotector del extracto de *Callistemon citrinus* en un modelo de cáncer de colon en ratas

4.2. Objetivos particulares

1. Caracterizar químicamente y evaluar el potencial antioxidante *in vitro* de los extractos de hojas y flores de *C. citrinus*.
2. Evaluar el efecto de administración de los extractos de la hoja y de la flor de *C. citrinus* en el desarrollo del cáncer de colon inducido en ratas.
3. Determinar el efecto de los extractos de *C. citrinus* en la actividad de enzimas antioxidantes y de fase II relacionadas con la quimioprevención del cáncer.



5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para cumplir con los objetivos de la presente investigación la estrategia experimental consistió en tres partes. La primera parte fue la preparación y el análisis fitoquímico y de la capacidad antioxidante de los extractos de hojas y flores de *Callistemon citrinus*. Posteriormente, se implementó el modelo de carcinogénesis colónica experimental, donde se administraron a la par los extractos de *C. citrinus* durante las 22 semanas del experimento. Finalmente se llevaron a cabo las determinaciones de las actividades enzimáticas en los diferentes tejidos de interés. La metodología completa se resume en la figura 5.

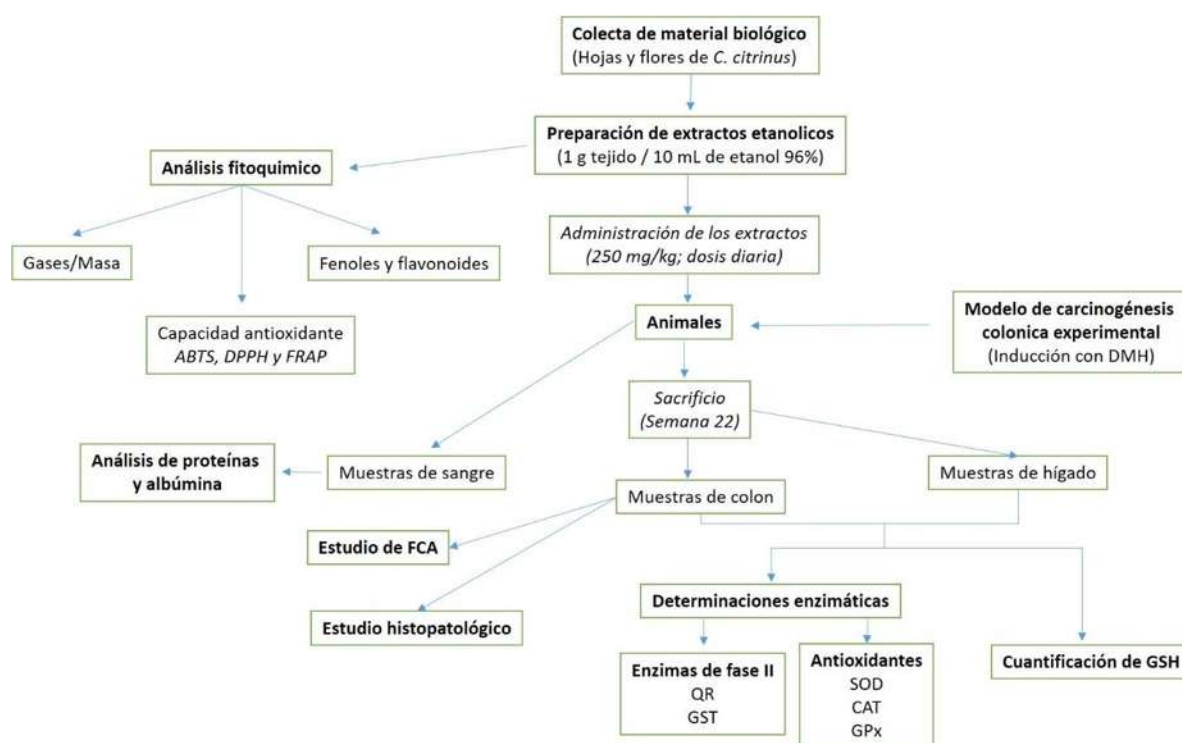


Fig. 5 Estrategia experimental establecida para cumplir con los objetivos de la presente investigación.



6. RESULTADOS

6.1. Capítulo I

Caracterización fitoquímica, determinación de la capacidad antioxidante *in vitro* e identificación de compuestos con propiedades anticancerígenas en los extractos de *Callistemon citrinus*.

RESUMEN

Se analizó la composición química y la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos de hojas y flores de *Callistemon citrinus* que crece en México. El análisis de gases/masa de los extractos arrojó la presencia de 20 compuestos, la mayoría de monoterpenos y diterpenos. Se identificó un nuevo compuesto, la 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piranona (DDMP) no reportado en la literatura para *C. citrinus* y presente en ambos extractos. En los extractos de flores los compuestos mayoritarios fueron el DDMP (4.4%), el limoneno (3.3%) y el eucaliptol (2.4%) mientras que en el extracto de hojas fueron el eucaliptol (7.5%), el fitol (4.8%) y el terpinoleno (1.5%). Fenoles y flavonoides fueron cuantificados colorimétricamente. Las flores y las hojas presentaron un contenido de fenoles de 1.01 y de 0.66 mg equivalentes de ácido gálico/mg de extracto respectivamente, mientras que el contenido de flavonoides fue de 0.01 y 0.6 mg equivalentes de rutina/mg de extracto, respectivamente. La capacidad antioxidante fue determinada *in vitro* por los métodos ABTS, DPPH y FRAP. Las flores presentaron una mayor actividad antioxidante que las hojas.

Palabras clave: *Callistemon citrinus*; terpenos; fenoles y flavonoides; capacidad antioxidante

ABSTRACT

The chemical composition and antioxidant activity of the ethanolic extracts of *Callistemon citrinus* leaves and flowers that grows in Mexico were analyzed by GC/MS and colorimetric methods. The analysis of the extracts showed the presence of 20 compounds, mainly monoterpenes and diterpenes. A new compound, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyranone (DDMP) was not reported in the literature for *C. citrinus* and its present in both extracts. In flower extracts, the main compounds were DDMP (4.4%), limonene (3.3%) and eucalyptol (2.4%) while in the leaves extract were eucalyptol (7.5%), phytol (4.8%) and terpinolene (1.5%). The flowers and the leaves had a content of phenols of 1.01 and 0.66 mg equivalents of gallic acid / mg of extract, respectively, while the content of flavonoids was 0.01 and 0.6 mg of rutin equivalents / mg of extract, respectively. The antioxidant capacity



was determined *in vitro* by the ABTS, DPPH and FRAP methods. The flowers presented a higher antioxidant activity than the leaves.

Keywords: *Callistemon citrinus*; terpenoids, phenolic and flavonoids; antioxidant activity

INTRODUCCIÓN

Las plantas son una importante fuente de compuestos de interés farmacológico. En la actualidad, el 80% de la población mundial usa predominantemente plantas o sus derivados para el cuidado de su salud (**Jennifer et al.**, 2007). Los principales grupos de compuestos con propiedades medicinales incluyen terpenos, compuestos fenólicos (destacando en este grupo los flavonoides y los ácidos fenólicos) y los alcaloides (**Kinghorn et al.**, 2003)

Por otro lado, se sabe que el exceso de radicales libres tiene efectos nocivos sobre las células. Las enfermedades crónico degenerativas (incluyendo enfermedades cardiovasculares, diabetes y cáncer, por ejemplo), son padecimientos comunes y complicados en humanos y están relacionadas directa o indirectamente con el desbalance del equilibrio oxidativo (**Das et al.**, 2014).

En este sentido, es ampliamente conocido el papel que juegan los antioxidantes naturales (como vitaminas, fenoles y flavonoides) en la protección frente al daño por estrés oxidativo en las enfermedades crónicas. Estos compuestos actúan directamente neutralizando los radicales libres o indirectamente, aumentando la actividad de los sistemas enzimáticos de defensa endógenos (**Piña**, 2007).

Se han identificado diversos compuestos con propiedades antitumorales provenientes de plantas que actúan a través de distintos mecanismos, incluyendo su intervención directa en el desarrollo de procesos carcinogénicos a través de mecanismos como la inducción de apoptosis, interrumpiendo el ciclo celular, modulando la actividad hormonal y la expresión o supresión de genes. (**Chiao et al.**, 2002; **Grenwell y Ragmal**; 2015)

Callistemon citrinus es una planta cultivada ampliamente como ornamental. Se ha reportado la presencia de terpenoides, fenoles y flavonoides. El 1-8 cineol (o eucaliptol) se reporta generalmente como el mayor constituyente de los aceites esenciales (**Oyedeji et al.**, 2009). A través de los años, *C. citrinus* ha sido extensamente analizado desde el punto de vista



farmacológico y se reporta que posee diversas propiedades tales como reductor de los niveles de colesterol (**Gupta y Gupta**, 1997) cicatrizante (**Kumar et al.**, 2007) actividad hepatoprotectora (**Jain et al.**, 2007), efecto cardioprotector (**Firoz**, 2011), actividad antiespasmódica (**Alí et al.**, 2011), actividad antiinflamatoria, antidiabética, hipolipémica y antioxidante (**Kumar et al.**, 2011). Todos estos estudios son indicadores del potencial alto de *C. citrinus* como buena fuente de compuestos bioactivos con múltiples propiedades medicinales (**Gayali**, 2012).

En el presente capítulo se detalla el estudio de la composición química (incluyendo análisis de gases/masa y técnicas colorimétricas) de los extractos de hojas y flores de *C. citrinus*, la identificación de los compuestos bioactivos con propiedades anticancerígenas y quimiopreventivas y el estudio de la capacidad antioxidante *in vitro* de ambos extractos con el objetivo de determinar si los extractos presentan características con potencial terapéutico para el cáncer de colon o de otros tipos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizaron hojas e inflorescencias de *C. citrinus*, las cuales fueron colectadas en el mes de marzo de 2016 en los jardines de Ciudad Universitaria (UMSNH) ubicada en Morelia, Michoacán, México (19°41'11.3" N, 101°12'18.4" O) La identificación de la planta fue confirmada por la M.C. Patricia Silva de herbario HEBUM de la Universidad Michoacana teniendo un número de voucher EBUM23538.

Preparación de los extractos etanólicos

Las hojas y las flores fueron separadas, limpiadas y pesadas en fresco para luego macerarse con etanol al 96% en una proporción 1:10 (1 gramo de peso por cada 10 mL de etanol). Se dejaron reposar en oscuridad a temperatura ambiente durante 5 días para que se llevara a cabo la liberación de sus componentes. Posteriormente, se llevaron a sequedad por evaporación con remoción al vacío en rotavapor a una temperatura de 45°C. y fueron conservados a una temperatura de 4°C protegidos de la luz hasta su posterior utilización.



Análisis fitoquímico: cromatografía de gases y espectrometría de masas

Los extractos etanólicos se analizaron por la técnica de cromatografía en gases y espectrometría de masas (GS/MS). El aparato utilizado fue un cromatógrafo de gases (Hewlett Packard GC modelo 5890, con una columna HP ultra-2; 25 m x 0.02 mm diámetro interno; 0.33 μm de grosor), acoplado a un espectrómetro de masas de baja resolución (Hewlett Packard modelo 5972 MSD). Los compuestos fueron determinados usando los estándares incluidos en el equipo y su concentración se expresó como porcentaje (%).

Determinación de los fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

Se utilizó el ensayo de Folin-Ciocalteu establecido por **Singleton et al.**, (1999). Esta determinación se basa en una reacción de oxidación de los fenoles presentes en una muestra que causa la aparición de una coloración azul que presenta un máximo de absorción a 765 nm y que se cuantifica por espectrofotometría en base a una recta patrón de ácido gálico (**Cid-Estrada**, 2014).

Siguiendo la metodología de **Pripdeevech et al.** (2010) a 200 μL de la solución problema se le añadió 1.0 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu (1:9), 1.0 mL de una solución acuosa de Na_2CO_3 7% y 5 mL de agua destilada. Se mezcló vigorosamente y se dejó reposar 30 min a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 765 nm. Para la curva patrón se utilizó ácido gálico en un rango de 0 a 0.5 mg/mL (Anexo 1).

Determinación del contenido de flavonoides

Los flavonoides fueron determinados colorimétricamente usando la técnica del cloruro de aluminio (AlCl_3), según **Chang et al.**, (2002), que se basa en que el Al^{3+} se une con los grupos ceto e hidroxilo de los flavonoides, a través de una reacción de transferencia de electrones produciendo un intenso color amarillo que tiene una absorbancia máxima de 415 nm.

A 500 μL de cada extracto se le añadió 1500 μL de etanol al 95%, 100 μL de AlCl_3 al 10%, 100 μL de acetato de potasio (1M) y 2800 μL de agua destilada. La mezcla fue agitada en vortex y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Se cuantificó la absorbancia a 415 nm. Se utilizó rutina para la curva estándar en un rango de 0 a 0.5 mg/mL (Anexo 2).



Determinación de la capacidad antioxidante *in vitro*

Método de ABTS.- Se llevó a cabo siguiendo la modificación de **Cid-Estrada** (2014) del original de **Rufino et al.**, (2010).

El radical catión $ABTS^{\cdot+}$ se originó utilizando cantidades 1 a 1 (v/v) del ácido 2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiazoline-6-sulfónico) en su presentación líquida de la marca Sigma y una solución de persulfato de potasio 2.4 mM. La mezcla se deja en agitación continua en oscuridad durante 3 horas, tiempo en el cual se obtiene una absorbancia de 3.0. De esta mezcla se hace una solución diluida en etanol que tenga una absorbancia final de 0.8. Esta solución es la que se usa para las determinaciones.

El ensayo consiste en coloca en una celda de 1 mL de capacidad 0.05 mL de muestra y 0.95 mL de la solución final de $ABTS^{\cdot+}$. Se mezcla y se cuantifica la absorbancia a 734 nm durante 7 minutos. Para la curva patrón se utilizó Trolox en un rango de 25 a 500 μ M (Anexo 3). Los resultados se expresaron como equivalentes de Trolox (TE) por mg de extracto.

Método de DPPH .- Siguiendo la metodología de **Karamác et al.** (2005) se utilizó el reactivo DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidracil) (500 μ M, disuelto en etanol) y una solución buffer (Tris-HCl a 0.1 M con un pH de 7.4). A 100 μ L de cada extracto se añadieron 500 μ L del reactivo DPPH y 400 μ L de la solución buffer. Se dejó reaccionar 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y se cuantificó la absorbancia de cada muestra a 517 nm. Para la curva patrón se utilizó el Trolox en un rango de 0 a 1000 μ M (Anexo 4).

Poder antioxidante de reducción férrica (FRAP).- Según la metodología establecida por **Benzie y Strain** (1996) se preparó la solución de trabajo en una relación 1:1:10 compuesta de las siguientes soluciones: 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) 10 mM, cloruro férrico ($FeCl_3$) a 20 mM y acetato de sodio 300 mM pH de 3.6. Para hacer la determinación se tomó 0.2 mL de la muestra problema (en este caso los extractos de *C. citrinus*) y se le añadieron 3 mL de la solución de trabajo dejando reaccionar 20 minutos en oscuridad para después tomar lecturas a 593 nm en el espectrofotómetro. Para la curva patrón se utilizó Trolox en un rango de 100 – 1000 μ M.



Análisis estadístico

Los datos numéricos obtenidos fueron analizados y procesados utilizando el programa de Microsoft Excel 2016 y el programa Graph Pad Prism 6.0 para Windows. Fueron comparados mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), así como las pruebas de comparación múltiple de Tukey, considerando tres niveles de significancia: * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$ y *** $P \leq 0.001$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contenido e identificación de compuestos terpénicos en *C. citrinus*

Se identificaron veinte compuestos en los extractos etanólicos de flores y hojas de *C. citrinus*: diez monoterpenos, ocho sesquiterpenos, un diterpeno y una piranona (Tabla 2). Este último compuesto, el 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona (abreviado como DDMP) se encuentra tanto en el extracto de hojas como en el de flores y no había sido reportado previamente para *C. citrinus* en la literatura.

En el extracto de flores se identificaron 18 compuestos mientras que en el de hojas se determinaron 12. Solamente 10 compuestos son comunes en ambos extractos (Tabla 2).

En el extracto de flores, los compuestos mayoritarios fueron el DDMP (4.4%), el limoneno (3.3%) y el eucaliptol (2.4%) mientras que en el extracto de hojas fueron el eucaliptol (7.5%), el fitol (4.8%) y el terpinoleno (1.5%).



Tabla 2. Composición química de los extractos de flores y hojas de *Callistemon citrinus* medida por GS/MS.

TR	Compuesto	Concentración (%)	
		Flores	Hojas
	<i>Monoterpenos</i>		
13.8	β -Felandreno	0.4	0.3
14.2	α -Terpineno	0.8	0.6
14.6	d-Limoneno	3.3	0.0
14.7	Eucaliptol	2.4	7.5
16.5	Terpinoleno	0.0	1.5
19.1	4-Terpineolo	0.2	0.7
19.4	α -Terpineolo	1.8	1.2
23.4	cis-p-Mentha-2,8-dien-1-ol	0.4	0.8
24.1	Elixeno	0.3	0.0
24.6	Geraniol	0.2	0.0
	<i>Sesquiterpenos</i>		
26.4	Cariofileno	0.8	0.9
26.9	Valenceno	0.5	1.2
27.2	α -Humuleno	0.2	0.0
27.4	Aromadendreno	0.3	0.5
27.6	δ -Cadineno	0.2	0.0
30.0	Espatulanol	0.5	0.0
31.2	Cubenol	0.3	0.0
31.3	Globulol	0.4	0.0
	<i>Otros</i>		
17.7	2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona	4.4	1.4
40.9	Fitol	0.0	4.8
La concentración de cada compuesto fue calculada dividiendo el área del pico del analito por el área total. TR = tiempo de retención del compuesto.			

Han sido reportados diversos estudios químicos del aceite esencial de *Callistemon citrinus*. El 1,8-cineol (eucaliptol) es el constituyente predominante de los aceites (47.9 – 82.0%). Otros compuestos significativos reportados incluyen el α -pineno, β -pineno, mirceno, limoneno, linalol y geraniol (Oyedeji *et al.*, 2009). Además, ha sido reportada la presencia de triterpenoides, flavonoides, ácidos grasos y taninos aislados en las hojas (Jeong *et al.*, 2009) así como glucósidos y fenoles, mientras que los alcaloides se encuentran ausentes (Faris *et al.*, 2011). Pese a que todos coinciden en que la planta es muy rica en terpenos, la concentración de éstos es altamente variable. Esta variabilidad, como sucede con el resto de los metabolitos secundarios está influenciada por la estacionalidad, la latitud y el ambiente (López-Mejía, 2015).



Montaño-Ñeco (2011) realizó el primer estudio en México sobre *Callistemon citrinus*, un análisis químico del extracto etanólico de hojas y flores de dos edades fisiológicas (4 y 10 años). El análisis de GM/MS mostró que los extractos de hoja y flores de una planta de 10 años tienen 32 compuestos de los cuales comparten 18, siendo los más abundantes en ambos extractos el felandreno, el limoneno, el eucaliptol, el α -terpinol y el mentol. En el caso del extracto de planta de años de edad presentó 48 compuestos, de los cuales sólo 10 son comunes con los encontrados en el extracto de hojas de una planta de 10 años. El extracto de las flores de una planta de 4 años, contiene 19 compuestos y solamente 7 son comunes.

Las plantas de cuatro años que estudio **Montaño-Ñeco**, son las mismas que se utilizaron para la obtención de los extractos del presente estudio (las plantas ahora tienen 10 años de edad). En nuestro estudio, solo el eucaliptol y el limoneno se mantienen como compuestos terpenicos mayoritarios comparados con los que encontró **Montaño-Ñeco** (2011) y corresponden a los que reportan en la literatura más abundantes para *Callistemon citrinus*. También se encontró un menor número de compuestos. Esto corrobora que la producción de los metabolitos secundarios también variable en función de la edad, y en el caso de nuestra planta de estudio, disminuye con el tiempo.

Los compuestos terpénicos que presentan los extractos de *C. citrinus* presentan muchas actividades biológicas reportadas en la literatura, destacando la actividad anticancerígena de varios de los compuestos (**Petronilho et al.**, 2013).

Fischer y Dethlefsen (2013), probaron las propiedades biológicas del eucaliptol, destacando su actividad broncodilatadora, mucolítica y antiinflamatoria. Más recientemente, en 2017, **Samphat et al.**, reportaron la actividad anticancerígena *in vitro* del 1,8-cineol extraído de *C. citrinus* en tres líneas celulares: Los resultados de este estudio sugieren que este compuesto muestra un importante potencial anticancerígeno de manera dosis-dependiente y que la inducción de muerte celular está dada a través de apoptosis mediada por ROS a dosis de 50 $\mu\text{g/mL}$.

El d-limoneno, es (después del eucaliptol) el siguiente monoterpeno más abundante reportado en los aceites esenciales de *C. citrinus* y existen diversos reportes sobre su actividad anticancerígena *in vitro* en *in vivo*. Hay una amplia evidencia probada en modelos animales de que este compuesto, cuando se ingiere, exhibe un amplio espectro de actividades biológicas que incluye efectos quimioterapéuticos y quimiopreventivos. Y aunque los



mecanismos exactos de acción *in vivo* del d-limoneno no están claros, la inmunomodulación y los efectos antiproliferativos son los que se informan comúnmente (Miller *et al.*, 2010).

Otros compuestos para los que se han reportado actividades anticancerígenas son el fitol (Sheja *et al.*, 2016), el DDMP (Ban *et al.*, 2007) y el terpinoleno (Aydin *et al.*, 2013).

Contenido de fenoles totales y flavonoides

Se encontró la presencia de compuestos fenólicos tanto en hojas como en flores de *Callistemon citrinus*. El contenido de fenoles totales arrojó como resultado una concentración más alta (aproximadamente 40% más, casi el doble) en las flores que en las hojas con 391.25 ± 48 y 254.02 ± 17.8 miligramos equivalentes de ácido gálico (GAE)/mL respectivamente (Fig. 6). Cid-Estrada (2014) fue el primero en determinar la presencia de compuestos fenólicos en *C. citrinus* cultivado en México reportando un contenido de 502 y de 251 GAE/mL para los extractos de flores y hojas, respectivamente. En este caso, el contenido de fenólicos fue el doble en flores que en las hojas. Pérez-González (2016) encontró una proporción similar con un 50% más de fenólicos en hojas que en flores.

Los resultados del presente estudio son muy similares y concuerdan a los reportados previamente para extractos etanólicos de *C. citrinus* de México donde las flores presentan una mayor proporción de compuestos fenólicos que las hojas.

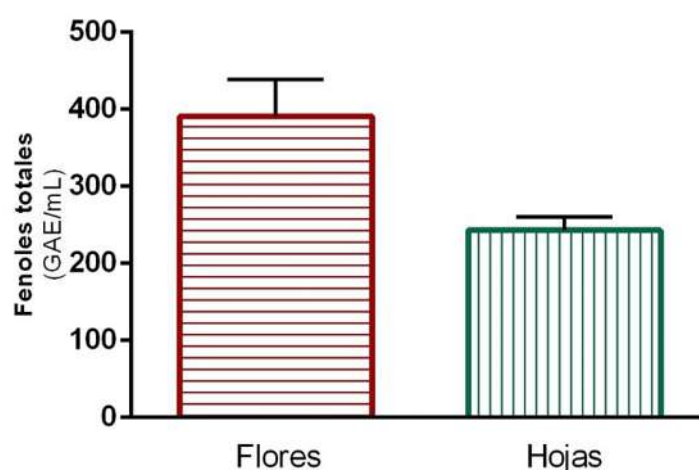


Fig. 6 Contenido de fenoles totales en los extractos de flores y hojas de *C. citrinus* medido por la técnica de Folin-Ciocalteu y expresado en equivalentes de ácido gálico (GAE) por mililitro (n=3, promedio $\pm$ SD)



También se determinó la presencia de flavonoides tanto en hojas como en flores de *C. citrinus* (Fig. 7). Para el caso de las hojas el contenido fue de 82.8 ± 5.2 mg de rutina/mL de extracto y para las flores de 29.4 ± 2.3 mg de rutina/mL. En este caso, y a diferencia del contenido de fenoles totales, las hojas presentan una mayor cantidad de flavonoides que las flores.

El contenido de flavonoides en extractos de *C. citrinus* cultivado en México también ha sido reportado previamente por **Cid-Estrada** (2014) y **Pérez-González** (2016). El primero reporta un contenido de flavonoides de 130 mg/mL y 30 mg/mL de equivalentes de rutina para los extractos de hoja y de flor, respectivamente, mientras el segundo reporta 100 y 27.9 mg de rutina/mL de extracto para hojas y flores, respectivamente. Estos datos sugieren que a pesar de que la cantidad de flavonoides es ligeramente variable, siempre es mayor en los extractos de hojas que en los de flores. Por lo tanto, el tipo de compuestos fenólicos mayoritarios en las flores (cuyo contenido de fenoles totales es mayor que en hojas) debe deberse a otro tipo de fenólicos que no son flavonoides, posiblemente ácidos fenólicos o antocianinas

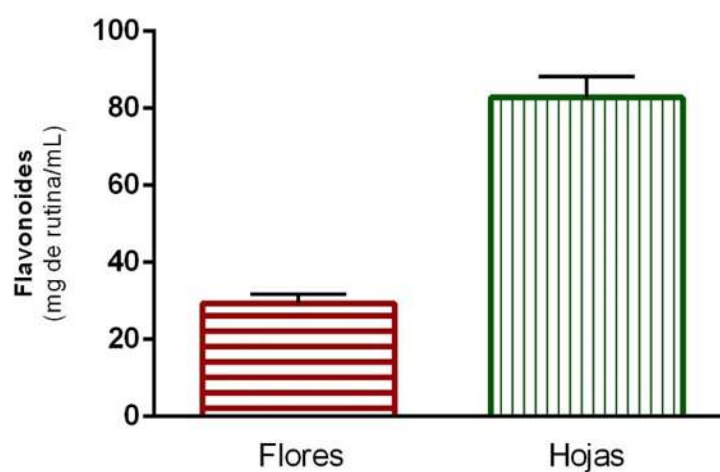


Fig. 7 Contenido de flavonoides en los extractos de flores y hojas de *C. citrinus* medido por la técnica del cloruro de aluminio expresado en mg de rutina por mililitro de extracto ($n=3$, promedio $\pm$ SD).

Los compuestos fenólicos que han sido reportados para *C. citrinus* incluyen al ácido gálico, la rutina, el eucaliptino, el 8-dimetil-eucaliptín, el galato de metilo, el ácido protocatecuico,



sideroxilina, sizalterina y la quercetina (Park *et al.*, 2010; Khanh, *et al.*, 2016; Pérez-González, 2016).

Capacidad antioxidante *in vitro* de *C. citrinus*

Ambos extractos presentaron importante capacidad antioxidante *in vitro* con las tres metodologías utilizadas en el presente estudio (Fig. 8).

El extracto de las flores fue el que presentó la mayor capacidad para reducir el DPPH ($p \leq 0.0001$) y el hierro ($p \leq 0.05$) respecto al extracto de las hojas. En cuanto a la capacidad para inhibir la producción del radical ABTS, ambos extractos tuvieron el mismo poder (expresado en equivalente de trolox, un conocido antioxidante) no habiendo diferencia estadísticamente significativa entre ambos.

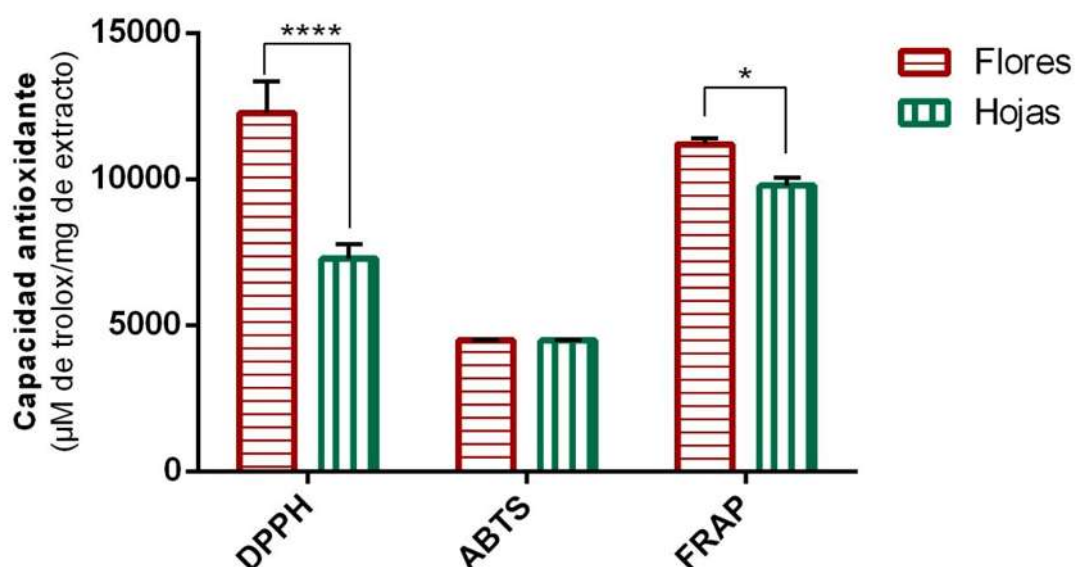


Fig. 8 Capacidad antioxidante de los extractos de flores y hojas de *C. citrinus* expresado en equivalentes de trolox por miligramo de peso del extracto medido por tres técnicas distintas: DPPH, ABTS y FRAP. Tukey (* $p \leq 0.05$; **** $p \leq 0.0001$) ($n=3$, promedio $\pm$ SD).



El hecho de que el extracto de flores presenta una mayor capacidad antioxidante puede estar relacionado con que este extracto es el que presenta un mayor contenido de compuestos fenólicos, que son precisamente los metabolitos secundarios a los que más se les atribuye esta actividad biológica, debido a la abundancia de grupos hidroxilo en su estructura química.

No obstante, aunque sea mayor la capacidad antioxidante del extracto etanólico de las flores, ambos extractos presentan un potencial antioxidante muy elevado respecto a otros compuestos químicos y otros extractos vegetales, como lo revela el estudio realizado por **Cid-Estrada** en 2014 donde determinó por primera vez la actividad antioxidante *in vitro* de tres plantas que se cultivan como ornamentales en México: *Callistemon citrinus*, *Plumbago auriculata* e *Hibiscus rosa-sinensis* por los métodos DPPH, FRAP Y ABTS. Para el caso particular de *C. citrinus* con el método DPPH, el extracto etanólico de flor mostró tener un alto poder antioxidante ya que a partir de una concentración de 100 µg/mL del extracto presentó un 90 % de RSA (Radical Scavenging Activity – porcentaje de la actividad de captura de radicales), mientras que el extracto etanólico de hoja obtuvo ese mismo porcentaje a una concentración de 250 µg/mL. Cabe mencionar que el ácido gálico usado como control tuvo un 90% de RSA con una concentración de 60 µg mientras que el Trolox mostró ese mismo porcentaje de RSA con una concentración de 1000 µM. Los resultados demuestran que el extracto etanólico de la flor de *C. citrinus* tiene una mayor actividad antioxidante que el extracto etanólico de la hoja, que presentó un RSA del 90% a partir de los 200 µg/mL. Por lo tanto, los resultados reportados por **Cid-Estrada** en 2014 concuerdan con los obtenidos en la presente investigación.

Pese a que la presencia de una gran diversidad de compuestos terpénicos en los extractos de *C. citrinus* se sabe por un estudio previo llevado a cabo por **Pérez-González (2016)**, que éstos no son los responsables de la alta capacidad antioxidante que presenta la planta. Pérez-González, atribuye esta actividad a los compuestos fenólicos. El alto contenido de fenoles se correlaciona además con la alta capacidad antioxidante en ambos extractos.



CONCLUSIÓN

Los extractos etanólicos de hojas y flores de *C. citrinus* son ricos en compuestos terpénicos, siendo el 1-8 cineol el más abundante. Además, ambos extractos tienen un contenido importante de compuestos fenólicos y flavonoides que presentan una alta capacidad antioxidante *in vitro* por lo que son susceptibles a su investigación con fines terapéuticos en enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo.

LITERATURA CITADA

- Ali N**, Shah SWA, Ahmad B. 2011. Calcium channel blocking activity of fruits of *Callistemon citrinus*. J Chem Soc Pak, 33(Suppl 2):245-248
- Aydin**, E., Türkez, H., & Taşdemir, Ş. 2013. Anticancer and antioxidant properties of terpinolene in rat brain cells. Archives of Industrial Hygiene and Toxicology, 64(3), 415-424.
- Ban**, J. O., Hwang, I. G., Kim, T. M., Hwang, B. Y., Lee, U. S., Jeong, H. S., & Hong, J. T. 2007. Anti-proliferate and pro-apoptotic effects of 2, 3-dihydro-3, 5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyranone through inactivation of NF-κB in human colon cancer cells. Archives of pharmacal research, 30(11), 1455.
- Benzie**, I. F. y Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. Analytical biochemistry, 239(1), 70-76.
- Cid-Estrada E**. 2014. Determinación de la capacidad antioxidante en *Callistemon citrinus*, *Hibiscus rosa-sinensis* y *Plumbago auriculata*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, México.
- Das**, N., Islam, M. E., Jahan, N., Islam, M. S., Khan, A., Islam, M. R., y Parvin, M. S. 2014. Antioxidant activities of ethanol extracts and fractions of *Crescentia cujete* leaves and stem bark and the involvement of phenolic compounds. BMC complementary and alternative medicine, 14(1), 45.
- Fischer J**. y U. Dethfelsen. 2013. Efficacy of cineole in patients suffering from acute bronchitis: a placebo-controlled double-blind trial. Cough 9:25.



-
- Firoz** M., Bharatesh K., Nilesh P., Vijay G., Tabassum S. y Nilofar N. 2011. Cardioprotective activity of ethanolic extracts of *Callistemon lanceolatus* leaves on doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. *Bangladesh Journal Pharmacology*. 6:38.
- Gupta** A., y Gupta R. 1997. A survey of plants for anticholinesterase activity. *Phytochemistry*. 46:827.
- Jain** A. K., Dubey S. K., Sikawar M. S. y Jain S. K. 2007. Hepatoprotective activities of methanolic extract of leaves of *Callistemon lanceolatus*. *International Journal Plant Science*. 2:185-186
- Jennifer** S., Boehmeb A., Setzer N. 2007. Biological activities of essential oils from Monteverde, Costa Rica. *Nat Prod Commun*; 2(2): 1212-1219.
- Khanh**, P. N., Duc, H. V., Huong, T. T., Ha, V. T., Van, D. T., Kim, Y. H., y Cuong, N. M. 2016. Phenolic compounds from *Callistemon citrinus* leaves and stems. *Vietnam Journal of Science and Technology*, 54(2), 190
- Kinghorn**, A. D. E. A., Farnsworth, N., Soejarto, D., Cordell, G., Swanson, S., Pezzuto, J. y Kramer, R. (2003). Novel strategies for the discovery of plant-derived anticancer agents. *Pharmaceutical biology*, 41(sup1), 53-67
- Kumar** B., Vijayakumar M., Govindarajan R. y Pushpangadan. P. 2007. Ethnopharmacological approaches to wound healing-exploring medicinal plants of India. *Journal Ethnopharmacology*. 114:103
- López-Mejía**, A. 2015. Estudio farmacológico de los extractos de hoja y flor de *Callistemon citrinus*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.
- Miller**, J. A., Thompson, P. A., Hakim, I. A., Chow, H. H. S., y Thomson, C. A. (2011). d-Limonene: a bioactive food component from citrus and evidence for a potential role in breast cancer prevention and treatment. *Oncology Reviews*, 5(1), 31-42.
- Montaño-Ñeco**, Y. I. 2011. Determinación de la actividad antimicrobiana y de la composición química de *Callistemon citrinus*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.
- Park** MH, Min do S. 2011. Quercetin-induced downregulation of phospholipase D1 inhibits proliferation and invasion in U87 glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 412:710-5
-



-
- Pérez-González J.** 2016. Determinación de la participación de los fenoles en la actividad antioxidante de los extractos etanolicos de hoja y flor de *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.
- Petronilho S,** Rocha SM, Ramírez-Chávez E, Molina-Torres J, Rios-Chavez P Assessment of the terpenic profile of *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels from Mexico. Industrial Crops and Products Journal. No 46. 369-379 (2013).
- Rufino, M. D. S. M.,** Alves, R. E., Brito, E. S. D., Perez-Jimenez, J., Saura-Calixto, F., y Mancini-Filho, J. 2010. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. Food Chemistry, 121(4), 996-1002.
- Sampath, S.,** Veeramani, V., Krishnakumar, G. S., Sivalingam, U., Madurai, S. L., y Chellan, R. 2017. Evaluation of in vitro anticancer activity of 1, 8-Cineole-containing n-hexane extract of *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels plant and its apoptotic potential. Biomedicine & Pharmacotherapy, 93, 296-307.
- Sheeja, L.,** Lakshmi, D., & Shruthi Bharadwaj, P. K. S. 2016. Anticancer activity of phytol purified from *Gracilaria edulis* against human breast cancer cell line (MCF-7). *Int J Curr Sci*, 19(4), 36-46.



6.2. Capítulo II

Efecto de los extractos de *Callistemon citrinus* en el desarrollo cáncer de colon en ratas inducido con 1,2 dimetilhidrazina

RESUMEN

El presente estudio se llevó a cabo con el objetivo de examinar el efecto de los extractos de hojas y flores de *C. citrinus* en el desarrollo del cáncer de colon inducido con 1,2 dimetilhidrazina (DMH) en ratas. Se establecieron cuatro grupos de animales (n=8). El primero sirvió como grupo control y los otros tres fueron administrados con 5 dosis de 65 mg/kg de DMH vía subcutánea durante las primeras 3 semanas. Los grupos 3 y 4 fueron administrados con los extractos de hojas y flores (respectivamente) de *C. citrinus* a dosis oral diaria de 250 mg/kg durante todo el experimento que tuvo una duración de 22 semanas. Los animales fueron sacrificados y se evaluó la presencia de tumores y de fosas cripticas aberrantes (FCA). También se analizaron las proteínas séricas y la albúmina. El 100% de los animales administrados únicamente con DMH desarrollo tumores, contra el 66% de los que recibieron el extracto de hojas. El grupo tratado con el extracto de hojas también presento un número menor de FCA que el grupo tratado solo con el carcinógeno (15 contra 36 FCA, respectivamente). Los valores de las proteínas séricas en el grupo control negativo también fueron menores respecto al control normal y el tratado con extractos de hojas. En contraste, los extractos de flores tuvieron un efecto negativo y solo un individuo sobrevivió al experimento, no presentando tumores. Por lo tanto, los resultados sugieren que los extractos de hojas pueden tener un potencial uso como agentes quimioprotectores.

Palabras clave: *Callistemon citrinus*, cáncer colorrectal; carcinogénesis, quimioprotección, 1,2 dimetilhidrazina.

ABSTRACT

The present study was carried out to examine the effect of *C. citrinus* leaves and flowers extracts in the development of colorectal cancer induced with 1,2 dimethylhydrazine (DMH) in rats. Four groups of animals were established (n = 8). The first group served as a control group and the other three were administered with 5 doses (65 mg / kg) of DMH subcutaneously for the first 3 weeks. Groups 3 and 4 were treated with extracts of leaves and flowers (respectively) of *C. citrinus* at daily oral dose of 250 mg / kg throughout the experiment, which lasted 22 weeks. The animals were sacrificed and the presence of tumors and aberrant crypt foci (AFC) were evaluated. Serum proteins and albumin were also analyzed. 100% of the animals administered only with DMH developed tumors, against 66% of those who received the leaf extract. The group treated with the leaf extract also presented a lower number of AFC than the group treated only with the carcinogen (15 against 36 AFC, respectively). The values of the serum proteins in the negative control group were also lower compared to the normal control and that treated with leaf extract. In contrast, the flower extract had a negative effect and only one individual survived the experiment, not presenting



tumors. Therefore, the results suggest that leaf extract may have a potential use as chemoprotective agent.

Keywords: *Callistemon citrinus*, colorrectal cancer; carcinogenesis, chemoprevention, 1,2 dimethylhydrazine.

INTRODUCCIÓN

El cáncer colorrectal es considerado un grave problema de salud mundial pues representa el cuarto tipo de cáncer más común y el tercero en mortalidad. En México el cáncer es la tercera causa de muerte más importante entre los tipos de cáncer (**Aldaco**, 2012).

La mayor parte de los casos ocurren de manera espontánea y únicamente se considera que el 20% se atribuyen a una causa genética heredable. Una vez diagnosticado la sobrevivencia es de 5 años en promedio (**OMS**, 2015).

Los principales factores ambientales asociados como causa del cáncer colorrectal son la alimentación (baja ingesta de fibra, bajo consumo de frutas y vegetales, alta ingesta de grasas y alimentos de origen animal), el consumo de bebidas alcohólicas, la obesidad y el sedentarismo, el tabaquismo y el estrés (**Piña**, 2007). Los ROS también juegan un papel importante en la regulación de diversas vías de señalización en la carcinogénesis, por lo que la regulación del estrés oxidativo debe ser un factor clave en la búsqueda de compuestos quimioprotectores (CITA)

El hecho de que el 80% de los casos de cáncer se asocien con el ambiente y de que la mayoría de los casos se diagnostican en estadios avanzados de la enfermedad, la estrategia más importante para atacar esta problemática debe basarse en su prevención.

Los modelos biológicos de estudio de CCR juegan un papel muy importante en la investigación para la prevención, el tratamiento y la cura de esta enfermedad (Piña, 2007). Existen diversas sustancias utilizadas para la inducción de cáncer colorrectal en animales. destacando la 1,2-dimetilhidrazina (DMH) pues produce una alta incidencia de adenomas y adenocarcinomas en el colon y recto de roedores debido a su actividad alquilante de los ácidos nucleicos del epitelio intestinal y sus propiedades mutagénicas. Este carcinógeno actúa modificando el genoma del enterocito ocasionando alteraciones como la pérdida de



diferenciación celular, ganancia de invasividad y conducta proliferativa anormal (**Lodish et al., 2003; Piña, 2007; Corpet y Tarché, 2002**).

Callistemon citrinus presenta una amplia diversidad de compuestos anticancerígenos reportados, incluyendo terpenoides, ácidos fenólicos y flavonoides. También presenta una alta capacidad antioxidante. Muchos de estos compuestos, así como los propios extractos de la planta, han demostrado selectivamente estas propiedades en modelos *in vitro* de cáncer colorrectal por lo que se considera oportuno estudiar y corroborar el posible efecto quimiopreventivo en un modelo *in vivo* de CCR.

En el presente capítulo se analiza y discute el efecto de la administración de los extractos de hojas y flores de *C. citrinus* que crece en México, en un modelo de cáncer de colon inducido con 1,2 dimetilhidrazina en ratas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de los extractos

Se prepararon extractos etanólicos de hojas y flores de *C. citrinus* tal y como se describe en el Capítulo I de la presente tesis.

Animales

Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar, criadas y mantenidos en condiciones estándar: 12 horas de luz/12 horas oscuridad, humedad relativa 60-70 %, temperatura de 20°C, con libre acceso a comida y agua. Los animales utilizados tuvieron una edad de 6 a 8 semanas y peso promedio de 200 gr al inicio del experimento. Fueron mantenidos en el bioterio del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. La atención de los animales y el proceso experimental se llevaron a cabo de acuerdo a la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio, de la Norma Oficial Mexicana (**NOM-062-ZOO-1999**).



Modelo de carcinogénesis colónica experimental

Se utilizó el método de inducción de cáncer colorrectal con 1,2-dimetilhidrazina (DMH) modificado de Jucá *et al.*, (2014). Se utilizaron 32 ratas sanas que fueron distribuidas aleatoriamente en 4 grupos (n=8) (Fig. 9).

El grupo 1 sirvió como grupo normal (control) y únicamente se le administro la solución vehículo.

Los grupos 2, 3 y 4 (DMH, DMH + hoja y DMH + flor, respectivamente) fueron administrados con 5 inyecciones vía subcutánea de una solución acuosa de 1,2-dimetilhidrazina (DMH) a dosis de 65 mg/Kg durante las primeras 3 semanas del experimento. La solución fue preparada disolviendo la DMH en una solución de NaCl 0.9% con 1.5% de EDTA a un pH de 6.5.

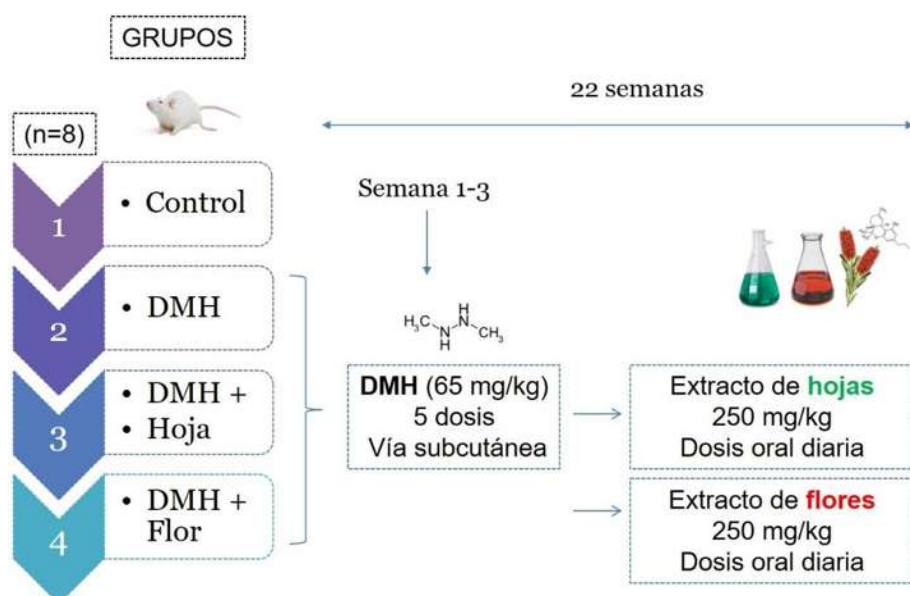


Fig. 9 Diagrama del modelo de inducción de cáncer de colon con 1,2 dimetilhidrazina (DMH). Se utilizaron 4 grupos con una n inicial de 8 individuos. Grupos 2, 3 y 4 fueron administrados con 5 dosis subcutáneas de DMH durante las 3 primeras semanas del experimento. Los grupos 3 y 4 fueron administrados con una dosis oral diaria de 250 mg/kg de los extractos de hojas y flores de *C. citrinus* respectivamente disueltos en aceite de maíz comercial. El grupo 1 sirvió de grupo control y el experimento duro 22 semanas.

Adicionalmente y a partir de la primera semana del experimento, los grupos 3 y 4 recibieron los extractos de hoja y flor (respectivamente) de *C. citrinus* por vía oral a una dosis diaria de



250 mg/Kg con ayuda de una cánula intragástrica. La solución vehículo donde se disolvieron los extractos fue aceite de maíz comercial de la marca Mazola®.

Agua y comida fue administrada *ad libitum*. Se llevó un control de peso semanal de los animales para ajustar las dosis de los extractos. La duración total del experimento fue de 22 semanas, al término de las cuales todos los individuos fueron sacrificados por sobredosis de pentobarbital sódico (150 mg/Kg), para los posteriores estudios y determinaciones. También se tomaron muestras de sangre por punción cardiaca, se colocaron en tubos sin anticoagulante y, pasada una hora, fueron centrifugadas a 4°C y 3000 rpm durante 20 minutos para obtener suero. Este se mantuvo a – 20°C hasta que fue utilizado.

Análisis macroscópico de tumores

Una vez sacrificados los animales fueron diseccionados mediante una incisión torácico-abdominal media para buscar evidencia de tumores visibles en los órganos internos. Posteriormente se extrajeron el intestino grueso y el hígado. El intestino fue abierto longitudinalmente y ambos órganos fueron lavados con solución fisiológica (NaCl 0.9%). Se observó y registró la presencia de masas tumorales en el intestino grueso. Muestras de colon e hígado fueron congeladas inmediatamente a -20°C para las posteriores determinaciones enzimáticas.

Fosas cripticas aberrantes

Las fosas de criptas aberrantes (FCA) son las primeras lesiones pre neoplásicas que se evidencian en modelos de carcinogénesis colónica experimental (**Piña, 2007**). Para el estudio de las FCA se tomaron muestras (1 cm²) de las diferentes porciones del colon (proximal, medio y distal) que se colocaron en papel filtro y se fijaron en formaldehído (4 %) durante 24 horas. Posteriormente fueron teñidas con una solución de azul de metileno al 0.2% y observadas al microscopio (10X). Las FCA se caracterizan por tener un borde epitelial engrosado, presentar aberturas laminales y ser de mayor tamaño evidente que las criptas que las rodean.



Estudio histológico

Se tomaron muestras de lesiones tumorales y zonas sanas del colon para realizar un estudio histopatológico. Las muestras fueron fijadas en una solución de formalina (10%) durante 48 horas. Posteriormente fueron embebidas en parafina y se realizaron cortes transversales de un grosor de 7 μm con ayuda de un micrótopo. Los cortes fueron teñidos mediante la tinción hematoxilina-eosina y observados al microscopio.

Proteínas totales y albúmina sérica

Se midió la concentración de proteínas totales en los homogenados citosólicos y en el suero de los animales usando el método de **Bradford** (1976) adaptado para analizar bajas concentraciones mediante un micrométodo disponible comercialmente.

La albúmina sérica fue determinada mediante la técnica de verde de bromocresol. La albúmina se combina con el verde de bromocresol a pH ligeramente ácido, produciéndose un cambio de color del indicador, de amarillo verdoso a verde azulado proporcional a la concentración de albúmina. La muestra se midió a 590 nm en espectrofotómetro (**Gendler** 1986).

Tanto para las proteínas totales como para la albúmina sérica se utilizó albúmina sérica bovina (1 mg/mL) para la curva patrón (Anexos 6 y 7).

Análisis estadístico

Los datos numéricos obtenidos fueron analizados y procesados utilizando el programa de Microsoft Excel 2016 y el programa GraphPad Prism 6.0 para Windows. Fueron comparados mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), así como la prueba de comparación múltiple de Dunn, considerando tres niveles de significancia: $*P \leq 0.05$; $**P \leq 0.01$ y $***P \leq 0.001$.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Modelo de carcinogénesis

El modelo de carcinogénesis colónica fue establecido exitosamente. El 100% de los animales del grupo tratado únicamente con el carcinógeno DMH desarrollo tumores en el intestino grueso. Ningún individuo del grupo control presento lesiones tumorales espontaneas (Fig. 10). Tampoco se encontraron tumores en otra localización distinta al intestino en ninguno de los grupos.

Animales de los cuatro grupos murieron durante las 22 semanas que duro el experimento.: dos del grupo control (semanas 2 y 5), dos del grupo tratado con DMH (semanas 1 y 7), dos del grupo tratado con el extracto hojas de *C. citrinus* (semanas 2 y 9). Debido a que ocurrió el mismo número de muertes espontaneas en estos grupos y en diferentes momentos del experimento, estas muertes son atribuidas a causas naturales considerando el largo periodo de duración del experimento. En cambio, en el grupo tratado con los extractos de flores y que además se indujo la carcinogénesis, murieron 7 de los 8 individuos a lo largo del experimento. La necropsia de estos individuos mostro tumores en 3 de ellos. El único individuo que sobrevivo no presentaba ningún tumor (Tabla 3).

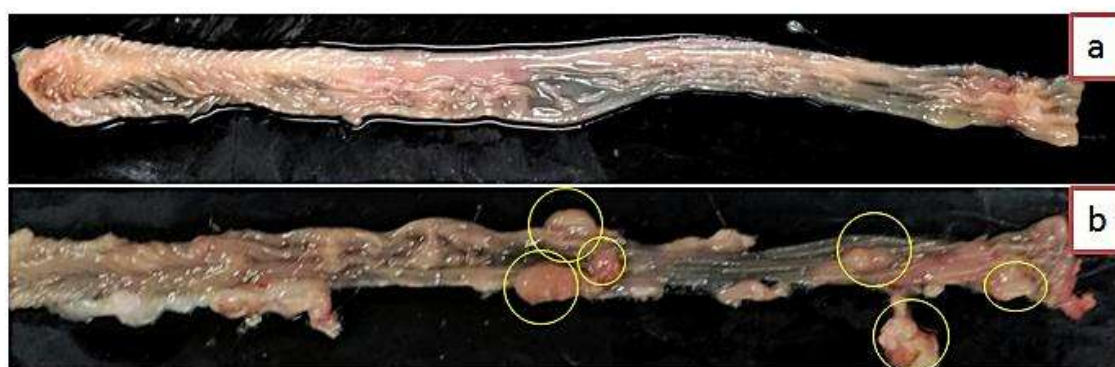


Fig. 10 Imagen representativa del modelo de carcinogénesis colonica experimental: a) colon de un individuo del grupo control donde no se observan masas tumorales; b) colon de uno de los individuos del grupo tratado únicamente con el carcinógeno. Las masas tumorales se observan encerradas en círculos amarillos. En ambos casos, los intestinos están orientados de manera que la zona proximal se localiza a la izquierda y la distal a la derecha de la imagen.



Un estudio previo (**López-Mejía**, 2015) no encontró mortalidad ni toxicidad por la administración de extractos de hojas y flores *C. citrinus* a dosis oral diaria de 1000 mg/kg por 28 días (una dosis cuatro veces más alta que la empleada en la presente investigación). Tampoco se reporta en la literatura evidencia de toxicidad o la presencia de algún compuesto potencialmente toxico presente en los extractos de flor. Además, las flores de *C. citrinus* son consumidas por los indígenas australianos desde hace milenios (**Cook**, 2012). Por lo tanto, resulta muy significativa la muerte de estos animales.

Una posible explicación puede estar relacionada con el hecho de que los extractos de flores presentan un elevado poder antioxidante (40% más que los extractos de las hojas). El consumo de dosis muy altas de antioxidantes ha sido debatido ampliamente en la literatura y, a pesar de que los datos aun no son del todo concluyentes, hay evidencia de que suplementaciones altas de antioxidantes pueden ser perjudiciales para la salud.

Esta controversia es denominada en la literatura como “la paradoja de los antioxidantes” y se refiere a la evidencia de que los antioxidantes, en determinadas circunstancias, podrían tener un efecto negativo.

El estrés oxidante y el proceso tumoral se encuentran estrechamente relacionados a través de la oxidación del material genético. Distintos estudios apuntan a que una pequeña cantidad de oxidantes, tales como el peróxido de hidrógeno, juegan un papel crucial como segundos mensajeros en la transducción de señales para la activación, diferenciación y proliferación celular. Parece ser que la inducción o inhibición de la proliferación celular depende de los niveles de oxidantes y antioxidantes en la célula. (**Saavedra et al.**, 2010).

Tabla 3. Incidencia de masas tumorales en el colon tras 22 semanas de experimentación.

Grupo	Ratas con tumores	Ratas sin tumores	Total de tumores por zona			Tumores totales	Tumores por rata
			Proximal	Medio	Distal		
Control	0 (0%)	6 (100%)	0	0	0	0	0
DMH	6 (100%)	0 (0%)	4	13	9	26	4.3
DMH + Hoja	4 (66%)	2 (33%)	4	12	11	27	4.5
DMH + Flor	0 (0%)	1 (100%)	0	0	0	0	0



Como se mencionó previamente, en ningún individuo del grupo control aparecieron tumores espontáneos. En el grupo tratado con el carcinógeno (DMH) se evidencio la formación de un total de 26 tumores, predominando la zona media con 13 tumores totales (50%). El promedio de tumores por rata en este grupo fue de 4.3 y hubo presencia de ellos en todas las ratas.

En el grupo con CCR inducido pero administrado con los extractos de hoja, se encontraron tumores en 4 de los seis individuos sacrificados al final del experimento. Tampoco los dos que murieron espontáneamente los presentaron. En este caso el número total de tumores fue de 27, con un promedio de 4.5 tumores por rata.

Finalmente, en el grupo administrado con extracto de flores, tres individuos muertos antes de finalizar experimentos revelaron la presencia de tumores. El único individuo que sobrevivió al final del experimento no presento ningún tumor.

De manera general, la zona media del colon presentó más tumores en promedio (10), seguida de la zona distal (7.75) y finalmente la zona proximal (2.75). Estos datos concuerdan con los reportados en la literatura, donde la incidencia de tumores es siempre menor en la zona proximal (**Juca et al.**, 2014).

El hecho de que el 33 (%) de los animales del grupo DMH+Hoja no presentaron tumores, comparado con el hecho de que el 100 % de los tratados únicamente con DMH los presentaron, es un indicativo de que el extracto tiene un efecto protector en algún grado.

El análisis histológico de las masas tumorales mostro un alto grado de displasia, con la total desdiferenciación y pérdida de la anatomía de la mucosa normal, correspondientes con un adenocarcinoma (carcinoma de colon) (Fig. 11). Estos resultados sugieren que la DMH es capaz de producir carcinomas de colon a 22 semanas a la dosis utilizada en este estudio, por lo que es un buen modelo para estudiar el desarrollo de cáncer de colon. En contraste, **Piña** (2007), tras 15 semanas de experimentación, no encontró formación de masas tumorales en ratas tratadas con DMH y dextran sulfato.



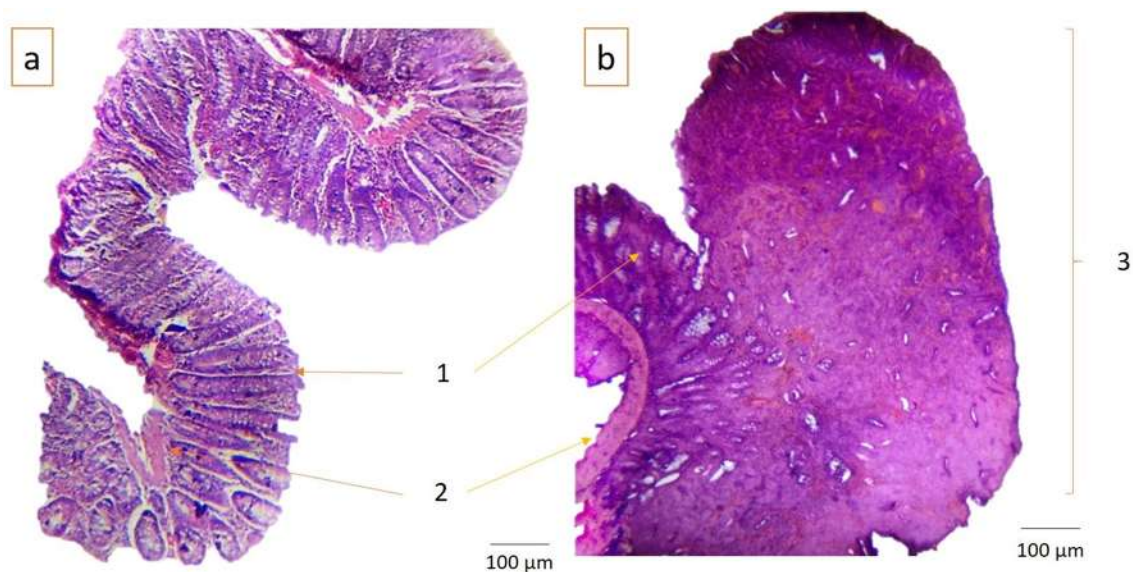


Fig. 11 Histología del colon: a) mucosa colonica normal de uno de los individuos del grupo control. Pueden observarse las criptas de Liberkhun (1) y el musculo liso (2).; b) adenocarcinoma del grupo tratado con la DMH, se observa un alto grado de displasia con una total perdida de la anatomía de la mucosa normal (3). Tinción Hematoxilina-Eosina (10X).

Focos de criptas aberrantes

Los focos o fosas de criptas aberrantes (FCA) son lesiones preneoplásicas que se han utilizado para evaluar la iniciación y promoción de la carcinogénesis inducida químicamente (Piña, 2007).

En el presente estudio, se evaluó la presencia de FCA en el colon para lo cual fueron teñidas con azul de metileno y observadas al microscopio (Fig. 11).

En el grupo control no se observó ninguna FCA. En el grupo tratado con DMH se contabilizo un total de 36 focos de criptas aberrantes en las tres zonas del colon, predominando en la zona distal (50%) (Tabla 4)



Tabla 4. Incidencia de FCA en las tres zonas del colon tras 22 semanas de experimentación. La presencia de FCA es significativamente mayor en el grupo DMH que en los administrados con los extractos.

Focos de Criptas Aberrantes (FCA)				
Grupo	Proximal	Medio	Distal	Total
Control	0	0	0	0
DMH	9 (25%)	9 (25%)	18 (50%)	36
DMH+Flores	0 (0%)	4 (66.6%)	2 (33.3%)	6
DMH+Hojas	0 (0%)	3 (20%)	12 (80%)	15

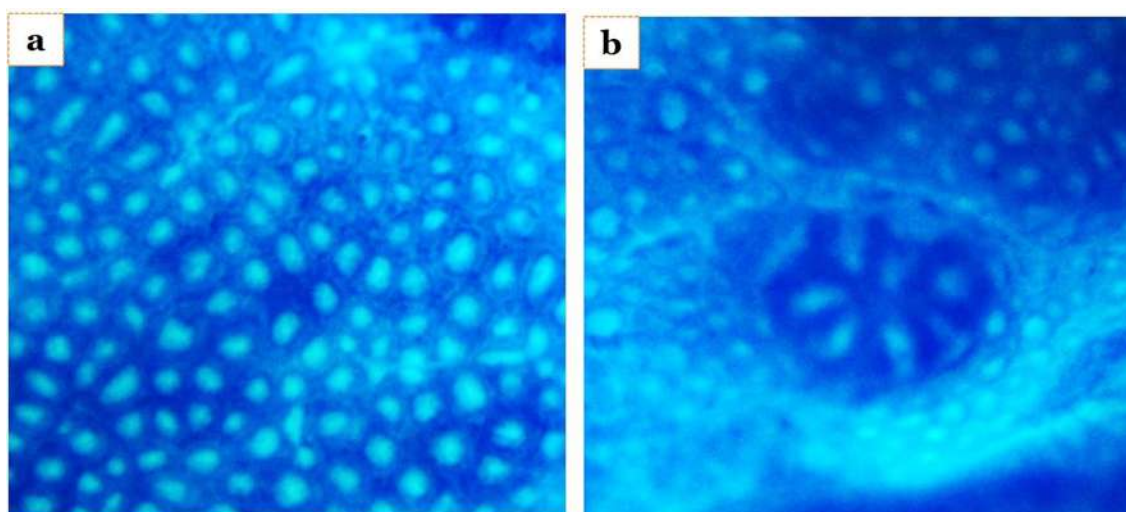


Fig. 12 a) Fosas normales del epitelio intestinal perteneciente a un individuo del grupo control; b) Foco de criptas aberrantes (FCA) de un individuo tratado con DMH. Nótese los bordes epiteliales engrosados y su proyección (levantamiento hacia la luz intestinal).
Tinción azul de metileno (0.2%) 40 X.



En única rata que sobrevivió del grupo flores, se contabilizaron 6 FCA: 4 en la zona media y dos en la zona distal.

En el grupo tratado con los extractos de hojas, se contabilizaron 15 FCA (menos de la mitad del grupo tratado únicamente con el carcinógeno). Predominando las FCA en la zona distal (80% del total).

El considerable mayor número de FCA en el grupo DMH es un indicador de que el proceso de carcinogénesis continúa, por lo que el hecho de que los grupos tratados con los extractos presenten un número mucho menor de estas lesiones podría ser un indicador que los extractos ayudan a disminuir el proceso carcinogénico con el tiempo.

Control de peso

Durante las 22 semanas se llevó un registro semanal del peso de los animales con el objetivo ajustar la dosis de administración de los extractos (Fig. 13).

El peso inicial fue de 143 ± 33 para el grupo control, 115 ± 18 en el grupo DMH, y 120 ± 14 y 112 ± 28 g para los grupos tratados con los extractos de hojas y flores, respectivamente. El peso tras 22 semanas fue de 393 ± 32 (control), 395 ± 35 (DMH), 363 ± 30 (extracto de hojas) y 412 g (extracto de flores).

En ninguno de los tratamientos hubo diferencias significativas (Dunn, $p \leq 0.05$) en el peso promedio de los animales, sin embargo, el peso de los animales del grupo tratado con el extracto de hojas fue menor en cerca de un 10% que el resto de los tratamientos. En un trabajo previo (López-Mejía, 2015) también se reportó que los extractos de hojas tuvieron el efecto de disminuir el peso final de los animales en un estudio tras 28 días con dosis de 1000 mg/kg del extracto etanólico de las hojas, por lo que atribuimos esta disminución al efecto del extracto y no como síntoma de la enfermedad.



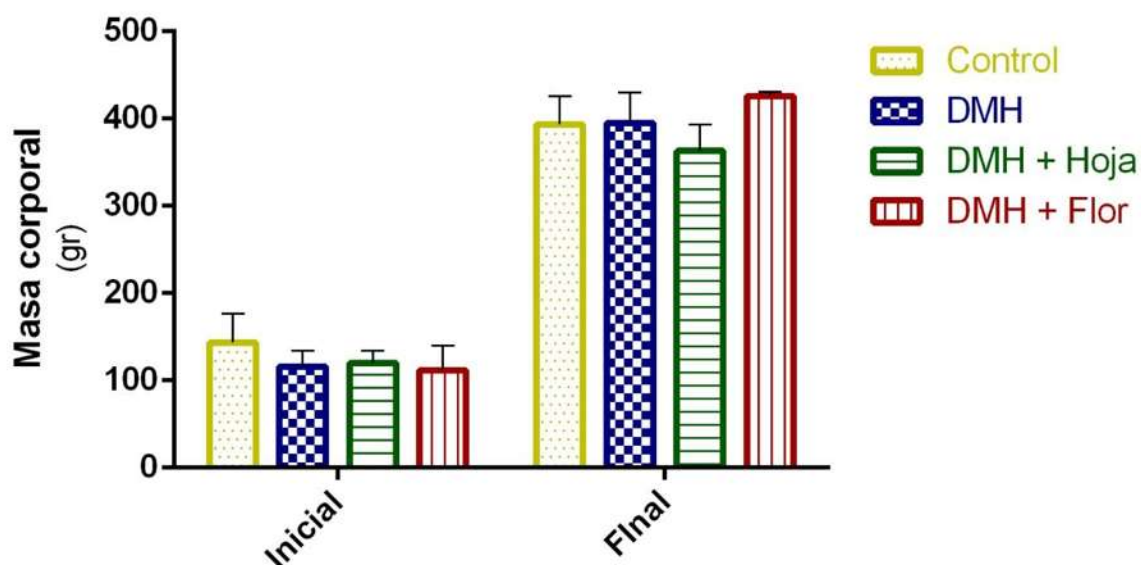


Fig. 13 Grafico que representa el peso inicial y final de los animales del experimento. No hay diferencias significativas entre los tratamientos, (Dunn`s, $p \leq 0.05$; $n=6$).

Un estudio similar, llevado a cabo por **Piña** (2007) no encontró diferencias significativas en el peso de los grupos control y los tratados con DMH tras 15 semanas de experimentación. Otro estudio, llevado a cabo por **Onose et al** (2004) presento resultados similares tras un experimento que duro 26 semanas y donde la dosis de DMH administrada fue de 40 mg/kg para la inducción del CCR. Estos resultados muestran que la DMH a las dosis y empleadas y el tiempo de duración del experimento no son letales ni muestran efecto negativo en el desarrollo de los animales.

Proteínas y albúmina en suero

Se determinó la concentración sérica de proteínas y albumina en los cuatro grupos experimentales (Fig.14). El grupo control presento una concentración de 6.3 ± 0.9 , el grupo DMH 5.4 ± 0.7 , y los tratados con DMH mas los extractos 5.0 y 6.1 ± 0.5 mg/mL. El análisis de varianza no mostro diferencia significativa entre los grupos, sin embargo de acuerdo a los valores normales, que son de 5.9 a 7.9 mg/mL para ratas macho de 22 semanas de edad (**León-Goñi et al.**, 2011) los grupos DMH y DMH + flores presentaron bajos niveles de proteínas séricas. Los niveles bajos de proteínas séricas son un indicador de estadios



avanzados de cáncer de colon y se le conoce como pérdida de proteínas por enteropatía gastrointestinal (**Warner**; 2016).

Los valores de la albumina son similares entre ellos, y caen dentro del rango de valores normales (2.4 – 4.6 mg/mL).

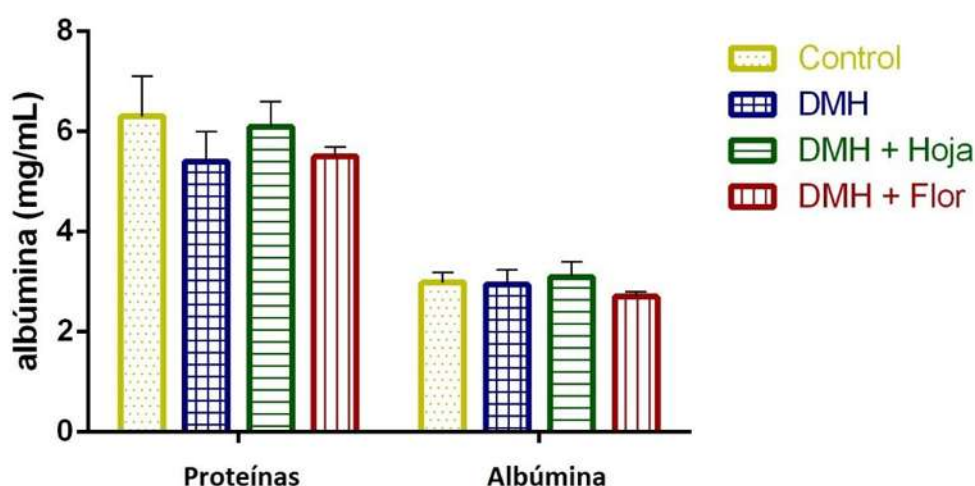


Fig. 14 Proteínas y albúmina sérica de los 4 grupos experimentales. Pese a que no hay diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA, $p \leq 0.05$; $n=3$).

CONCLUSIÓN

Los extractos de hoja de *C. citrinus* tuvieron un efecto en la disminución de los animales que presentaron menos tumores en un 33% respecto al grupo control negativo (donde hubo un 100% de formación tumoral). También tuvieron un efecto positivo en el proceso de carcinogénesis disminuyendo el número de lesiones preneoplásicas (FCA) y manteniendo normales los valores de las proteínas séricas. Los extractos de las flores, a la concentración utilizada, tuvieron un efecto negativo, acelerando la muerte de los individuos del grupo.



LITERATURA CITADA

- Aldaco F.** 2012. Mortalidad por cáncer en México 2000–2010: el recuento de los daños. *Gaceta Mex Onc.* 11(6):371–379.
- Begleiter, A., Sivananthan, K., Curphey, T., and Bird, R.** 2003. Induction of NAD(P)H quinone: oxidoreductase 1 inhibits carcinogen-induced aberrant crypt foci in colons of Sprague-Dawley rats. *Cancer Epidemiol Biomarkers Research.* 12: 566-72.
- Bradford, M.** 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*, 72:244.
- Chan, A.T., Giovannucci, E.L.** 2010. Primary prevention of colorectal cancer. *Gastroenterology.* 138,2029-2043.
- Chaparro, D. C., Maldonado, M. E., Urango., L. A., Rojanoi, B. A.** 2015. Propiedades quimiopreventivas de *Pasiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey (curuba larga) contra cáncer colorrectal. *Revista Cubana de Plantas Medicinales.* 20(1), 62-74.
- Crowel P. I.** 1999. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. *Journal of Nutrition* 129. 775-778.
- Corpet, D.E., Tarché, S.** 2002. Most effective colon cancer chemopreventive agents in rats: a systematic review of aberrant crypt foci and tumor data. *Nutr Cancer.* 43:1-21.
- Hazemm, M.** 2011. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *World Appl. Sci. J.* 15(8): 1110-1119.
- Jackson, S. J., & Singletary, K. W.** 2004. Sulforaphane: a naturally occurring mammary carcinoma mitotic inhibitor, which disrupts tubulin polymerization. *Carcinogenesis*, 25(2), 219-227.
- Juárez-Vázquez, C. I., & Rosales-Reynoso, M. A.** 2014. Cáncer colorrectal (CCR): alteraciones genéticas y moleculares. *Gaceta Médica de México*, 150(2), 154-164.
- Jucá M. J., Bandeira B.C., Carvalho D.S. and Leal A.T.** 2014. Comparative study of 1,2-dimethylhydrazine and azoxomethane on the induction of colorectal cancer in rats. *Journal of Coloproctology.* 34(3):167-173.
- Kohen, R. y Nyska A.** 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* 30(6): 620-650.
- King E. S. J., Varasdi G.** 1959. Experimentally induced tumors of the intestine. *Aust New Zeal J Surg*; 29:38-53.
- López-Mejía, A.** 2015. Estudio farmacológico de los extractos de hoja y flor de *Callistemon citrinus*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.
- Lodish, B., Berk, A., Zipurski S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., and Darnell, J.** 2003. *Biología Celular y Molecular.* 4a Ed. Edit. Med Panamericana. Pp 1054-1081.



-
- Luk G. D.** 1993. Epidemiology, etiology, and diagnosis of colorectal neoplasia. *Cur Opin Gastroenterology*. 9: 19-27.
- Negrete S., Montenegro M., Borda J. T., y Burna A. N.** 2000. Lesiones neoplásicas tempranas y tumores de colon inducidos con 1,2 dimetilhidrazina en ratas. *Rev. Vet.* 1:1-4.
- NOM-062-ZOO-1999** Norma Oficial Mexicana. 1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Ciudad de México: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. p. 1-58.
- Onose, J. I., Imai, T., Hasumura, M., Ueda, M., & Hirose, M.** 2003. Rapid induction of colorectal tumors in rats initiated with 1, 2-dimethylhydrazine followed by dextran sodium sulfate treatment. *Cancer letters*, 198(2), 145-152.
- Organización Mundial de la Salud.** 2015. Cáncer. Nota descriptiva n°297. Consultado en diciembre de 2017. Disponible en <http://www.who.int/cancer/about/facts/es/>
- Piña Z. R. M.** 2007. Efecto protector de los extractos de verdolaga (*Portulaca oleraceae* L.) sobre un modelo de inflamación-cáncer de colon inducido químicamente en ratas. Tesis de Maestría. PROPAC. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, Querétaro, México.
- Ríos-Chávez P.** 2003. Estudio de la relación entre la síntesis de afininina y el metabolismo de los ácidos grasos insaturados. Tesis Doctoral. CINVESTAV-IPN. Irapuato, Guanajuato, México.
- Saavedra, O. M., Vázquez, E. N. J., Vargas, M. R. B. G., Reyes, G. M. C., & Bolaina, E. M.** (2010). Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. *Rev. Médica Univ. Veracruzana*, 10(2), 32-39.
- Schwartz, J. L.** 1996. The dual roles of nutrients as antioxidants and prooxidants: their effects on tumor cell growth. *The Journal of nutrition*, 126(suppl_4), 1221S-1227S.
- Sedlak, J., & Lindsay, R. H.** (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical biochemistry*, 25, 192-205.
- Tanaka, T.** 1994. Cancer chemoprevention by natural-products. *Oncology reports*, 1(6), 1139-1155.
- Warner EA, Herold AH.** Interpreting laboratory tests. In: Rakel RE, Rakel DP, eds. *Textbook of Family Medicine*. 9th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2016:chap 14.
- Young, A. J., & Lowe, G. M.** (2001). Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Archives of Biochemistry and biophysics*, 385(1), 20-27.



6.3 Capítulo III

Inducción de enzimas antioxidantes y de fase II por los extractos de *Callistemon citrinus* en un modelo de cáncer colorrectal

RESUMEN

La inducción de enzimas antioxidantes y de fase II es uno de los mecanismos importantes implicados en la quimioprevención del cáncer. En este estudio, se evaluó la capacidad de los extractos de hojas y flores de *C. citrinus* para inducir la actividad de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa) y de la fase II (quinona reductasa y glutatión s-transferasa) en un modelo de cáncer de colon inducido con 1,2 dimetilhidrazina (DMH) tras 22 semanas. También se cuantificó el contenido de glutatión (GSH) como un marcador de daño por estrés oxidativo. Los extractos fueron administrados a dosis oral diaria de 250 mg/kg durante todo el experimento. Las actividades se determinaron en el hígado, el colon proximal, medio y distal. La DMH tuvo un efecto negativo disminuyendo la actividad de las enzimas en la mayoría de los tejidos. Por el contrario, los extractos de hojas y flores ayudaron a mantener la actividad igual o incrementarla con respecto al grupo control y nunca menor que el grupo tratado únicamente con el carcinogénico. El contenido de GSH en los diferentes órganos disminuyó únicamente en el grupo tratado con DMH, manteniéndose normal o superior en los tratados con los extractos, lo que indica un menor daño por estrés oxidativo. Los resultados de este estudio demostraron la capacidad de los extractos de *C. citrinus* para inducir la actividad de enzimas de fase II y antioxidantes, y disminuir el daño por estrés oxidativo, que puede ser ventajoso en la prevención y el tratamiento de enfermedades como el cáncer colorrectal.

Palabras clave: *Callistemon citrinus*, enzimas antioxidantes, enzimas de fase II, quimioprotección, cáncer colorrectal, inducción enzimática.

ABSTRACT

Induction of antioxidant and phase II enzymes is one important mechanism involved in cancer chemoprevention. In this study, the capacity of *C. citrinus* leaves and flowers extracts to induce the activity of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase and phase II enzymes (quinone reductase and glutathione s-transferase) were evaluated in a model of colorrectal cancer induced with 1,2-dimethylhydrazine (DMH) after 22 weeks. The content of glutathione (GSH) was also quantified as a marker of oxidative stress damage. The extracts were administered at a daily oral dose of 250 mg / kg. The activities were determined in liver, proximal, middle and distal colon. DMH had a negative effect decreased the activity of enzymes in most tissues. By contrast, the extracts of leaves and flowers help maintain the



activity equal or higher than the control group and never less than the group treated only with the carcinogen. The content of GSH in the different tissues decreased only in the group treated with DMH, remaining normal or superior in the treatments with the extracts, which indicates a lower damage by oxidative stress. The results of this study demonstrated the ability of *C. citrinus* extracts to induce the activity of phase II and antioxidant enzymes, and reduce damage by oxidative stress, which can be used in the prevention and treatment of diseases such as cancer colorectal.

Keywords: *Callistemon citrinus*, antioxidant enzymes, phase II enzymes, enzymatic induction, chemoprevention, colorrectal cancer.

INTRODUCCIÓN

La quimioprevención se define como “el uso de sustancias naturales o sintéticas para reducir el riesgo de desarrollar cáncer o reducir las posibilidades de que el cáncer vuelva a aparecer” (Sporn, 1976). Entre los mecanismos de quimioprevención se pueden incluir la inducción de enzimas de fase II y de enzimas antioxidantes, así como la inhibición de enzimas activadoras de carcinogénicos (Piña, 2007).

El inicio del proceso de carcinogénesis es en muchos casos el resultado del daño al ADN por metabolitos carcinógenos electrófilos, o por especies reactivas de oxígeno que surgen durante el metabolismo carcinógeno o procesos celulares endógenos. Las células de los mamíferos han desarrollado mecanismos múltiples y elaborados para la protección contra tales compuestos tóxicos. Estos mecanismos de protección desarman y facilitan la eliminación de electrófilos reactivos y ROS. Hay mucha evidencia en la literatura que indica que la elevación de las enzimas de la fase II y de los niveles de glutatión por compuestos bioactivos da como resultado la protección contra los carcinógenos químicos. De hecho, la modulación del metabolismo de los carcinógenos es una de las estrategias más efectivas y bien establecidas para proteger a los animales y sus células contra los efectos tóxicos y neoplásicos de los carcinógenos (Talalay *et al.*, 1995).

Así mismo, se sabe que los mecanismos por los que ciertos carcinógenos causan carcinogénesis están mediados por los radicales libres. Por ejemplo, se ha demostrado que las hidrazinas y sus derivados producen especies reactivas de oxígeno, inducen procesos de daño al ADN y promueven la carcinogénesis. Este tipo de carcinógenos pueden ser



eliminados por los mecanismos depuradores de radicales libres incluyendo los sistemas enzimáticos (enzimas superóxido dismutasa, peroxidasa y catalasas) y los no enzimáticos (como el glutatión). Estos sistemas de defensa antioxidante actúan protegiendo los componentes celulares del ataque de peróxidos y radicales libres, y altera así los eventos en el proceso de la tumorigénesis pues capturan directamente los radicales libres o interfieren con la generación de eventos mediados por radicales libres e inhiben el proceso neoplásico (Sengottuvelan *et al.*, 2006).

En el caso del cáncer colorrectal, es particularmente alto el interés por encontrar compuestos que actúen en su prevención, debido a que, en la mayoría de los casos, cuando es diagnosticado sucede en estadios tan avanzados que la supervivencia promedio es de solo 5 años. Además, es uno de los tipos de cáncer cuya aparición se asocia más a factores ambientales que a hereditarios y se ha estimado que hasta el 90% de todos los casos de cáncer colorrectal podrían prevenirse (Beiggleter *et al.*, 2003).

Callistemon citrinus contiene un importante número de compuestos bioactivos y se ha demostrado en el capítulo previo su efecto para disminuir el proceso carcinogénico. Uno de los posibles mecanismos podría ser vía inducción de enzimas de fase II y de enzimas antioxidantes por lo que el objetivo de este capítulo es determinar la capacidad de inducción de estas enzimas por los extractos de *C. citrinus* en un modelo de cáncer de colon inducido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelo de cáncer de colon y muestras biológicas

El modelo de cáncer de colon corresponde al descrito en el capítulo II de la presente tesis. Se tomaron muestras de hígado y de las tres zonas del colon: proximal, media y distal de los cuatro grupos: control, DMH, DMH + extractos de flores y DMH + extractos de hojas, que fueron congeladas a -20°C hasta que fueron procesadas.

Preparación de homogenados citosólicos

Se pesaron 0.25 g de hígado y de las diferentes partes de colon (proximal, medio y distal) y fueron homogenados en un mortero añadiendo 1 mL de una solución buffer de fosfatos 0.1



M con SDS 1%. Se colocaron en tubos Eppendorf y centrifugaron dos veces: la primera vez por un periodo de 20 minutos a 13 000 rpm (4°C) y la segunda durante cinco minutos a la misma velocidad y temperatura. Se recuperó el sobrenadante y este fue congelado a -20°C hasta su posterior utilización.

Determinaciones enzimáticas de la fase II

- Quinona reductasa (QR)

Siguiendo la metodología de **Pérez et al.**, (2009) se preparó una solución que contenía buffer Tris HCl 25 mM pH 7.5, albúmina 0.18 mg/mL, flavin adenin dinucleótido (FAD) 5 µM, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) 0.2 mM y 2,6 – dicloro fenol indol fenol (DCPIP) 40 µM en un volumen final de 1 mL, al que se le añaden 10 µL de homogenado citosólico. Se midió la absorbancia a 600 nm durante un minuto.

- Glutación S-transferasa (GST)

La determinación se llevó a cabo según el método establecido por **Habig et al.**, (1974) y modificado por **Poor** (2014). Se preparó una solución que contenía 980 µL de buffer de fosfatos 0.1 M pH 6.5, 10 µL de GSH 10 mM y 10 µL de CDNB (1,cloro,2,4-dinitrobenceno) 100 mM. Se tomaron 900 µL de esta solución y se añadieron 100 µL de muestra citosólica. Posteriormente se incubó por 5 minutos a 30°C y se midió la absorbancia a 340 nm cada minuto durante 5 minutos.

Determinaciones enzimáticas del sistema de defensa antioxidante

- Superóxido dismutasa (SOD)

Se llevó a cabo modificando el protocolo establecido por **Giannopolitis** (1976). Con esta metodología se mide la disminución de la producción de azul de formazán por efecto de la actividad de la enzima.



Se colocaron 10 µL de muestra problema y se añadieron 40 µL de EDTA 0.1 M, 600 µL de buffer de fosfato monobásico de potasio (KH₂PO₄) 0.067 M pH 7, 50 µL de riboflavina 0.12 mM, 20 µL de nitroblue tetrazolium (NBT) 1.5 mM. Posteriormente se colocó durante diez minutos en luz bajo una lámpara de 40 W. La absorbancia de la muestra se midió a 560 nm. Se prepararon dos blancos: uno se coloca en oscuridad y otro en la luz.

Para determinar la actividad de la SOD por unidad se usó la siguiente fórmula (**Moreno et. al., 2010**):

$$UASOD = (V/v)-1$$

Donde:

UASOD es la unidad de actividad de SOD, V y v representan la absorbancia en ausencia y presencia de SOD respectivamente. Posteriormente para determinar la actividad enzimática específica (UASOD) se utilizó la formula siguiente:

$$UAE_{SOD} = UASOD / \text{mg de proteína}$$

- Catalasa (CAT)

Este ensayo se basa en el efecto de la catalasa sobre el H₂O₂ generando agua y oxígeno molecular como productos finales. Por lo tanto, se midió la disminución de la absorbancia del H₂O₂ como resultado a su degradación (**Kohen y Nyska, 2002**). La actividad de esta enzima se determinó usando el método de **Aebi** (1984). En celdas de cuarzo se colocó 900 µL de buffer de fosfato (50 mM, pH 7), 1 µL de muestra, además de 50 µL de H₂O₂ (30 mM), y de inmediato se mide la absorbancia a 240 nm, durante 3 minutos a intervalos de 30 segundos.

Para calcular la actividad de esta enzima se usó la siguiente fórmula:

$$K = (2.3/T) (\log 10 A_1/A_2) (FD)$$

Donde:

K= Actividad de la catalasa

2.3= Coeficiente de extinción



T= Intervalo de tiempo

Log A1/A2= Logaritmo base 10 de la diferencia entre la absorbancia mayor y menor en los 3 minutos

FD= Factor de dilución

La diferencia en la absorbancia (ΔA_{240}) por unidad de tiempo es medida la actividad de la catalasa.

- Glutación peroxidasa (GPx)

La enzima glutación peroxidasa se determinó siguiendo una adaptación del método establecido por **Prabhu et al.**, (2001): En un volumen de 1 mL se colocó NADPH (0.5mM), glutación reducido (100mM), 1 U de la enzima glutación reductasa, buffer de fosfatos 50 mM pH 7, cucumeno 30 mM y la muestra problema (en un volumen no mayor a 100 μ L). Se midió la absorbancia a 340 nm cada 30 segundos por 5 minutos.

$$\text{Units/mg} = (\Delta A/\text{min}) / (26.6 * \text{mg homogenado})$$

Donde:

Units/mg= Actividad específica por miligramo de proteína por mililitro

$\Delta A/\text{min}$ = Diferencia entre la absorbancia mayor y menor por minutos registrados

26.6= Coeficiente de extinción

Niveles de glutación reducido

Siguiendo el método de **Sedlak y Lindsay** (1968) en tubos de ensayo se colocó un volumen de 20 μ L de muestra problema, se completó a 500 μ L con buffer Tris HCl pH 8.2 0.2 M, se añadió 25 μ L de reactivo de Ellmans (DTNB) 0.01 M y se completó a un volumen final de 2.5 mL con metanol. Se mezcló por 5 minutos en agitación y se midió a 412 nm. Las muestras que mostraron turbidez fueron centrifugadas por 15 minutos antes de ser leídas. Para la curva patrón se utilizó glutación reducido (GSH) 2mM.



Este método se fundamenta en la reacción del DTNB con grupo tiol del glutatión dando como resultado una mezcla de disulfuro y TNB (5-mercapto-2-nitrobenzoico), que es lo que se cuantifica espectrofotométricamente.

Cuantificación de proteínas

Se midió la concentración de proteínas de los homogenados citosólicos siguiendo el método de Bradford (1976) tal y como se describe en el capítulo II de la presente tesis.

Análisis estadístico

Los datos numéricos obtenidos fueron analizados y procesados utilizando el programa de Microsoft Excel 2016 y el programa GraphPad Prism 6.0 para Windows. Fueron comparados mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), así como las pruebas de comparación múltiple de Dunn's, considerando tres niveles de significancia: * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$ y *** $P \leq 0.001$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad de las enzimas de defensa antioxidantes

Superóxido dismutasa (SOD)

La actividad de la enzima SOD fue determinada en hígado, colon proximal, medio y distal (Fig.15). En el hígado la actividad enzimática fue mayor que en el colon.

En el grupo tratado únicamente con DMH, hubo una disminución significativa ($p \leq 0.05$) de la actividad de SOD en el colon medio y en el colon distal respecto al grupo control. Esta disminución de la actividad corresponde a las zonas donde se presentaron más cantidad de tumores y de FCA (ver capítulo II).

En el grupo con cáncer inducido pero administrado con el extracto de hojas, la actividad de esta enzima no es diferente estadísticamente al grupo control en ninguno de los tratamientos.



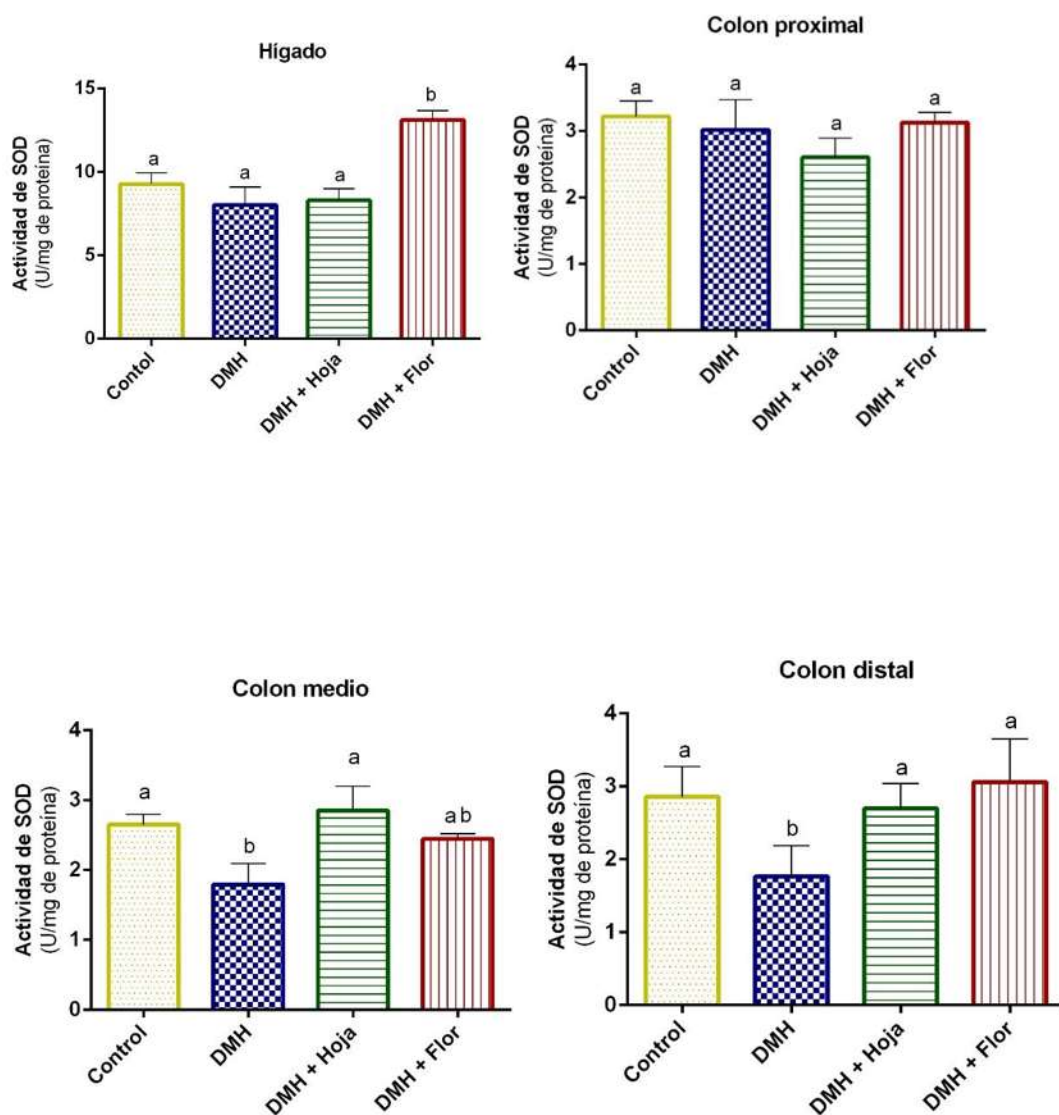


Fig. 15 Actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en los distintos tejidos: hígado y colon proximal, medio y distal. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de un mismo tejido (Dunn, $p \leq 0.05$, $n=3 \pm SD$)



La enzima SOD cataliza la dismutación del anión superóxido (O_2^-) en peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y oxígeno molecular (O_2), por lo que se considera la primera línea de defensa contra los radicales libres (**Katzung et al.**, 2004). La importancia fisiológica de la SOD es ilustrada por las severas patologías que se evidencian en ratones genéticamente modificados para que carezcan de esta enzima. Los ratones sin la isoforma SOD2 mueren a los pocos días de nacer por estrés oxidativo masivo mientras que aquellos que carecen de la isoforma SOD1 desarrollan una gran variedad de patologías, incluyendo cáncer de hígado (**Muller et al.**, 2006).

Se ha reportado la disminución de la actividad de la SOD en la mayor parte de las células tumorales. Igualmente se ha demostrado que los tumores producen más radicales superóxido que los tejidos normales, y que este compuesto juega un papel importante en la promoción de la carcinogénesis. En conjunto, la disminución de la actividad de SOD junto con la producción excesiva de radicales pueden conducir a muchas de las propiedades observadas de las células cancerosas (**Oberley**, 1979).

Los resultados indican que el extracto de hojas de *C. citrinus* ayuda a mantener los niveles normales de SOD después de la inducción de cáncer colorrectal, lo que se traduce como un efecto positivo puesto que podría prevenir el daño causado por la generación excesiva de ROS en el cáncer.

Catalasa (CAT)

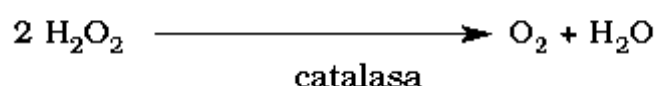
La actividad de la catalasa en los distintos tejidos se muestra en la figura 16. Los datos obtenidos muestran una disminución importante de la actividad de esta enzima en el colon proximal del grupo DMH ($p \leq 0.05$) respecto a los demás tratamientos. En el resto de los tejidos se comporta similar al grupo control.

En el grupo con cáncer inducido pero administrado con los extractos de hoja, hay un aumento importante de la actividad de la CAT en el hígado, en el colon medio y en el colon proximal. La actividad de CAT en el grupo tratado con el extracto de flor también es superior al control en hígado y en colon medio.



En ninguno de los grupos tratados con los extractos, ya sea de hoja o flor, la actividad es menor que le grupo tratado únicamente con el carcinógeno y siempre igual o superior al grupo control.

La enzima catalasa es un tipo de peroxidasa, y su función es catalizar la descomposición del peróxido de hidrogeno en oxígeno molecular y agua a través de la siguiente reacción:



El peróxido de hidrógeno es un residuo del metabolismo celular producido por la SOD (**Katzung et al., 2014**) y a altas concentraciones resulta tóxico por lo que la presencia de CAT es de vital importancia en las células.

En un estudio llevado a cabo en 2001 por **Skrzydowska et al.**, se encontró una disminución significativa de la actividad de CAT en tejidos tumorales de pacientes con cáncer de colon. Al igual que con SOD, un aumento de la actividad de CAT, se traduce como una mayor protección contra el estrés oxidativo, por lo que el hecho de que los extractos ayuden a elevar la actividad de esta enzima es altamente significativo.

Glutación peroxidasa (GPx)

La enzima glutación peroxidasa, es un tipo de peroxidasa que cataliza la reacción de oxidación de glutación a glutación disulfuro utilizando para ello peróxido de hidrógeno. Utiliza como cofactor el selenio y la reacción esta acoplada a la reacción catalizada por la enzima glutación reductasa (GSR), que es la encargada de reducir el glutación disulfuro a GSH, formando así un ciclo de oxidación-reducción, que permite al GSH ser reutilizado (**Katzung et al., 2004**).

La actividad de la enzima glutación peroxidasa (GPx) se representa en los gráficos de la figura 17.



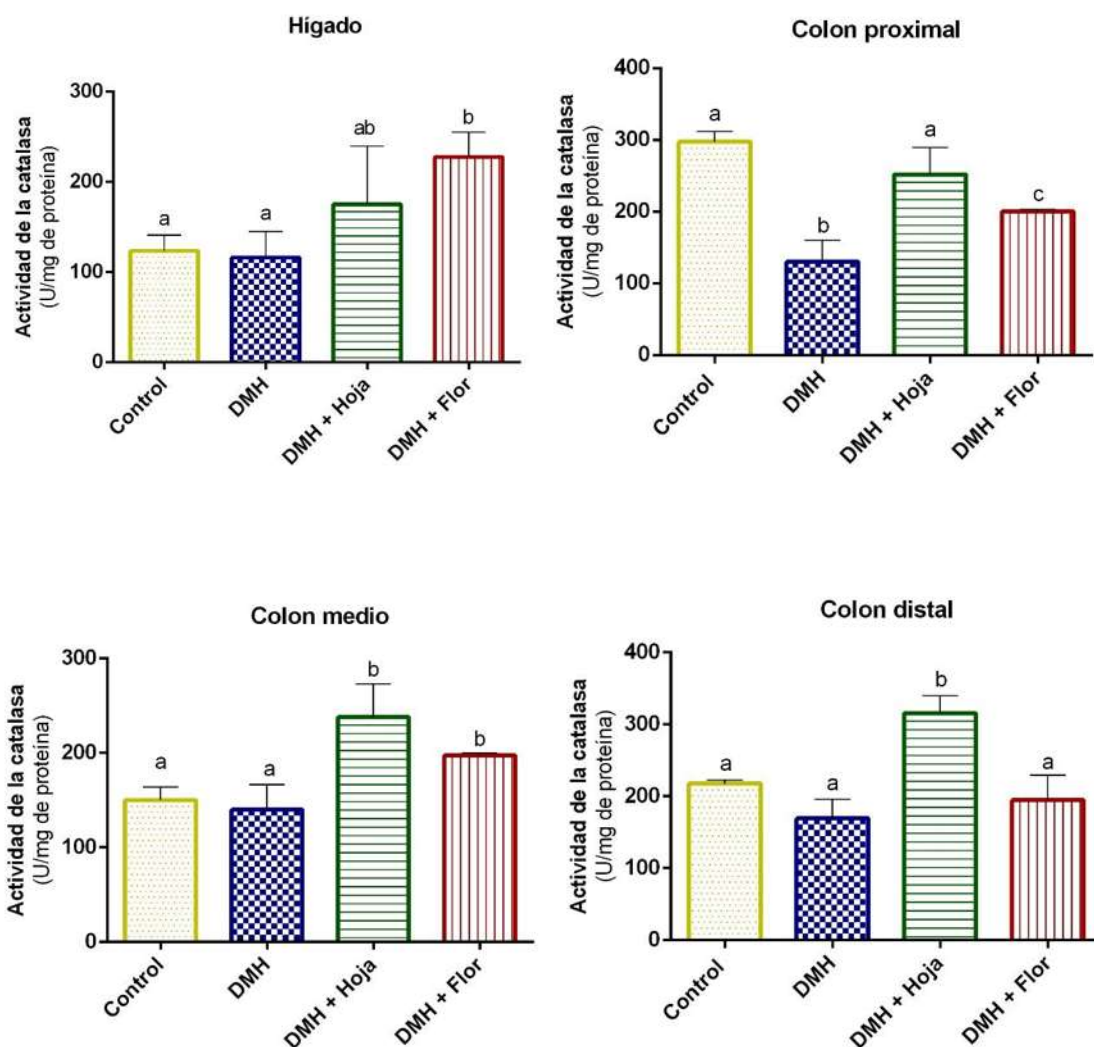


Fig. 16 Actividad enzimática de la catalasa (CAT) en distintos tejidos: hígado y colon proximal, medio y distal. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de un mismo tejido (Dunn, $p \leq 0.05$, $n=3 \pm SD$)



En el hígado, la actividad de GPx fue menor en todos los tratamientos respecto al grupo control, sin embargo, únicamente en el grupo tratado solo con DMH esta disminución es significativa estadísticamente ($p \leq 0.05$).

En el colon proximal, la actividad de GPx también fue menor en el grupo DMH respecto al resto de los tratamientos. En cambio, en los grupos tratados con los extractos, la actividad de esta enzima fue notablemente mayor que el grupo control (casi un 40%) para ambos extractos.

Solamente en el colon medio, la actividad de GPx en el grupo tratado con extracto de hojas fue menor que en el resto de los tratamientos. En la zona distal, en cambio, el grupo DMH fue el que presentó una menor actividad de GPx que el resto de los tratamientos.

La actividad en el grupo tratado con el extracto de flor fue siempre mayor que el control en las tres zonas del colon.

Al igual que la SOD y CAT el principal papel de GPx como protector en el cáncer se encuentra dado por su capacidad para neutralizar especies reactivas de oxígeno y el papel que juega en el mantenimiento del equilibrio oxidativo.

Otro mecanismo posible, puede estar relacionado con el selenio. Hay una amplia evidencia que demuestra el efecto protector del selenio contra ciertos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer colorrectal, aunque el mecanismo completo todavía es desconocido. El hecho de que el selenio sea cofactor de la glutatión peroxidasa y de otras enzimas como la tiorreoxina reductasa (TR) podría estar implicado dado el importante papel fisiológico que realizan estas enzimas (**Gladyshev et al.**, 1998).

La GPx es una de las enzimas que se ha reportado puede ser inducida por compuestos bioactivos presentes en la dieta. Se ha demostrado que la genisteína, una isoflavona, es capaz de inducir la glutatión peroxidasa en células de cáncer de próstata (**Suzuki et al.**, 2002).



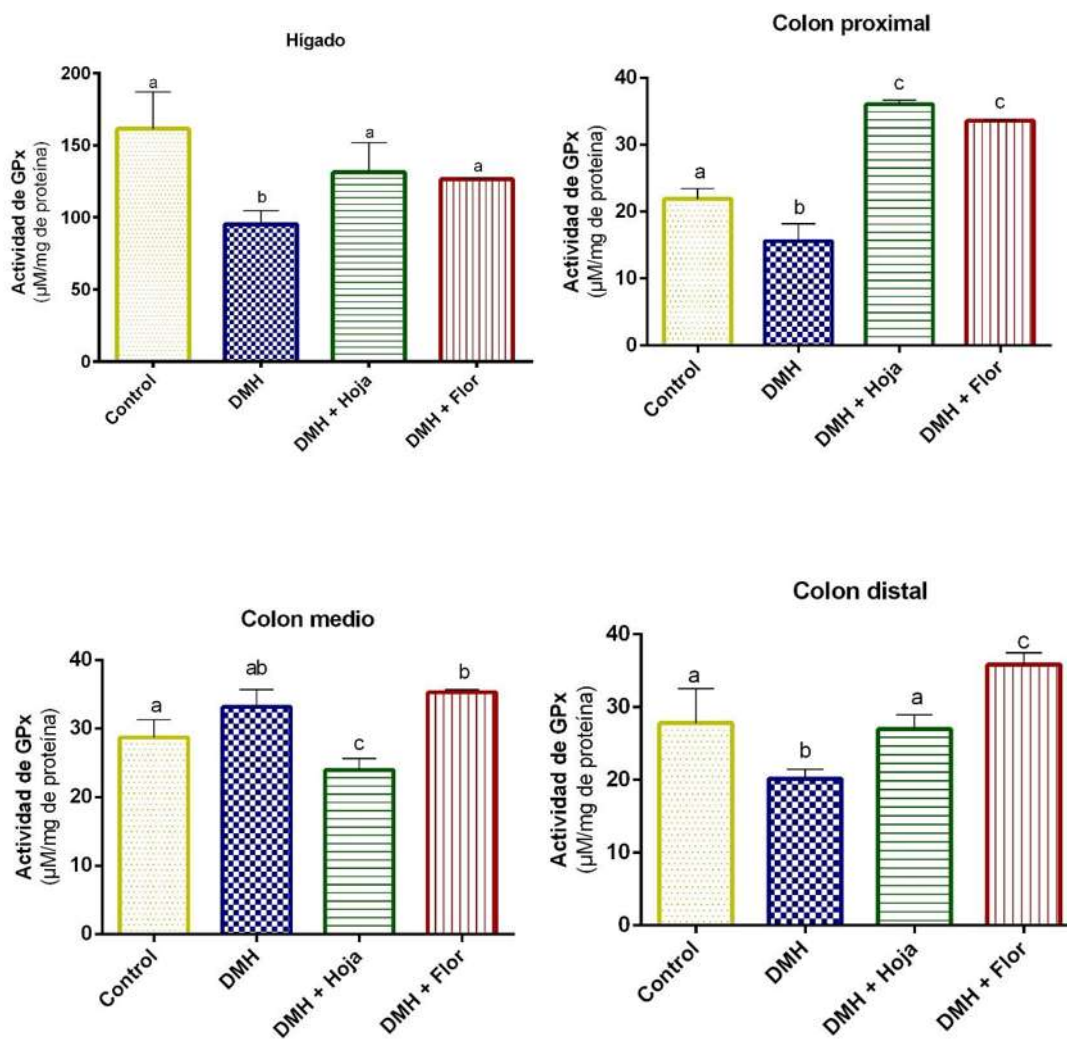


Fig. 17 Actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) en hígado, colon proximal, colon medio y colon distal. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de un mismo tejido (Dunn, $p \leq 0.05$, $n=6$ (hígado) y $n=3$ (colon) $\pm$ SD)



Actividad de las enzimas de la fase II

Quinona reductasa (QR)

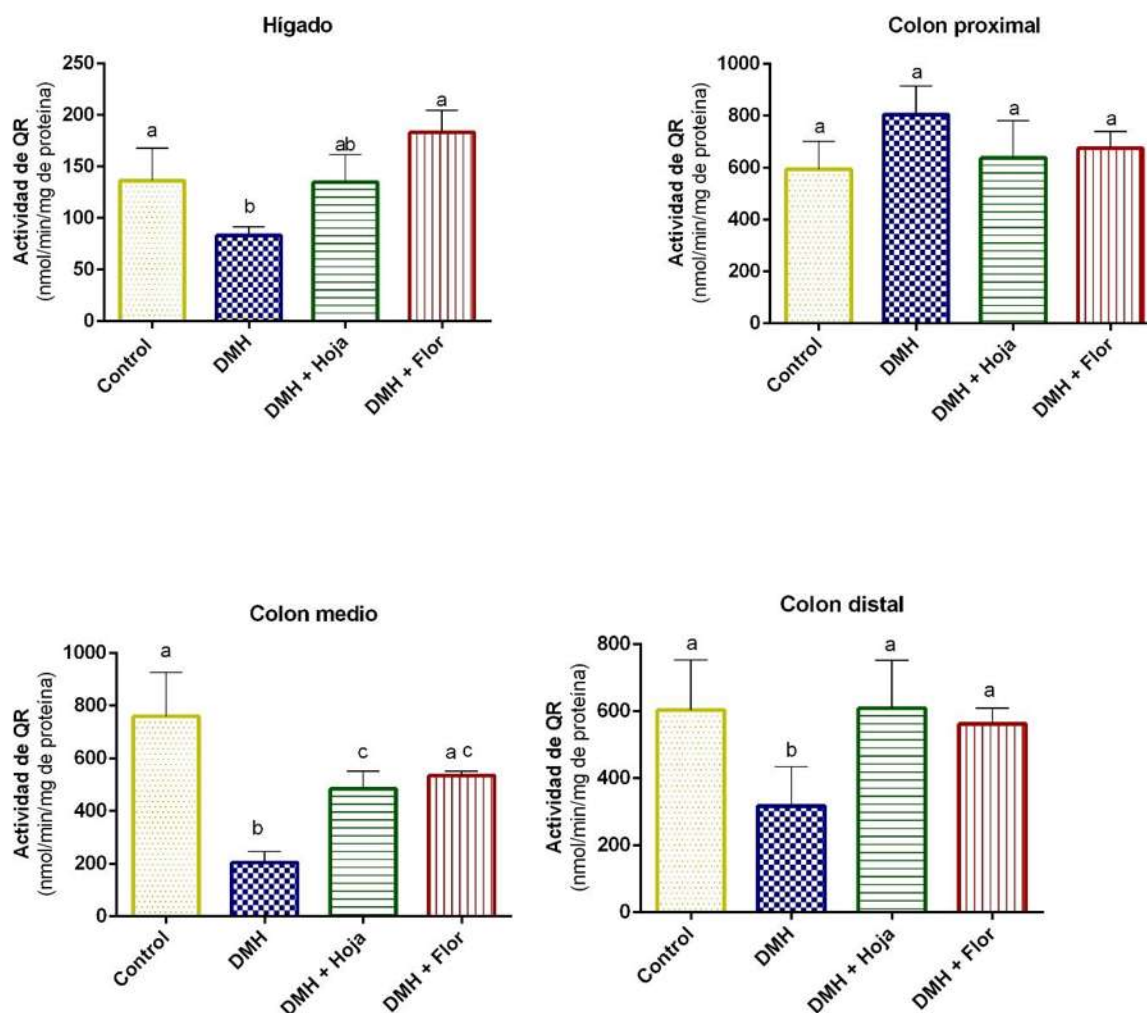


Fig. 18 Actividad de la enzima quinona reductasa (QR) en hígado, colon proximal, colon medio y colon distal. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de un mismo tejido (Dunn $p \leq 0.05$, $n=6$ (hígado) y $n=3$ (colon) $\pm$ SD).



La actividad de la enzima quinona reductasa se muestra en los gráficos de la figura 18. El grupo tratado únicamente con DMH mostro una disminución significativa respecto al control de la actividad de la QR en el hígado (40% menos), el colon medio (71% menos) y el colon distal (43% menos). Nuevamente, la disminución de la actividad de esta enzima corresponde con aquellas zonas donde se presentaron la mayor cantidad de tumores y FCA. En el hígado, los grupos tratados con los extractos mostraron una actividad de la QR muy similar al grupo control. En el colon proximal no hubo diferencia entre ninguno de los tratamientos, mientras que en el colon medio, los grupos tratados con los extractos de hojas y flores mostraron una disminución de la actividad de la enzima respecto al control, pero superior a la del grupo DMH.

El hecho de que en la mayoría de los tejidos la actividad de esta enzima sea similar al control, indica que los extractos de *C. citrinus* ayudan a mantener la función normal de la QR. Esto podría estar relacionado con la disminución del número de tumores y de lesiones precancerosas (AFC) en los grupos tratados con los extractos.

Glutación S-transferasa (GST)

La glutatión S-transferasa fue la última de las 5 enzimas analizadas. Los resultados se muestran en la figura 19.

La actividad de esta enzima en el hígado fue notablemente mayor en el único individuo tratado con el extracto de flores que sobrevivió al final del experimento. En el resto de los tratamientos no hay diferencia en cuanto a la actividad de esta enzima en este órgano.

En el colon proximal y el colon distal, disminuyo notablemente la actividad de la GST en el grupo tratado con DMH respecto al grupo control (un 52% y un 33% menos respectivamente).



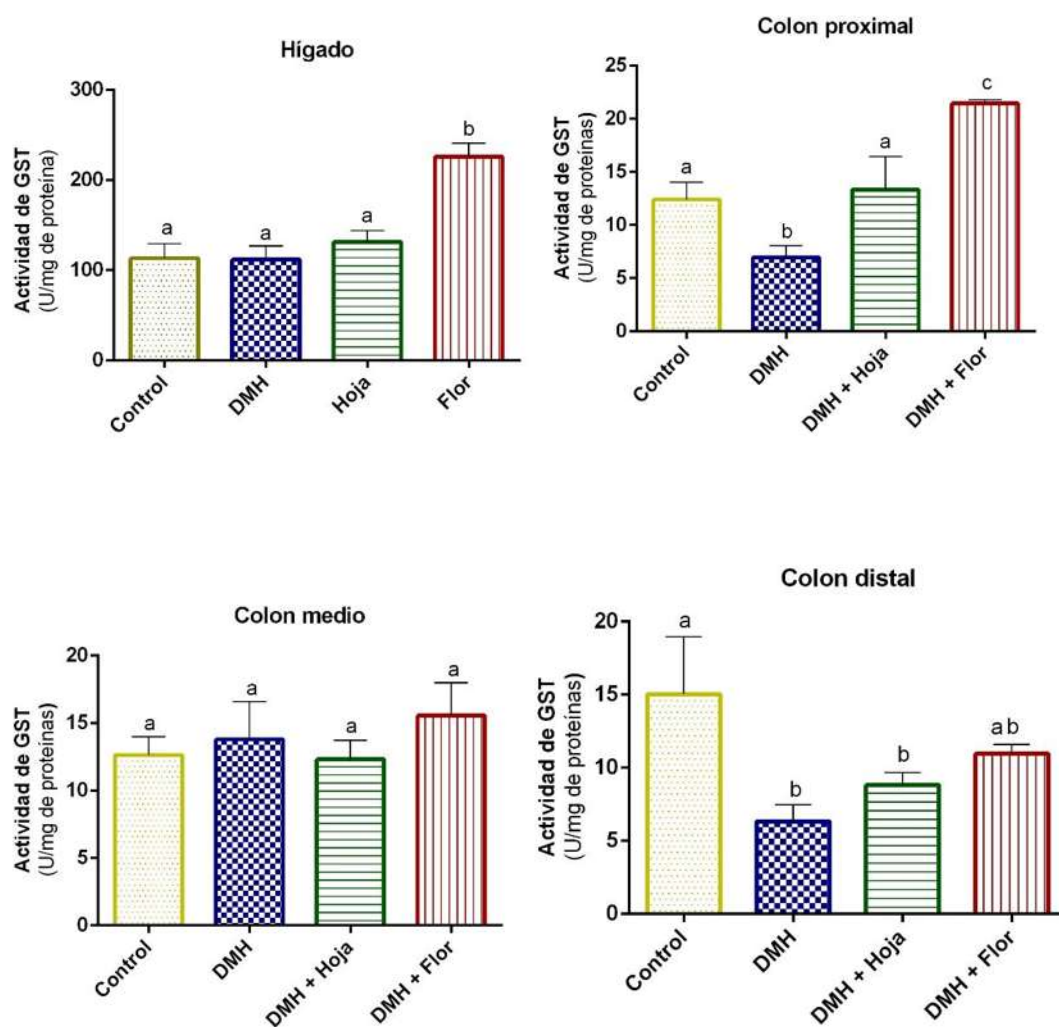


Fig. 19 Actividad de la enzima glutatión S-transferasa en hígado, colon proximal, colon medio y colon distal. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de un mismo tejido (Dunn, $p \leq 0.05$, $n=3 \pm SD$)



En la zona media del colon no hubo diferencia alguna entre los distintos tratamientos. En el grupo tratado con los extractos de hojas, la actividad de la enzima se mantuvo muy parecida al grupo control en hígado, colon proximal y colon medio, mostrando únicamente una disminución estadísticamente significativa en el colon distal.

Nuevamente, en ninguno de los casos, la actividad de la enzima en los grupos tratados con los extractos fue menor que el grupo tratado únicamente con el carcinógeno.

Muchos estudios recientes han demostrado que la elevación de las enzimas de fase II, como NAD (P) H: quinona reductasa (QR) y GST, se correlaciona con la protección contra la carcinogénesis inducida por productos químicos en modelos animales, en la etapa de promoción, así como la iniciación (**Boone**, 1992).

La carcinogénesis es un proceso de múltiples etapas complejo y prolongado, aunque el curso completo puede iniciarse por un único evento en el que una macromolécula celular es dañada por un agente endógeno o exógeno. Las estrategias para proteger a las células de estos eventos iniciadores incluyen enzimas metabólicas decrecientes responsables de generar especies reactivas (enzimas de fase I) mientras que aumentan las enzimas de fase II que pueden desactivar radicales y electrófilos que se sabe que intervienen en procesos celulares normales. La reducción de las quinonas electrofílicas por QR es una importante vía de desintoxicación, que convierte las quinonas en hidroquinonas y reduce el ciclo oxidativo. (**Ross et al.**, 2000; **Talalay**, 2000)

Los inductores enzimáticos son de dos tipos: monofuncionales y bifuncionales. Los inductores bifuncionales aumentan las enzimas de fase II y las enzimas de fase I, tales como aril hidrocarbonato hidroxilasa, y se unen con alta afinidad al elemento de respuesta xenobiótica (XRE) del receptor arilo hidrocarburo (Ah). Los inductores monofuncionales inducen selectivamente las enzimas de fase II y activarán el elemento de respuesta antioxidante (ARE) a través de Keap1 y Nrf2. (**Sogawa y Kuriyama**, 1997; **Dinkova et al.**, 2002) Dado que las enzimas de fase I pueden activar procarcinógenos a sus especies reactivas últimas, los agentes monofuncionales que inducen selectivamente enzimas de fase II serían teóricamente candidatos más deseables para la quimioprevención del cáncer. Además, se anticiparían los inductores enzimáticos de fase II selectivos para servir como



anticarcinógenos al principio del proceso de carcinogénesis, pero se ha establecido que también es posible la inhibición de la carcinogénesis en etapas posteriores (**Talalay**, 2000).

Debido a que los extractos únicamente fueron probados con enzimas de la fase II, no es posible catalogarlos como inductores monofuncionales o bifuncionales.

Así mismo se ha demostrado que la elevación QR con sistemas *in vitro* e *in vivo* se correlaciona con la inducción de otras enzimas de fase II protectoras y proporciona un biomarcador razonable para el efecto quimioprotector potencial de los agentes de prueba contra el inicio del cáncer (**Pezzuto**, 1997). Esto quedó demostrado en el presente estudio, debido a que los extractos de *C. citrinus* tuvieron un efecto inductor de la actividad tanto en la quinona reductasa como en la glutatión S-transferasa.

Un caso particular de estudio de inducción de enzimas de fase II por productos naturales es de los fitoestrógenos, un grupo de compuestos difenólicos naturales presentes en la dieta. El alto consumo de alimentos ricos en fitoestrógenos se ha relacionado con una incidencia reducida de cánceres en muchos sitios. Un estudio llevado a cabo por **Wang et al.**, en 1999, examinó la capacidad de seis fitoestrógenos prominentes para afectar la expresión celular de QR en células de colon. Las células Colo205 se cocultivaron con diversas concentraciones (0,001 a 10,0 μM) de cada fitoestrógeno, y luego se evaluaron la actividad de la QR citosólica, el crecimiento celular y la expresión del ARNm QR. Se observó una inducción máxima de 6 a 8 veces de actividad QR tanto para enterolactona como para genisteína, aunque a altas concentraciones mostraron un efecto adverso sobre el crecimiento celular. Las concentraciones requeridas para duplicar la actividad específica de QR para enterolactona y genisteína fueron aproximadamente 0.04 y 0.14 μM , respectivamente. Se encontró un aumento de 2 a 3 veces de la actividad específica de QR con tratamientos de biochanina A (1,1 μM) o cumestrol (12,0 μM). No se encontraron efectos significativos para los tratamientos con daidzeína o formononetina. La inducción de QR se confirmó adicionalmente utilizando técnicas de transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) para medir la expresión de ARNm. Se observó una correlación significativa entre la expresión del ARNm QR y la actividad QR correspondiente ($r = 0.76$, $P < 0.001$). Los resultados demostraron que ciertos fitoestrógenos dietéticos son capaces de inducir QR en células Colo205 promoviendo la expresión del ARNm QR y sugieren un nuevo



mecanismo por el cual los compuestos fenólicos pueden estar implicados en la quimioprevención del cáncer colorrectal (Wang 1998).

En el 2007 **Piña** evaluó el potencial inductor de enzima de fase II de los extractos de verdolaga del estado de Querétaro, México en un modelo de carcinogénesis con 1,2 dimetilhidrazina asociado a inflamación. Los resultados que obtuvo, demuestran que la administración intragástrica de los extractos acuosos y etanólicos son capaces de inducir la actividad de la enzima glutatión S-transferasa a distintas dosis (10, 50, 100 y 200 mg/Kg de peso corporal) obteniéndose la mayor inducción con el extracto acuoso a dosis de 100 mg/kg. La inducción de enzimas de fase II parece ser una condición suficiente para obtener la quimioprevención y se puede lograr en muchos tejidos diana mediante la administración de cualquiera de una diversidad de agentes químicos de origen natural y sintéticos (**Pezzuto**, 1997).

Contenido de glutatión reducido (GSH)

Finalmente, se cuantificó la concentración de glutatión reducido (GSH) en los diferentes tejidos como un biomarcador de daño por estrés oxidativo (Fig. 20).

En el hígado, solamente el grupo tratado con DMH mostró una disminución significativa ($p \leq 0.01$) de los niveles de GSH respecto al resto de los grupos (cerca de un 20% menos).

En el colon proximal no hubo diferencia entre los tratamientos, aunque se observó una ligera tendencia de aumento de GSH en los grupos tratados con los extractos. Esta tendencia se observó nuevamente en el colon medio, donde la diferencia si fue significativamente mayor respecto al control. El grupo DMH nuevamente presentó los niveles más bajos de GSH en esta zona del colon (la mitad de los niveles del control). En la zona distal, los grupos tratados con los extractos mostraron un aumento significativo de los niveles de GSH respecto a los grupos control y DMH. El aumento de los niveles de glutatión corresponde con el aumento observado de la actividad de las enzimas glutatión S-transferasa y glutatión peroxidasa.

El glutatión juega un papel muy importante en el metabolismo celular. Participa tanto en los procesos de detoxificación de xenóbioticos (a través de reacciones de conjugación), como en la defensa antioxidante (es un compuesto altamente reductor). Debido a que en la literatura se reporta que las disminuciones de los niveles de este marcador están directamente



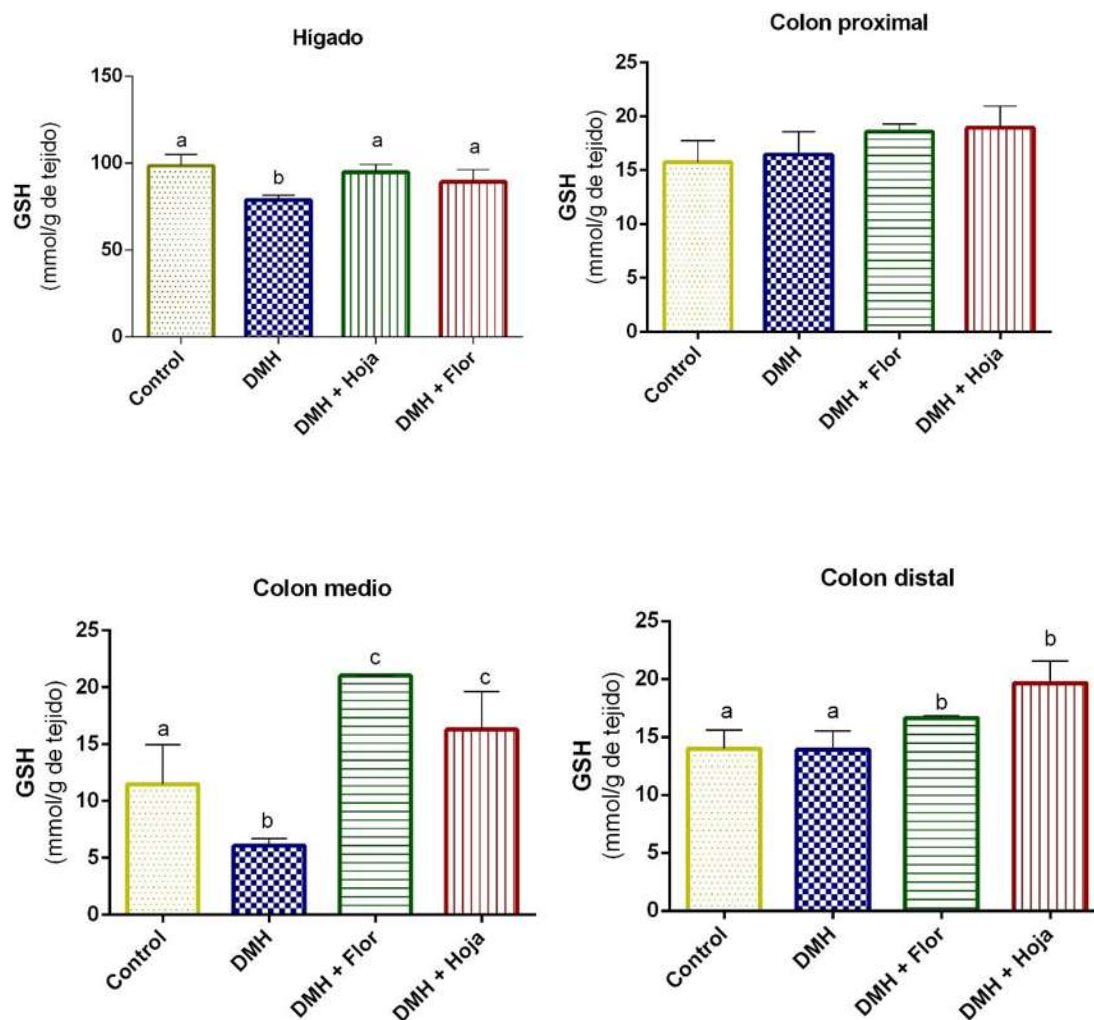


Fig. 20 Contenido de glutatión reducido (GSH) en hígado, colon proximal, colon medio y colon distal. El hígado presenta mayores niveles de GSH. La disminución de GSH indica daño por estrés oxidativo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de un mismo tejido (Tukey $p \leq 0.05$, $n=3 \pm SD$)



relacionados con un daño por estrés oxidativo (lipoperoxidación de las membranas celulares) (**Pérez-Mora**, 2016), el hecho de que en la presente investigación los extractos de *C. citrinus* ayuden a mantener los niveles de GSH constantes (o en algunos casos, aumentarlos) es de notable interés.

Un estudio realizado por **Spitz et al.** (1991) demostró que un aumento de los niveles de GSH y GST *in vitro* resultaron en un aumento de destoxificación de 4-hidroxi-2-nonenal (4HNE), un aldehído tóxico formado como subproducto de la lipoperoxidación, dado que una mayor actividad de GST facilita la desaparición más rápida de 4HNE y la reacción depende todavía de la concentración de GSH, razón por la cual, sus resultados sugieren que GSH y GST proporcionan una vía biológicamente significativa para la protección contra los subproductos aldehídicos de la lipoperoxidación.

En otro estudio realizado por **Devasena et. al.**, (2006) investigó el efecto modulador y antioxidante de bis-1,7-(2-hidroxifenil)-hepta-1,6-dieno-3,5-diona, un análogo de bisdemetoxi-curcumina (BDMCA; también conocido por su propiedad anticancerígena) sobre la lipoperoxidación circulatoria durante la carcinogénesis de colon inducida por la 1,2-dimetilhidrazina en ratas macho Wistar. Su investigación demostró que el aumento en la incidencia de tumores, así como la mayor peroxidación lipídica en la circulación de ratas con tumores, se acompañó de una disminución significativa de las actividades de la SOD, CAT, GPx y GST, y en el nivel del glutatión reducido. Esto corrobora nuestros resultados y el hecho de que el extracto de *Callistemon citrinus* ayudo a elevar y mantener los niveles de actividad enzimática y de GSH aun durante el desarrollo del cáncer es un importante descubrimiento como mecanismo de quimioprevención

CONCLUSIÓN

Los extractos de hojas y flores de *C. citrinus* inducen la actividad de enzimas antioxidantes y de fase II, y mantienen normales los valores de glutatión, disminuyendo el daño por estrés oxidativo en el cáncer de colon.



LITERATURA CITADA

Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol. Science Direct Journals*. 105:121-126.

Begleiter, A., Sivananthan, K., Curphey, T. J., y Bird, R. P. (2003). Induction of NAD (P) H quinone: oxidoreductase1 inhibits carcinogen-induced aberrant crypt foci in colons of Sprague-Dawley rats. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 12(6), 566-572.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:244

Boone, C. W., Steele, V. E., y Kelloff, G. J. (1992). Screening for chemopreventive (anticarcinogenic) compounds in rodents. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 267(2), 251-255.

Cuendet, M., Oteham, C. P., Moon, R. C., y Pezzuto, J. M. (2006). Quinone reductase induction as a biomarker for cancer chemoprevention. *Journal of natural products*, 69(3), 460-463.

Das, D., Arber, N., y Jankowski, J. A. 2007. Chemoprevention of colorectal cancer. *Digestion*, 76(1), 51-67.

Devasena, T., Menon, V. P., y Rajasekharan, K. N. 2006. Prevention of 1,2-dimethylhydrazine-induced circulatory oxidative stress by bis-1,7-(2-hydroxyphenyl)-hepta-1,6-diene-3,5-dione during colon carcinogenesis. *Pharmacological Reports*. 58(2): 229-235.

Dinkova-Kostova, A. T., Holtzclaw, W. D., Cole, R. N., Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y. y Talalay, P. (2002). Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(18), 11908-11913.

Gendler S. 1984. Uric Acid. *Clin Chem*; 16: 1268-1273

Giannopolitis C.N, y Reis S.K. (1997) Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol*. 59:309-314.

Gladyshev, V. N., Factor, V. M., Housseau, F., y Hatfield, D. L. (1998). Contrasting patterns of regulation of the antioxidant selenoproteins, thioredoxin reductase, and glutathione peroxidase, in cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 251(2), 488-493.

Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. 1974. Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*. 249 (22), 7130-7139.



Jänne, P. A., y Mayer, R. J. (2000). Chemoprevention of colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*, 342(26), 1960-1968.

Katzung, B. G., Masters, S. B., y Trevor, A. J. (Eds.). 2004. Basic & clinical pharmacology.

Kohen, R. y Nyska A. 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* 30(6): 620-650.

Moreno, L., S. Crespo, W. Pérez y L. M. Melgarejo. 2010. Pruebas bioquímicas como herramientas para estudios en fisiología. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 277 pp.

Muller, F. L. (2006). Absence of CuZn superoxide dismutase leads to elevated oxidative stress and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy. *Free Radic. Biol. Med* 40: 1993-2004.

Oberley, L. W., y Buettner, G. R. 1979. Role of superoxide dismutase in cancer: a review. *Cancer research*, 39(4), 1141-1149.

Perez, J. L., Jayaprakasha, G. K., Valdivia, V., Munoz, D., Dandekar, D. V., Ahmad, H. y Patil, B. S. (2009). Limonin methoxylation influences the induction of glutathione S-transferase and quinone reductase. *J Agric Food Chem* 57, 5279–5286.

Pezzuto, J. M. (1997). Plant-derived anticancer agents. *Biochemical pharmacology*, 53(2), 121-133.

Pérez- Mora S. 2016. Evaluación del extracto de hoja y flor de *Callistemon citrinus* sobre el perfil lipídico y la actividad del sistema antioxidante en hígados de ratas Wistar. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. UMSNH. Morelia, Michoacán, México

Piña Z. R. M. 2007. Efecto protector de los extractos de verdolaga (*Portulaca oleraceae* L.) sobre un modelo de inflamación-cáncer de colon inducido químicamente en ratas. Tesis de Maestría. PROPAC. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, Querétaro, México.

Prabhu, K.S., Reddy, P.V., Gmpricht, G., Hildenbrandt, G.R., Scholz, R.W., Sordillo, L.M. y Reddy, C.C. (2001) Microsomal glutathione S-transferase A1–1 with glutathione peroxidase activity from sheep liver: molecular cloning, expression and characterization. *Biochem J* 360: 345–354.

Ross, D., Kepa, J. K., Winski, S. L., Beall, H. D., Anwar, A., y Siegel, D. (2000). NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms. *Chemico-biological interactions*, 129(1-2), 77-97.

Talalay, P. (2000). Chemoprotection against cancer by induction of phase 2 enzymes. *Biofactors*, 12(1-4), 5-11



Skrzydłewska, E., Stankiewicz, A., Sulkowska, M., Sulkowski, S., y Kasacka, I. (2001). Antioxidant status and lipid peroxidation in colorectal cancer. *Journal of toxicology and environmental health Part A*, 64(3), 213-222.

Sedlak, J., y Lindsay, R. H. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical biochemistry*, 25, 192-205.

Sengottuveland M., P.Viswanathan y N.Nalini. 2006. Chemopreventive effect of trans-resveratrol - a phytoalexin against colonic aberrant crypt foci and cell proliferation in 1,2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 27(5):1038-1046.

Sogawa, K., y Fujii-Kuriyama, Y. (1997). Ah receptor, a novel ligand-activated transcription factor. *The Journal of Biochemistry*, 122(6), 1075-1079.

Sporn, M. B. (1976). Approaches to prevention of epithelial cancer during the preneoplastic period. *Cancer research*, 36(7 Part 2), 2699-2702.

Spitz, D., Sullivan, S. J., Malcolm, R. B. Roberts, R. J. 1991. Glutathione dependent metabolism and detoxification of 4-hydroxy-2-nonenal. *Free Radical Biology and Medicine*. 11(4): 415-424.

Suman, S., Fornace Jr, A. J., y Datta, K. 2012. Animal models of colorectal cancer in chemoprevention and therapeutics development. *INTECH*. 277-300 pp.

Suzuki, K., Koike, H., Matsui, H., Ono, Y., Hasumi, M., Nakazato, H., y Yamamoto, T. (2002). Genistein, a soy isoflavone, induces glutathione peroxidase in the human prostate cancer cell lines LNCaP and PC-3. *International Journal of Cancer*, 99(6), 846-852.

Talalay, P., Fahey, J. W., Holtzclaw, W. D., Prestera, T., y Zhang, Y. 1995. Chemoprotection against cancer by phase 2 enzyme induction. *Toxicology letters*, 82, 173-179.

Wang, W., Liu, L. Q., Higuchi, C. M., y Chen, H. (1998). Induction of NADPH: quinone reductase by dietary phytoestrogens in colonic Colo205 cells. *Biochemical pharmacology*, 56(2), 189-199

Wattenberg, L. W. (1985). Chemoprevention of cancer. *Cancer research*, 45



7. DISCUSION GENERAL

La presente investigación representa el primer estudio del efecto de extractos de *Callistemon citrinus* en un modelo de cáncer *in vivo*. Es también la primera evidencia de inducción de enzimas de fase II y antioxidantes por extractos derivados de esta planta.

El análisis fitoquímico de los extractos reveló un importante número de compuestos químicos de naturaleza terpénica. Como se mencionó previamente, los compuestos mayoritarios de los extractos etanólicos fueron el limoneno, el eucaliptol, el fitol, el DMPP y el terpinoleno. Todos estos compuestos han sido reportados en la literatura como agentes anticancerígenos *in vivo* e *in vitro* en distintos tipos de cáncer incluyendo el cáncer de colon.

Por ejemplo, en modelos animales, el efecto más fuerte de la exposición al d-limoneno consiste en la modulación directa de la función inmune primaria, que es un mecanismo importante en las etapas iniciales de muchos tipos de cánceres (**Miller et al.**, 2010). Hasta ahora, únicamente se ha estudiado la función inmunomoduladora del limoneno en un tipo de cáncer específico, el linfoma, donde se encontró que este compuesto mejora la fagocitosis de los macrófagos y la actividad microbicida, aumenta la esperanza de vida y disminuye la carga tumoral (**Del Toro-Arreola et al.**, 2005).

Así mismo, se ha demostrado que el d-limoneno induce la regresión de carcinomas mamarios por la inhibición de la enzima farnesil transferasa en ratas Wistar (**Haag y Goulg**, 1994) y que a través de la inducción del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1) es capaz de actuar como quimiopreventivo en este tipo de cáncer (**Jirtle et al.**, 1993). También se sabe que este monoterpene es capaz de inhibir el crecimiento de tumores de cáncer gástrico vía inducción de apoptosis (**Lu et al.**, 2004) y que uno de los mecanismos involucrados es por la activación de la vía de las caspasas (**Ravi y Bishaye**, 2009).

El limoneno ha sido probado también en pacientes humanos con la enfermedad: en un estudio llevado a cabo por **Vingushin et al.**, (1998) donde se administró d-limoneno por vía oral a pacientes adultos con tumores metastásicos o localmente avanzados, hubo tres personas con cáncer colorrectal sin progresión medible del tumor que recibieron dosis de 0.5-1 g / m² por día. En estos pacientes se observaron con pocos informes de eventos adversos y, aunque el d-limoneno no causó regresión tumoral, retrasó la progresión y previno la metástasis

Nuestra investigación demostró que a pesar de que la administración de los extractos de *C. citinus* no inhibe por completo la aparición de masas tumorales, si disminuye en gran



medida el proceso carcinogénico retrasando la aparición de lesiones preneoplásicas (FCA) y disminuyendo el daño por estrés oxidativo. Estos datos concuerdan con lo reportado previamente por **Vingushin et al.**, para el limoneno, uno de los compuestos mayoritarios en nuestro extracto.

Al igual que el limoneno, el fitol, el segundo compuesto más abundante en los extractos de hoja, presenta actividad anticancerígena en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama. En un estudio llevado a cabo por **Sheja et al.**, (2016) se determinó la IC₅₀ de este compuesto (purificado de los extractos de *Gracilaria edulis*) a dosis de 125 µg/mL, denotando un significativo efecto antiproliferativo contra esta línea celular. Los extractos de esta planta, además, presentaron una alta capacidad antioxidante.

El principal mecanismo anticancerígeno del fitol es la inducción de apoptosis. Se sabe, por ejemplo, que la exposición de células de leucemia linfocítica humana a este compuesto ocasiona inhibición del crecimiento e inducción de apoptosis en estas células (**Komiya et al.**, 1999). Más recientemente, **Song y Cho** (2015) demostraron que el fitol induce la apoptosis en células AGS de adenocarcinoma gástrico humano. Entre sus resultados encontraron que este compuesto provoca un aumento de la población celular en la fase sub-G1, regulación a la baja de Bcl-2, regulación positiva de Bax, la activación de caspasa 9 y 3, escisión de PARP y despolarización de la membrana mitocondrial. Además, proponen la autofagia inducida por el fitol como otro mecanismo anticancerígeno, como se evidencia por la inducción de la acumulación de vesículas ácidas, la conversión de la proteína LC3-I asociada a microtúbulos a LC3-II, y la supresión de la fosforilación de Akt, mTOR y p70S6K.

Estos mecanismos anticancerígenos reportados para el fitol, podrían ser también los responsables de la disminución del número de lesiones preneoplásicas en el grupo tratado con los extractos de hoja, así como del número de animales que presentaron tumores respecto al grupo tratado únicamente con el carcinógeno.

Dentro de los compuestos no terpenicos presentes en los extractos destaca la presencia del DDMP, que como se mencionó anteriormente, no había sido reportado para *C. citrinus*. Esta piranona, derivada del metabolismo de los azúcares, ha ganado atención en años recientes por las actividades biológicas que presenta, incluyendo actividad antioxidante y anticancerígena (**Zhou et al.**, 2014).

Ban et al., (2007) estudiaron si la 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piranona (DDMP) aislada de cebollas podía modular la actividad de NF-κB, induciendo así la muerte celular



apoptótica de las células de cáncer de colon. El tratamiento con diferentes concentraciones de DDMP (0.5-1.5 mg / mL) durante varios períodos (0-48 h) inhibió el crecimiento de células de cáncer de colon (SW620 y HCT116) seguido de la inducción de apoptosis de una manera dosis-dependiente. También se encontró que el DDMP moduló la actividad transcripcional y la unión al ADN del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y del acetato de tetradecanoil (TPA) inducido por NF- κ B. Además, el DDMP suprimió los genes antiapoptóticos diana NF- κ B (Bcl-2), mientras que indujo la expresión de los genes apoptóticos (Bax, caspasa-3 escindida y PARP escindida). Estos resultados sugieren que el DDMP es capaz de inhibir el crecimiento celular del cáncer de colon al inducir la muerte celular apoptótica mediante la inhibición de NF- κ B.

Un estudio no publicado por nuestro grupo de trabajo, demostró el efecto antitumoral del extracto etanólico de las hojas en tres líneas de cáncer colorrectal (RKO, SW620 y SW480) vía inducción de apoptosis celular. La presencia de DMPP en el extracto de hojas podría ser el causante de este efecto reportado previamente en la literatura.

El último de los tres compuestos mayoritarios en los extractos de hojas de *C. citrinus* es el terpinoleno. En estudios *in vitro*, este monoterpeneo también se presenta como un potente agente antiproliferativo en células cerebrales tumorales, por lo que es susceptible a su estudio como agente anticancerígeno en otros tipos de cáncer (Aydin *et al.*, 2013).

Además de los compuestos terpénicos, el análisis fitoquímico de los extractos de hojas y flores de *C. citrinus* corrobora la presencia de una importante concentración de compuestos fenólicos y flavonoides.

Los compuestos fenólicos son un grupo muy diverso de metabolitos secundarios que comprende desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como los taninos y la lignina. Se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal y en su mayoría son derivados de aminoácidos aromáticos y que en la planta cumplen varias funciones importantes. Además, estas moléculas tienen múltiples actividades biológicas que pueden ser aprovechados en la industria farmacéutica (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

Se ha reportado que una amplia variedad de compuestos fenólicos posee importantes propiedades biológicas como anticancerígenos, antivirales, antioxidantes y antiinflamatorios. En el caso del cáncer, un amplio rango de evidencia apoya la teoría de las propiedades anticancerígenas de los compuestos fenólicos, sin embargo, aún se desconocen todos los mecanismos por los que ejercen su acción. De los mecanismos conocidos se incluye la



capacidad atrapadora de radicales libres, la inducción de enzimas envueltas en el metabolismo de xenobióticos y la regulación de la expresión de genes, la modulación de las vías de señalización celular que regulan la reparación al daño del ADN, la proliferación celular, la apoptosis y la invasión (**Brown et al.**, 2012; **Rosa et al.**, 2016).

Los compuestos fenólicos que han sido reportados en la literatura para *C. citrinus* incluyen al ácido gálico, la rutina, el eucaliptino, el 8-dimetil-eucaliptín, el galato de metilo, el ácido protocatecuico, sideroxilina, sizalterina y la quercetina (**Park et al.**, 2010; **Khanh, et al.**, 2016; **Pérez-González**, 2016). Muchos de estos compuestos presentan actividades anticancerígenas y antioxidantes.

Por ejemplo, el ácido gálico y el galato de metilo presentan propiedades anticancerígenas en las líneas celulares Caco-2 y SW620 de cáncer colorrectal (**Forester et al.**, 2014). Estos compuestos actúan disminuyendo la viabilidad de las células cancerosas, induciendo apoptosis e inhibiendo el ciclo celular. Adicionalmente, estos ácidos fenólicos son capaces de inhibir y regular los factores de transcripción NF- κ B, AP-1, STAT-1, y OCT-1 que son conocidos como promotores de carcinogénesis.

El ácido protocatecuico (reportado también para *C. citrinus*) es capaz de inducir apoptosis en diversas líneas celulares de cáncer humano incluyendo células MCF7 de cáncer de mama, 1549 de cáncer de pulmón, A549 de cáncer de estómago, Hep62 de cáncer hepático, HeLa de cáncer cérvico y LNCaP de cáncer de próstata. Este compuesto, a dosis crecientes-dependientes ocasiona una disminución de la viabilidad celular, reduce el potencial eléctrico de la membrana mitocondrial, ayuda a mejorar la fragmentación del ADN y aumenta la actividad de las caspasas 3 y 8 entre otros mecanismos (**Yin et al.**, 2009).

La quercetina, un flavonoide del tipo flavonol, puede inhibir el crecimiento de las células cancerosas por lo que puede actuar como quimiopreventivo. Su capacidad de prevención del cáncer se ha atribuido a diversos mecanismos, incluida la inducción de apoptosis y regulación del ciclo celular, así como funciones antioxidantes. En células de cáncer de colon humano CACO-2 y SW-620 la quercetina induce apoptosis a través de la inhibición de la vía NF- κ B, así como por la regulación ascendente de Bax (**Zang et al.**, 2015). La quercetina también ha recibido un incremento notable de atención debido a su especificidad y casi exclusiva actividad contra células cancerosas y no contra células normales (**Park y Min**, 2011; **Du et al.**, 2010).



La determinación de la capacidad antioxidante *in vitro* de los extractos etanólicos de *C. citrinus* de México corroboró su alto potencial antioxidante reportado previamente por **Cid-Estrada** (2014) y **Pérez -González** (2016).

Ha sido ampliamente estudiado el papel que juega el estrés oxidativo en enfermedades crónico degenerativas de todo tipo, principalmente en los distintos tipos de cáncer. En estudios de laboratorio y en estudios de animales, se ha indicado que la presencia de mayores concentraciones de antioxidantes exógenos impide el tipo de daño de radicales libres que ha estado asociado con la presencia de cáncer. Por esta razón, los investigadores han estudiado si el uso de complementos de antioxidantes puede ayudar a bajar el riesgo de padecer o de morir por cáncer en los humanos. Muchos estudios de observación, se han llevado a cabo para investigar si el uso de complementos antioxidantes está asociado con riesgos menores de cáncer en los humanos. En general, estos estudios han ofrecido resultados mixtos (**Instituto Nacional del Cáncer**, 2014).

Nuestra investigación demostró un menor daño por estrés oxidativo en el grupo de animales tratados con el extracto de hojas y el carcinógeno pues a pesar de haber desarrollado tumores, los niveles de glutatión reducido (GSH) se mantuvieron normales o superiores al grupo control. Por el contrario, el grupo tratado únicamente con el carcinógeno mostró los niveles más bajos de GSH de los cuatro grupos experimentales. Esta disminución de daño, pudo deberse al potencial antioxidante de los extractos, que neutralizaron los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno producidas y evitaron que los antioxidantes endógenos, en este caso el GSH disminuyeran.

El principal efecto quimiopreventivo atribuido a los antioxidantes radica en el hecho de que su ingesta ayuda a neutralizar los radicales libres cuyo exceso es capaz de provocar mutaciones por oxidación el ADN. Antioxidantes presentes en la dieta, como vitaminas, carotenos y compuestos fenólicos han demostrado un efecto quimiopreventivo en estudios diferentes modelos *in vitro* e *in vivo*. (**Brown et al.**, 2012; **Llacuna y Mach**, 2011).

La naturaleza de la asociación entre radicales libres y cáncer es compleja y paradójica. Por ejemplo, se ha descrito en la literatura que los radicales libres y el estrés oxidativo pueden inducir cáncer, debido al daño que ocasionan en el ADN, pero al mismo tiempo las células transformadas, es decir las células cancerosas, generan más radicales libres que las células normales y a menudo, estos compuestos participan en las rutas de señalización involucradas



en la desdiferenciación celular, invasividad, apoptosis e hipoxia, entre otras (**Llacuna y Mach**, 2011).

Esta naturaleza paradójica, podría explicar el hecho de que los animales tratados con el extracto de flores (cuya actividad antioxidante era muy superior al extracto de hojas) murieran, debido probablemente a un efecto pro-oxidante por la excesiva cantidad de antioxidantes presentes en el extracto.

Finalmente, la presente investigación demostró que los extractos de *Callistemon citrinus* son capaces de inducir la actividad de enzimas antioxidantes y de fase II durante la carcinogénesis colónica.

El papel que juegan las enzimas antioxidante y particularmente las enzimas de fase II (entre ellas la quinona reductasa y la glutatión S-transferasa) en la prevención de la carcinogénesis ha sido ampliamente estudiado en la literatura, y hay un consenso casi general de que el aumento de la actividad de estas enzimas es un mecanismo muy importante para la prevención del cáncer, particularmente del cáncer colorrectal. Muchos compuestos presentes en la dieta o que se provienen en productos naturales (incluyendo carotenos, compuestos fenólicos y monoterpenos) son capaces de inducir la actividad de las enzimas de fase II y frecuentemente se cita este mecanismo como uno de los más importantes dentro de la quimioprevención del cáncer (**Janne y Mayer**, 2000).

Así mismo, se ha demostrado que la inducción coordinada de las enzimas de fase II y la elevación del glutatión protegen las células contra los efectos tóxicos y carcinogénicos de los electrófilos y oxidantes (**Dinkova et al.**, 2002).

En base a lo anterior, los resultados obtenidos en la presente investigación abren la puerta para el uso de los extractos de *Callistemon citrinus* a futuras investigaciones en otros tipos de cáncer o enfermedades asociadas con el estrés oxidativo.



8. CONCLUSIÓN GENERAL

Callistemon citrinus presenta compuestos bioactivos con propiedades anticancerígenas y un alto potencial antioxidante y ofrece protección contra daño por estrés oxidativo en cáncer de colon inducido en ratas debido a que tienen la capacidad de inducir la actividad de las enzimas de fase II y del sistema antioxidante.



9. BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTARIA

- Aldaco** F. 2012. Mortalidad por cáncer en México 2000–2010: el recuento de los daños. *Gaceta Mex Onc.* 11(6):371–379.
- Ali** N., G. Ahmed, S.W. A. Shah, I. Shah, M. Ghias y I. Khan. 2011. Acute toxicity, brine shrimp cytotoxicity and relaxant activity of fruits of *Callistemon citrinus* Curtis. *complementary and alternative medicine* 11:99
- Ali** N, Shah SWA, Ahmad B. 2011. Calcium channel blocking activity of fruits of *Callistemon citrinus*. *J Chem Soc Pak*, 33(Suppl 2):245-248
- Álvarez** S., A. Navarro, E. Nicolás y M.J. Sánchez-Blanco. 2011. Transpiration, photosynthetic responses, tissue water relations and dry mass partitioning in *Callistemon* plants during drought conditions. *Scientia Horticulturage*. 129:306-312.
- Arredondo-Espinoza**, E. U. 2011. Evaluación del efecto anticancerígeno y citotóxico in vitro de la porfirina no simétrica A3B NS1 en el compuesto HS01 de la planta *Hibiscus sabdariffa* y la proteína quimérica E2-IL-18. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, Nuevo León, México.
- Australia National Botanic Gardens**. 2012. Bottlebrush – genus *Callistemon* <http://www.anbg.gov.au/callistemon/index.html>. Consultado el 30 de enero de 2015.
- Avalos** G. A. y E. Pérez-Urria C. 2009. Metabolismo secundario de las plantas. *Reduca (Biología) Serie de Fisiología Vegetal*. 2(3): 119-145.
- Aydin**, E., Türkez, H., & Taşdemir, Ş. 2013. Anticancer and antioxidant properties of terpinolene in rat brain cells. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 64(3), 415-424.
- Begleiter**, A., Sivananthan, K., Curphey, T., y Bird, R. 2003. Induction of NAD(P)H quinone: oxidoreductase 1 inhibits carcinogen-induced aberrant crypt foci in colons of Sprague-Dawley rats. *Cancer Epidemiol Biomarkers Research*. 12: 566-72.
- Brown** E. M., Gill C. I. R., McDougall G. J., Stewart D. 2012. Mechanisms underlying the anti-proliferative effects of berry components in vitro models of colon cancer. *CPB* 13: 200-209
- Carmeliet**, P., y Jain, R. K. 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407(6801), 249-53.
- Chan**, A. T. y Giovannucci, E. L. 2010. Primary prevention of colorectal cancer. *Gastroenterology*. 138:2029-2043.



-
- Cho**, R. W. y **Clarke**, M. F. 2008. Recent advances in cancer stem cells. *Current opinion in genetics and development*, 18(1), 48-53.
- Cock** I. E. 2008. Antibacterial activity of selected Australian native plant extracts. *Biomolecular and physical sciences*.
- Corpet**, D.E. y **Tarché**, S. 2002. Most effective colon cancer chemopreventive agents in rats: a systematic review of aberrant crypt foci and tumor data. *Nutr Cancer*. 43:1-21.
- Croce** C. M. 2008. Oncogenes and cáncer. *The New England Journal of Medicine* 358 (5): 502-11.
- Crowel** P. I. 1999. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenos. *Journal of Nutrition* 129. 775-778.
- Cuendet** M., **Oteham** C.P., **Moon** R.C., **Pezzuto** J.M. 2006. *Quinone reductase induction as a biomarker for cancer chemoprevention*. *J Nat Prod*. 69(3):460-463
- Das** S. y **U. Singh**. 2012. Therapeutic potentials of *Callistemon lanceolatus* D. C. *International Journal of Advances in Pharmacy Biology and Chemistry*. 1(2):206-210.
- Davies**, N. J., **Batehup**, L., **Thomas**, R. 2011. The role of diet and physical activity in breast, colorectal, and prostate cancer survivorship: a review of the literature. *British journal of cancer*, 105(S1), S52.
- Del Toro-Arreola** S, **Flores-Torales** E, **Torres-Lozano** C, **Del Toro-Arreola** A, **Tostado-Pelayo** K, **Guadalupe Ramirez-Duenas** M, **Daneri-Navarro** A (2005) Effect of D-limonene on immune response in BALB/c mice with lymphoma. *Int Immunopharmacol* 5:829–838
- Dewhirst** F. E. 1980. Structure-activity relationships for inhibition if prostaglandin cyclooxygenase by phenolic compounds. *Prostaglandins* 20. 209-222.
- Dinkova-Kostova**, A. T., **Holtzclaw**, W. D., **Cole**, R. N., **Itoh**, K., **Wakabayashi**, N., **Katoh**, Y. y **Talalay**, P. 2002. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(18), 11908-11913.
- Faris** A. A., **Nazar** E. N. y **Kadhim** H. Z. 2011. Study of antibacterial activity of *Callistemon citrinus* leaves extract on pseudomonas aeruginosa. *Al-Mustansiriya Journal Science*. 22(1):13-22.
- Firoz** M., **Bharatesh** K., **Nilesh** P., **Vijay** G., **Tabassum** S. y **Nilofar** N. 2011. Cardioprotective activity of ethanolic extracts of *Callistemon lanceolatus* leaves on doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. *Bangladesh Journal Pharmacology*. 6:38
-



-
- Forouzanfar**, M. H., Afshin, A., Alexander, L. T., Anderson, H. R., Bhutta, Z. A., Biryukov, S. y Cohen, A. J. 2016. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet*, 388(10053).
- Goyal** P. K., Jain R., Jain S. y Sharma A. 2012. A Review on biological and phytochemical investigation of plant genus *Callistemon*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2012. Pp 1-4.
- Greig** D. 1999. *Field guide to australian wildflowers*. New Holland Punlishers. Sydney, Australia.
- Greenwell**, M., y Rahman, P. K. S. M. 2015. Medicinal plants: their use in anticancer treatment. *International journal of pharmaceutical sciences and research*, 6(10), 4103.
- Gupta** A., Gupta R. 1997. A survery of plants for anticholinesterase activity. *Phytochemistry*. 46:827.
- Guzmán-Hernández**, I. 2013. Evaluación de la toxicidad del extracto de *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels sobre larvas de *Artemia salina* y purificación de los compuestos activos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.
- Hanahan** D y Weinberg R. A. 2000. The hallmarks of cáncer. *Cell*. 100 (1): 57–70
- Hassett**, M. J., O'malley, A. J., Pakes, J. R., Newhouse, J. P., y Earle, C. C. 2006. Frequency and cost of chemotherapy-related serious adverse effects in a population sample of women with breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 98(16), 1108-1117.
- Haag** J. D y Gould M. N. (1994) Mammary carcinoma regression induced by perillyl alcohol, a hydroxylated analog of limonene. *Cancer Chemother Pharmacol* 34:477–483.
- Irigaray** P., Newby J. A., Clapp R., Hardell L., Howard V, Montagnier L., Epstein S., Belpomme. 2007. Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: an overview". *Biomedicine and Pharmacotherapy = Biomedecine and Pharmacotherapie*. 61 (10): 640–58.
- Jain** A. K., Dubey S. K., Sikawar M. S. and Jain S. K. 2007. Hepatoprotective activitie of methanolic extract of leaves of *Callistemon lanceolatus*. *International Journal Plant Sicence*. 2:185-186.
-



-
- Jirtle** R. L, Haag J. D, Ariazi E. A, Gould M. N. 1993. Increased mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor and transforming growth factor beta 1 levels during monoterpene induced regression of mammary tumors. *Cancer Res* 53:3849–385.
- Jänne**, P. A., y Mayer, R. J. (2000). Chemoprevention of colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*, 342(26), 1960-1968.
- Jeong** W., S.S. Hong, N. Kim, Y. T. Yang, Y. S. Shin, C. Lee, B. Y. Hwang y D. Lee. 2009. Bioactive triterpenoids from *Callistemon lanceolatus*. *Archives of Pharmacal Research*. 32 (6): 845-849
- Juárez-Vázquez**, C. I., y Rosales-Reynoso, M. A. 2014. Cáncer colorrectal (CCR): alteraciones genéticas y moleculares. *Gaceta Médica de México*, 150(2), 154-164.
- Kelly**, C.,and Cassidy, J. 2007. Chemotherapy in metastatic colorectal cancer. *Surgical oncology*, 16(1), 65-70. 1659-1724.
- Kensler** T.W. 1997. Chemoprevention by inducers of carcinogen detoxication enzymes. *Environmenral Health Perspectives*. 105(4):965-970.
- King** E. S. J. y Varasdi G.1959. Experimentally induced tumors of the intestine. *Aust New Zeal J Surg*; 29:38-53.
- Komiya**, T., Kyohkon, M., Ohwaki, S., Eto, J., Katsuzaki, H., Imai, K., Hibasami, H. 1999. Phytol induces programmed cell death in human lymphoid leukemia Molt 4B cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 4(4), 377-457.
- Korkaya**, H. y Wicha, M. S. 2010. Cancer stem cells: nature versus nurture. *Nature Cell Biology*, 12(5), 419.
- Kumar** B., Vijayakumar M., Govindarajan R., y Pushpangadan. P. 2007. Etnopharmacological approaches to wound healing-exploring medicinal plants of India. *Journal Etnopharmacology*. 114:103.
- Luk** G. D. 1993. Epidemiology, etiology, and diagnosis of colorectal neoplasia. *Cur Opin Gastroenterology* 9:19-27.
- Llacuna**, L., y Mach, N. 2012. Papel de los antioxidantes en la prevención del cáncer. *Revista Española de Nutrición Humana y Dietética*, 16(1), 16-24.
- Lodish**, B., Berk, A., Zipurskt S,L., Matsudaira, P., Baltimore, D., y Darnell, J. 2003. *Biología celular y molecular*. 4a ed. Editorial Médica Panamericana.
- Lotfi-Jam**, K., Carey, M., Jefford, M., Schofield, P., Charleson, C. y Aranda, S. 2008. Nonpharmacologic strategies for managing common chemotherapy adverse effects: a systematic review. *Journal of Clinical Oncology*, 26(34), 5618-5629.
-



-
- López-Mejía, A.** 2015. Estudio farmacológico de los extractos de hoja y flor de *Callistemon citrinus*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.
- Lu XG, Zhan LB, Feng BA, Qu MY, Yu LH, Xie JH.** 2004. Inhibition of growth and metastasis of human gastric cancer implanted in nude mice by D-limonene. *World J Gastroenterol* 10:2140–2144
- Maldonado Saavedra, O., Jiménez Vázquez, E.N., Guapillo Vargas, M.R.B., Ceballos Reyes, G.M., Méndez Bolaina, E.** 2010. Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico degenerativas. *Rev. Med. UV.* 32- 39.
- Martin-Cano J.** 2011. Firmas de expresión genética como factor de respuesta al tratamiento neoadyuvante en el cáncer de recto. Tesis Doctoral. Universidad de Granada
- Miller, J. A., Thompson, P. A., Hakim, I. A., Chow, H. H. S., & Thomson, C. A.** (2011). d-Limonene: a bioactive food component from citrus and evidence for a potential role in breast cancer prevention and treatment. *Oncology Reviews*, 5(1), 31-42.
- Montaño-Ñeco, Y.I.** 2011. Determinación de la actividad antimicrobiana y de la composición química de *Callistemon citrinus*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.
- Organización Mundial de la Salud.** 2015. Cáncer. Nota descriptiva n°297. Consultado en julio de 2017. Disponible en <http://www.who.int/cancer/about/facts/es/>
- Oyedeji O. O., Lawal, O.A., Shode, F.O and Oyedeji A. O.** 2009. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oils of *Callistemon citrinus* and *Callistemon viminalis* from South Africa. *Molecular.* 14:1990-1998
- Pérez- Mora S.** 2016. Evaluación del extracto de hoja y flor de *Callistemon citrinus* sobre el perfil lipídico y la actividad del sistema antioxidante en hígados de ratas Wistar. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. UMSNH. Morelia, Michoacán, México
- Petronilho S, Rocha SM, Ramírez-Chávez E, Molina-Torres J, Rios-Chavez P** Assessment of the terpenic profile of *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels from Mexico. *Industrial Crops and Products Journal.* No 46. 369-379 (2013).
- Piña Z. R. M.** 2007. Efecto protector de los extractos de verdolaga (*Portulaca oleraceae* L.) sobre un modelo de inflamación-cáncer de colon inducido químicamente en ratas. Tesis de Maestría. PROPAC. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, Querétaro, México.
-



-
-
- Rabi T, Bishayee A.** 2009. D-Limonene sensitizes docetaxel-induced cytotoxicity in human prostate cancer cells: generation of reactive oxygen species and induction of apoptosis. *J Carcinog* 8:9
- Rashedul M. I., R. Ahamed, Md. O. Rahman, M. Al-Min, K.A. Dedarul y F. Lyzu.** 2010. *In vitro* antimicrobial activities of four medicinally important plants in bangladesh. *European Journal of Scientific Research.* 39:199-206.
- Ramírez-Cervantes L. E.** 2015. Micropropagación de *Callistemon citrinus* y *Plumbago auriculata*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México
- Ricciardiello, L., Bazzoli, F., y Fogliano, V.** 2011. Phytochemicals and colorectal cancer prevention - myth or reality?. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology.* 8(10): 592-596
- Ries, L. A., Harkins, D., Krapcho, M., Mariotto, A., Miller, B. A., Feuer, E. J., y Hayat, M.** 2006. SEER cancer statistics review, 1975-2003. Georgia State University.
- Rosa, S. I. G., Rios-Santos, F., Balogun, S. O., de Almeida, D. A. T., Damazo, A. S., da Cruz, T. C. D. y Ascêncio, S. D.** (2017). Hydroethanolic extract from *Echinodorus scaber* Rataj leaves inhibits inflammation in ovalbumin-induced allergic asthma. *Journal of ethnopharmacology*, 203, 191-199.
- Ross, D., Kepa, J. K., Winski, S. L., Beall, H. D., Anwar, A., y Siegel, D.** (2000). NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms. *Chemico-biological interactions*, 129(1-2), 77-97.
- Roukos D. H.** 2009. Genome-wide association studies: how predictable is a person's cancer risk?. *Expert Review of Anticancer Therapy.* 9 (4): 389–92.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., y Jemal, A.** 2018. Cancer statistics, 2018. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(1), 7-30.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., y Lamuela-Raventós, R. M.** 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178).
- Sheeja, L., Lakshmi, D., & Shruthi Bharadwaj, P. K. S.** 2016. Anticancer activity of phytol purified from *Gracilaria edulis* against human breast cancer cell line (MCF-7). *Int J Curr Sci*, 19(4), 36-46.
- Song Y, Cho S K.** 2015. Phytol Induces Apoptosis and ROS-Mediated Protective Autophagy in Human Gastric Adenocarcinoma AGS Cells. *Biochem Anal Biochem* 4:211
-
-

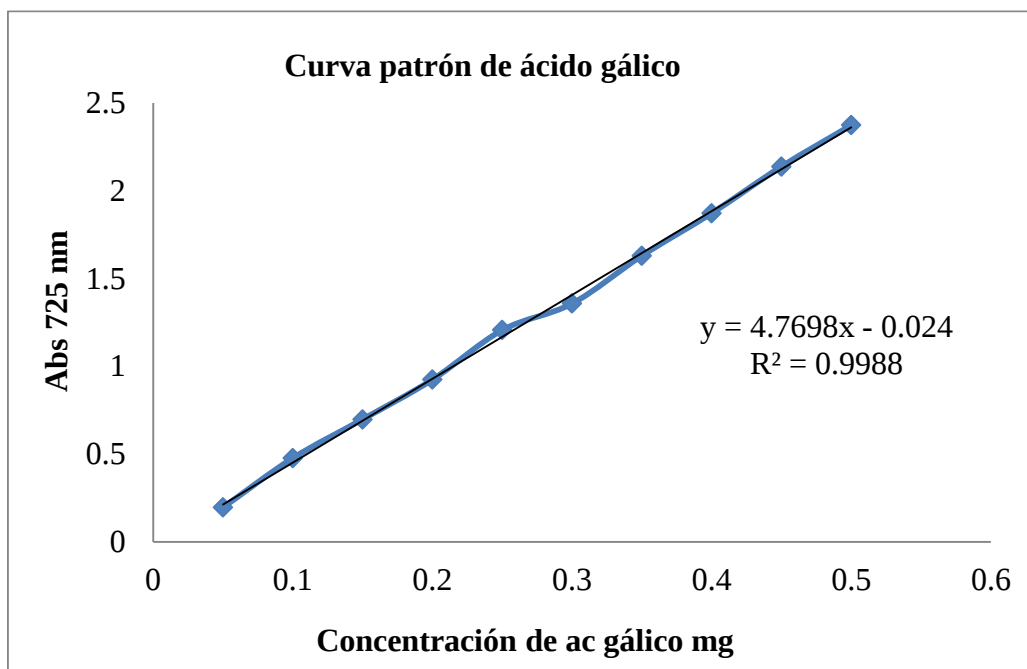


-
- Stewart, B. W., y Wild, C. P.** (2014). World cancer report 2014. International agency for research on cancer. World Health Organization, 505.
- Skrzydłewska, E., Stankiewicz, A., Sulkowska, M., Sulkowski, S., & Kasacka, I.** (2001). Antioxidant status and lipid peroxidation in colorectal cancer. *Journal of toxicology and environmental health Part A*, 64(3), 213-222
- Talalay, P.** (2000). Chemoprotection against cancer by induction of phase 2 enzymes. *Biofactors*, 12(1-4), 5-11
- Varadhachary, G. R., Tamm, E. P., Abbruzzese, J. L., Xiong, H. Q., Crane, C. H., Wang, H. y Wolff, R. A.** 2006. Borderline resectable pancreatic cancer: definitions, management, and role of preoperative therapy. *Annals of surgical oncology*, 13(8), 1035-1046.
- Vigushin D. M., Poon G. K., Boddy A., English J., Halbert G. W., Pagonis C., Jarman M., Coombes R.C.** 1998. Phase I and pharmacokinetic study of D-limonene in patients with advanced cancer. Cancer Research Campaign Phase I/II Clinical Trials Committee. *Cancer Chemother Pharmacol* 42:111–117.
- Vogelstein, B., y Kinzler, K. W.** (1993). The multistep nature of cancer. *Trends in genetics*, 9(4), 138-141.
- Wattenberg L.W.** 1985. Chemoprevention of cancer. *Cancer Research*. 45(1):1-8
- Wrigley, J.W.; Fagg, M.** 1993. Bottlebrushes, Paperbarks and Tea Trees and all other plants in the Leptospermum alliance; Angus & Rovertson: Sydney, Australia. pp. 352.
- Zingg, J. M., y Jones, P. A.** 1997. Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 18(5), 869-882.

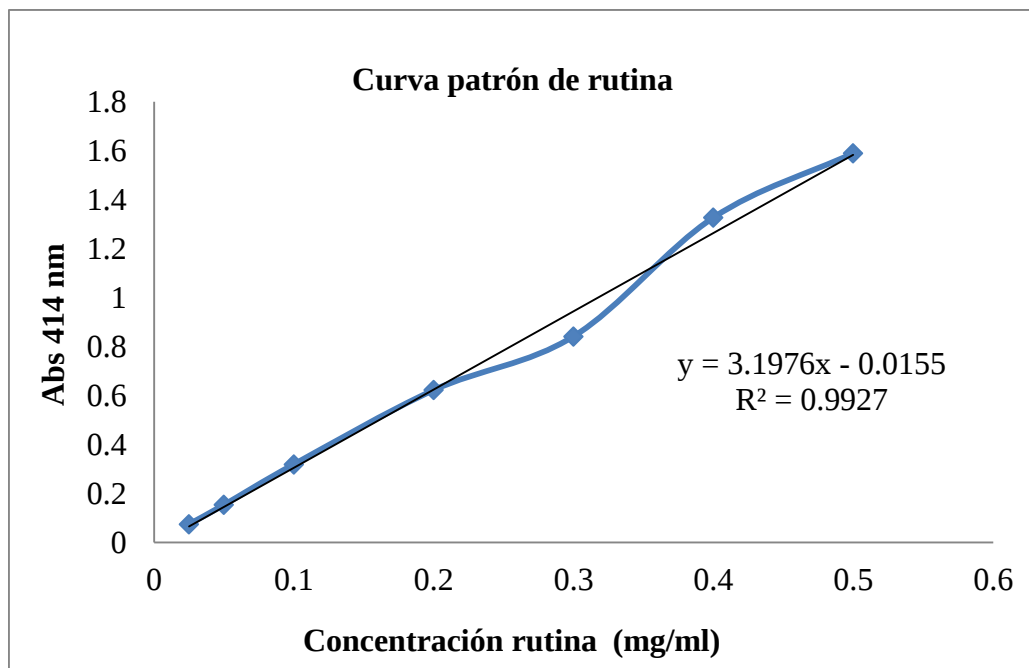


10. ANEXOS

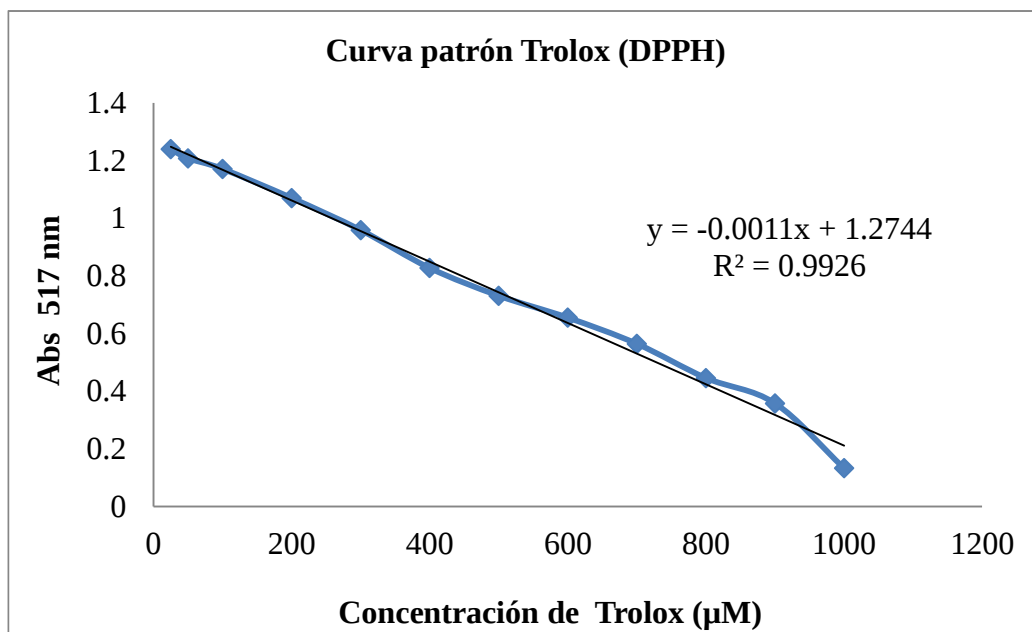
Anexo 1. Curva patrón de ácido gálico para la determinación de fenoles totales.



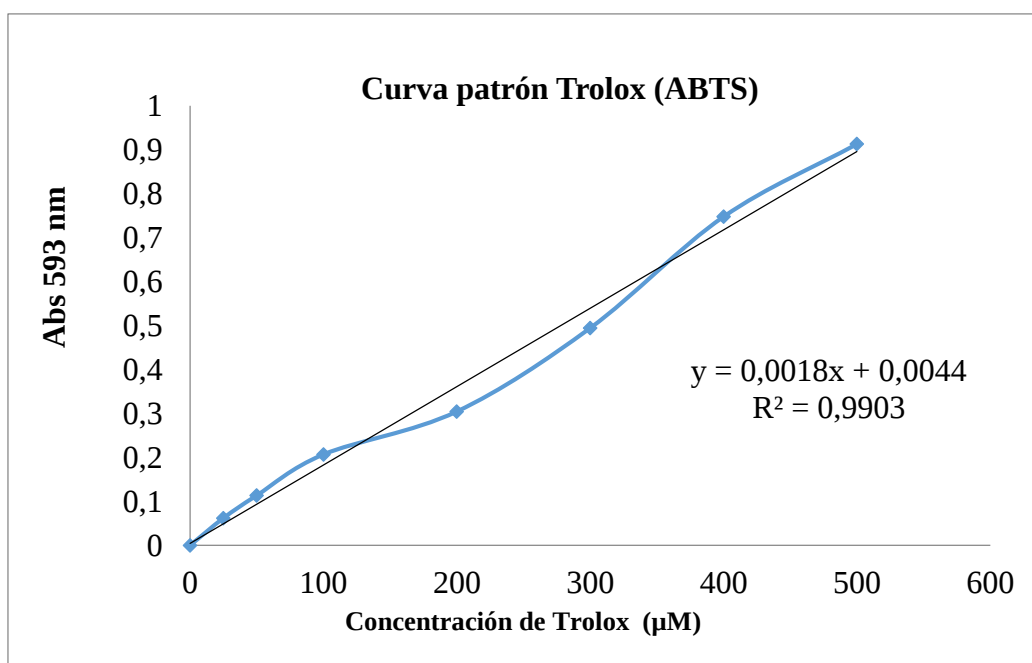
Anexo 2 Curva patrón de rutina para la determinación de flavonoides.



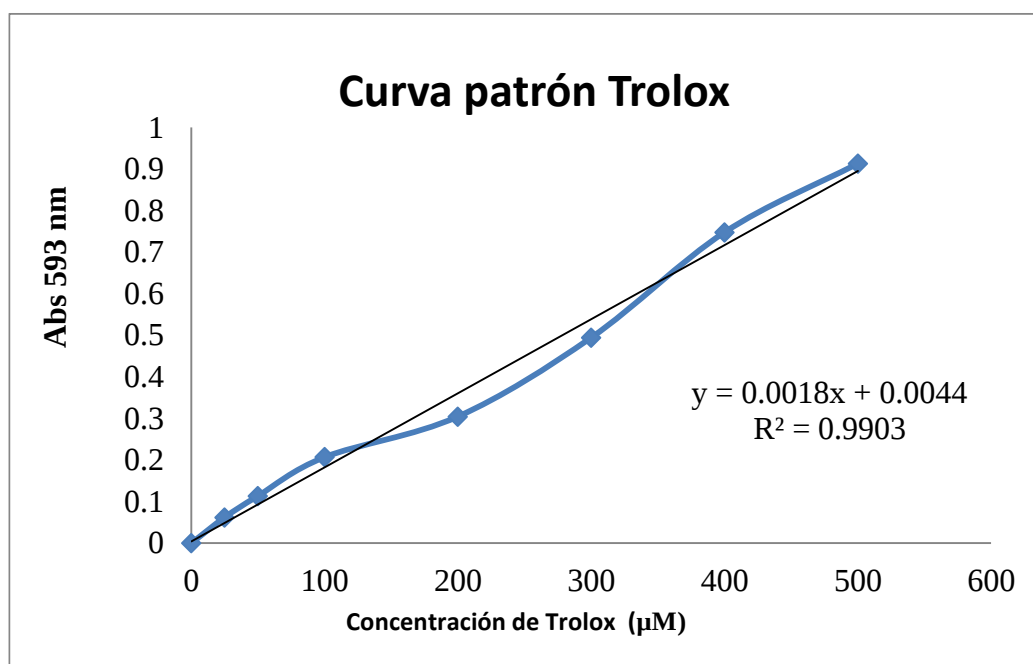
Anexo 3 Curva patrón de trolox para la determinación de la actividad antioxidante (técnica DPPH)



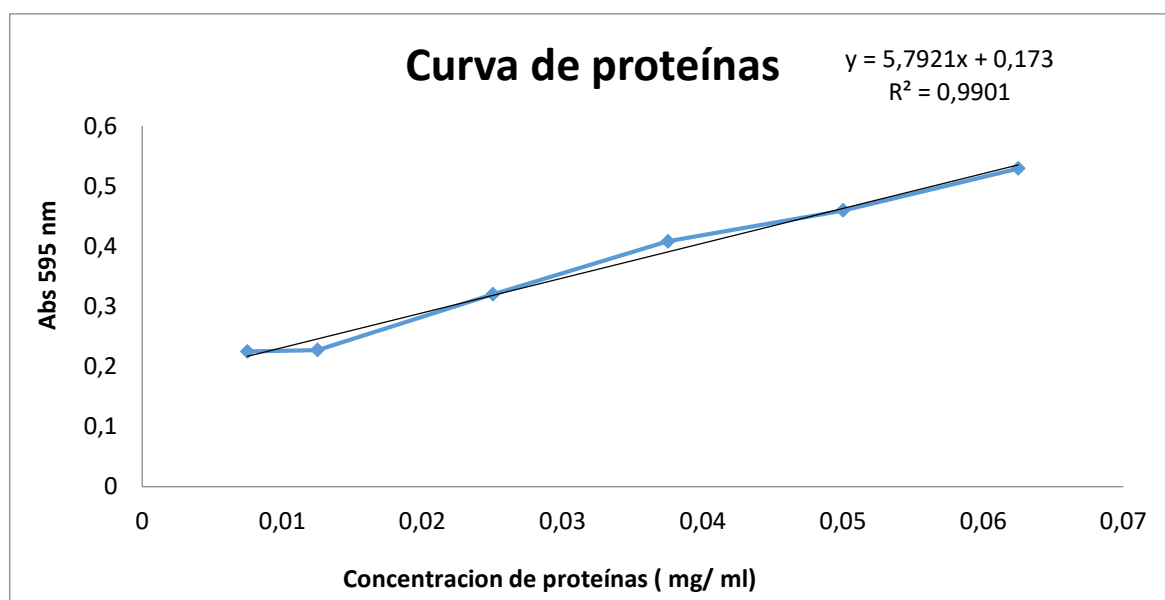
Anexo 4 Curva patrón de trolox para la determinación de la capacidad antioxidante (técnica ABTS)



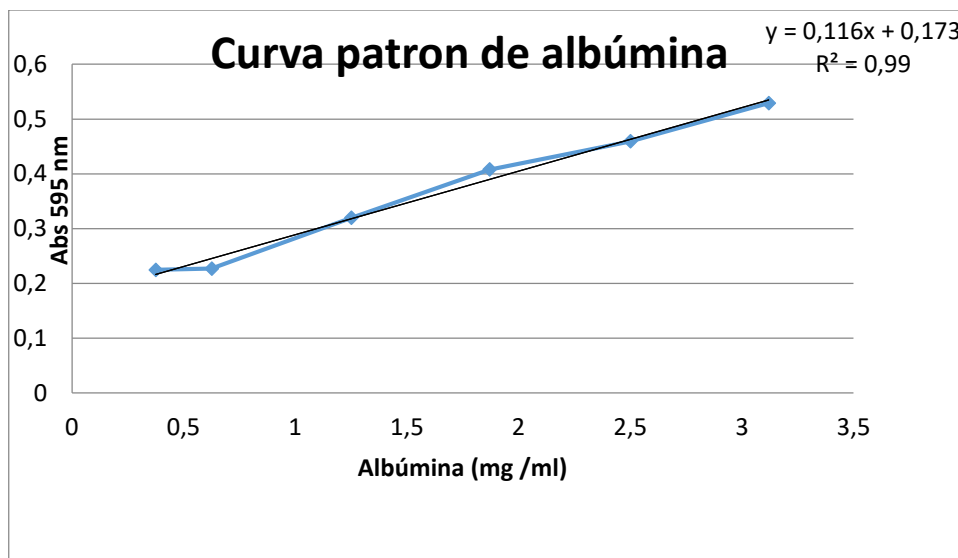
Anexo 5 Curva patrón de trolox para la determinación de la actividad antioxidante por el método FRAP



Anexo 6 Curva patrón para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford



Anexo 7 Curva patrón de albúmina para la cuantificación de albumina sérica por el método de verde de bromocresol.



Anexo 8 Curva patrón para la cuantificación de glutatión (GSH)

