



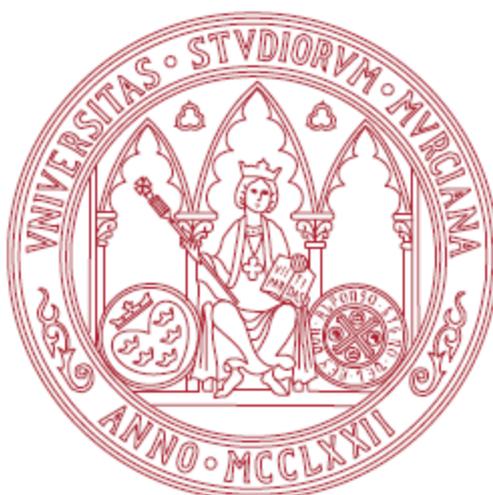
UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE OFTALMOLOGÍA, OPTOMETRÍA, OTORRINOLARINGOLOGÍA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA

Estudio Comparativo *in vitro* de los Polifenoles
Vegetales Flavan-3-oles, Flavanonas y Flavonas y la
Relación de su Estructura Molecular con el Efecto
sobre la Viabilidad Celular

D. Luis Emilio Gómez Alcaraz

2016



**Instituto Universitario de Investigación del
Envejecimiento**

Universidad de Murcia

PROGRAMA DE DOCTORADO
BIOLOGIA Y PATOLOGÍA DEL ENVEJECIMIENTO
2015

**ESTUDIO COMPARATIVO IN VITRO DE LOS
POLIFENOLES VEGETALES FLAVAN-3-OLE,
FLAVANONAS Y FLAVONAS Y LA RELACIÓN DE SU
ESTRUCTURA MOLECULAR CON EL EFECTO SOBRE
LA VIABILIDAD CELULAR.**

Tesis Doctoral

Autor: Luis Emilio Gómez Alcaraz

Tutores: Francisco José Gómez García

Vicente Vicente Ortega

Francisco Martínez Díaz

AGRADECIMIENTOS

El primer lugar de este apartado lo ocupa con mayúsculas, el amigo y profesor Francisco José Gómez García. Siempre iré primero el amigo, pero le agradezco infinitamente el abrirme sus puertas como profesor y director de tesis. El quizá aun no sabe el enorme bien y la repercusión que tendrá en mi vida este proyecto. Por su paciencia, su tranquilidad, su ánimo, su ...

En segundo lugar al profesor Vicente Vicente Ortega por confiar, apoyar y animar a un antiguo alumno que tenía aparcados la inquietud, siempre necesaria, de investigar y crecer en medicina.

A Maria Dolores Soria y Manolo por ayudarme con todos los trámites tan desconocidos que implica un proyecto así, y por hacer que la facultad de medicina vuelva a ser un lugar familiar.

A las personas que creen en mí como persona y como médico. Aquí nombraré a Aurora Mercader, por dar una idea tan buena y sembrar en mí el gusanillo de empezar este proyecto. Por crear ese vínculo tan estrecho conmigo y con Paco.

A mi familia, la de siempre, mis padres y mi hermana. Y la pequeña, la nueva y pequeña familia que crece dando solo alegrías. Chiti y Santiago porque son ellos la razón de todo.

INDICE

RESUMEN.....	6
I. ANTECEDENTES.....	8
1. Flavonoides	9
2. Extractos	22
3. Cáncer de colon.....	35
4. Cultivos celulares	43
II. OBJETIVOS.....	46
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	48
1. MATERIAL.....	49
2. MÉTODOS.....	53
IV. RESULTADOS	64
V. DISCUSIÓN	92
VI. CONCLUSIONES.....	109
VII. BIBLIOGRAFIA	111

Estudio comparativo in vitro de los polifenoles vegetales flavan-3-oles, flavanonas y flavonas y la relación de su estructura molecular con su efecto sobre la viabilidad celular.

RESUMEN:

Introducción: La estructura molecular de cualquier sustancia juega un papel importante en la interacción de ésta con las células u otro sistema biológico.

Objetivos: Estudiar *in vitro* el efecto sobre la viabilidad y la proliferación celular de los compuestos: extracto de semilla de uva (flavan-3-oles polímeros de catequinas), extracto de cacao (flavan-3-oles epicatequinas), extracto de pomelo (glicósidos de flavanonas naringina y neohesperidina), extracto de piel de limón (glicósido de flavanona eriocitrina), naringenina (flavanona), apigenina (flavona) y apigenina potásica. Así mismo estudiar la influencia de estas sustancias sobre el ciclo celular y la apoptosis de las líneas celulares Vero y Ca-Co2.

Material y Métodos: Los compuestos fueron ensayados sobre la línea celular no tumoral Vero (túbulo renal de mono verde africano) y la línea celular tumoral CaCo-2. Utilizamos el test de MTT con diferentes concentraciones de los extractos. Todo ello junto con el conocimiento de la composición cromatográfica de cada extracto nos permitió hallar posibles relaciones entre la estructura molecular y su efecto en la proliferación celular.

Resultados: En las condiciones de nuestro estudio, no hallamos efecto negativo significativo sobre la proliferación celular en ninguno de los extractos testados a concentraciones inferiores a 10 µM en la línea celular Vero. Podría establecerse como orden de actividad antiproliferativa de las estructuras flavonoides estudiadas: flavan-3-ol > flavanona > flavona. Sobre la línea transformada CaCo-2, todos los extractos estudiados mostraron efecto antiproliferativo y/o citotóxico, sobre todo apigenina potásica. Sobre la línea Vero apigenina potásica y extracto de semilla de uva, provocaron un mayor bloqueo del ciclo celular. Y sobre la línea CaCo-2, extracto de piel de limón y de cacao. El análisis del porcentaje de población celular que se encontraba en apoptosis mostró unos valores en general muy bajos en relación a la población total analizada en la línea celular Vero. Sin embargo, sobre CaCo-2, consideramos especialmente relevantes los resultados obtenidos por la flavona apigenina potásica, que mostró una capacidad apoptótica significativa a partir de las 72 horas de tratamiento.

Conclusión: Las estructuras moleculares más complejas y de mayor peso molecular causan mayores efectos antiproliferativos, y parecen influir más sobre el ciclo celular y la apoptosis.

Palabras clave: flavan-3-oles, flavanonas, flavonas, viabilidad celular.

Flavan-3-ols, flavanones and flavones vegetal polyphenols in vitro comparative study and relation between antiproliferative effect and molecular structure.

ABSTRACT:

Introduction: Molecular structure is a very important factor in relation of any substances with cells or biological system.

Objective: Present study is an *in vitro* research about the viability and proliferation activity of following products and extracts: grape seed extract (flavan-3-ols catechins polymers), cocoa extract (flavan-3-ol epicatechins), grapefruit extract (flavanones glycosides naringin y neohesperidin), skin lemon extract (flavanone glycoside eriocitrin), naringenin (flavanone), apigenin (flavone). Also study the influence of these extracts on cellular cycle and apoptosis on Vero and CaCo2.

Material and Methods: We have study the different extracts and products effects concentrations on Vero cells proliferation and CaCo-2 cells culture, using the MTT assay. It together with the knowledge of the chromatographic composition of every extract of the experiment allows us to find relations between structures or molecular skeletons and his effect on the cellular proliferation.

Results: In our study conditions, we have not negative effect on celular proliferation with all the extracts, on concentrations lower tan 10 μ Ma on Vero. The order in antiproliferative capacity could be: flavan-3-ol > flavanone > flavone. On CaCo-2, all the extracts showed antiproliferative effect or citotoxicity especially apigenine. On Vero apigenine potásica and grape fruit seed, showed the best arrest in cell cycle. On CaCo-2, citrus and cocoa were he most significant. Celular population percentage analysis, in apoptosis were very low regarding the total population in Vero. But, on CaCo-2, we considered relevant results on Apigenine, that showed an important apoptotic capacity after 72 hours.

Conclusion: We have found the more complex molecular structures it provokes antiproliferative activity increase. This fact would interact in relationship between cell and environment.

Keywords: flavan-3-ol, flavanone, flavones, cell viability.

I. ANTECEDENTES

1. Flavonoides

1.1. Estructura general y funciones:

Los flavonoides son un grupo numeroso de compuestos polifenólicos caracterizados por una estructura básica benzo- γ -pirona (C6-C3-C6) (Fig. 1) (Benavente-García, 2008; Crozier, 2009). Según su estructura, se clasifican en seis clases principales, dependiendo de la conexión entre los anillos B y C, el estado de oxidación y los grupos funcionales del anillo C: flavanoles, flavanonas, flavonas, isoflavonas, flavonoles y antocianidinas (Fig. 2; Tabla 1).

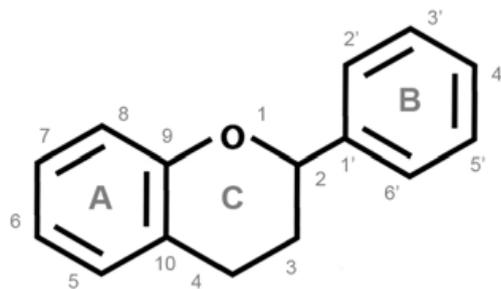


Figura 1

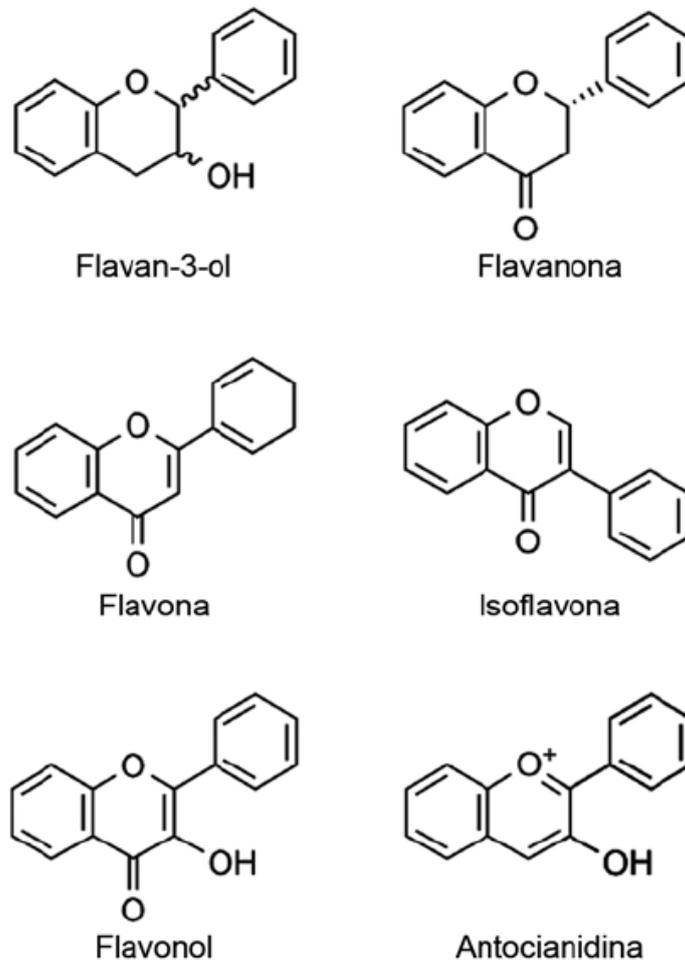


Figura 2

Muchos flavonoides se encuentran en la naturaleza en forma de glicósidos, lo que contribuye a que haya más de 8.000 descritos actualmente (Benavente-García, 2008). Excepto las catequinas, el resto de flavonoides no aparecen en la forma aglicona (no glicosilada) en los vegetales; por ejemplo, los flavonoles y las flavonas de los alimentos generalmente son o- β -glicósidos (Aherne, 2002; Crozier, 2009).

Subclase	Conexión anillo B-C	Insaturación del anillo C	Grupos funcionales del anillo C	Flavonoides más importantes	Alimentos ricos
Flavanoles, flavan-3-oles, catequinas	2	Ninguna	3-hidroxi <hr/> 3-O-galato	(+)-Catequina (+)-Galocatequina (-)-Epicatequina (-)-Epigallocatequina <hr/> (-)-Epicatequina-3-galato (-)-Epigallocatequina-3-galato	Té, uvas rojas, vino tinto, chocolate, frutas (albaricoques)
Flavanonas	2	Ninguna	4-oxo	Hesperetina Naringenina Eriodictiol Sus 7-o-glucósidos	Frutos cítricos
Flavonas	2	C ₂ -C ₃	4-oxo	Apigenina Luteolina Baicaleína Sus 7-o-glucósidos	Perejil, apio
Isoflavonas	3	C ₂ -C ₃	4-oxo	Genisteína Daidzeína Gliciteína Biochanina A Formononetina	Semillas de soja, legumbres
Flavonoles	2	C ₂ -C ₃	3-hidroxi, 4-oxo	Kaempferol Miricetina Quercetina Isorhamnetina Sus 7-o-glucósidos	En casi todos los alimentos; en especial en cebollas, col rizada, puerro, brócoli, arándano
Antocianinas	2	C ₁ -C ₂ , C ₃ -C ₄	3-hidroxi	Cianidina Delfinidina Malvidina Pelargonidina Peonidina	Bayas rojas, azules y moradas

Tabla 1. Características químicas de las subclases de flavonoides, nombres de los flavonoides más importantes y fuentes alimentarias más ricas (según Ross (2002), Beecher (2003) y Manach (2004)).

Los flavonoides son productos del metabolismo secundario de las plantas, y desempeñan numerosas funciones en los vegetales. Casi todos los flavonoides son pigmentos, con todos los colores del espectro, incluida la región ultravioleta (UV); esto, junto a sus propiedades electrónicas, los asocia con la atracción de insectos, animales y aves polinizadoras, aunque también participan en la regulación de genes sensibles a la luz. No obstante, no tienen un papel conocido en la fotosíntesis (Havsteen, 2002).

Por otra parte, estos compuestos son importantes en la protección de las plantas frente a los predadores. Así, la polimerización de polifenoles mediante la polifenol oxidasa en zonas dañadas sella los tejidos heridos e impide que los insectos se alimenten de ese área. Asimismo, los flavonoides, bien por su sabor amargo, bien por su capacidad de precipitar proteínas en el intestino y dificultar la digestión, evitan que los mamíferos y otros animales se alimenten de las plantas (Stevenson, 2007).

Además, desempeñan un importante y complejo papel en el metabolismo del nitrógeno en las plantas que establecen simbiosis con especies de *Rhizobium* spp. En este aspecto, regulan la expresión de proteínas necesarias en las células vegetales que forman los nódulos en los que se albergan las bacterias fijadoras de nitrógeno. También participan en la eliminación del oxígeno, cuyo nivel debe mantenerse bajo para que pueda fijarse el nitrógeno, y como mensajeros entre la planta y las bacterias fijadoras de nitrógeno (Havsteen, 2002).

Igualmente, están implicados en el crecimiento y reproducción de las plantas y proporcionan resistencia a patógenos y a los daños provocados por la radiación UV (Havsteen, 2002; Ross, 2002; Del Río, 2004; Taylor, 2005).

La importancia de sus funciones biológicas en las plantas ha provocado que tengan un gran interés en la industria. Algunos flavonoides se pueden

utilizar como repelentes o toxinas en la agricultura, o para obtener cultivos más resistentes mediante técnicas de mejora (Benavente-García, 1997; Ortuño, 2002; Ortuño, 2006). En el campo de la producción de alimentos, la capacidad de los flavonoides de proporcionar sabor dulce o amargo o de eliminar el amargor es ampliamente utilizada (Benavente-García, 1997).

1.2. Biodisponibilidad y efectos sobre la población

1.2.1. Epidemiología del consumo de flavonoides en la dieta:

Las frutas y verduras (manzanas, uvas, cebollas, legumbres), el chocolate negro y las bebidas como el café, el té (negro o verde) y el vino tinto son las principales fuentes de flavonoides en la dieta (Aherne, 2002; Beecher, 2003; Manach, 2004; Somerset, 2008; Crozier, 2009). Así, algunas frutas como las manzanas o las peras pueden contener de 2 a 4 g de polifenoles por cada kg de peso fresco (Crozier, 2009), y una copa de vino o una taza de café o té proporcionan hasta 100 mg de estas moléculas (Scalbert, 2005).

No obstante, los alimentos que proporcionan las mayores cantidades de estos compuestos pueden variar según el país: el té es la fuente fundamental de flavonoides en Japón; en Finlandia, lo son las frutas y verduras (Aherne, 2002), mientras que el té y los cítricos proporcionan la mayor proporción de flavonoides en EE UU (Chun, 2007) y en Australia (Johannot, 2006). Por otro lado, también pueden encontrarse variaciones dentro de un mismo país; así, mientras que en la dieta italiana la mayoría de flavonoides proceden del vino tinto (Hertog, 1995), en pueblos del norte del país provienen básicamente de frutas, ensaladas y sopas de verduras (Aherne, 2002). Además, el contenido de flavonoides de los alimentos puede variar enormemente entre variedades o zonas del vegetal. Las concentraciones de quercetina son hasta 6 veces

mayores en los tomates cherry que en otras variedades con una menor relación entre la piel y el volumen (Ross, 2002; Manach, 2004), mientras que la piel de ciertas variedades cultivadas de pera puede contener 1,2-2,5 g/kg frente a los 28- 81 mg/kg presentes en la carne (Crozier, 2009). También la época del año puede afectar a los niveles de flavonoides en algunas plantas, pudiendo multiplicarse por 5-7 en verano; así como la exposición a la luz y la temperatura, lo que lleva a que las plantas crecidas en España puedan contener 4-5 veces más flavonoides que las de Reino Unido. Por último, el grado de maduración de la planta y la forma de preparar los vegetales también afectan a la concentración de estos compuestos en los alimentos (Aherne, 2002; Bergquist, 2005).

En los años 70, Kuhnau (1976) calculó que la ingesta diaria de flavonoides en EEUU era de aproximadamente 1 g/día (16% de flavonoles, flavonas y flavanonas; 17% de antocianidinas; 20% de catequinas; 45% de biflavonas). Posteriormente se ha estimado que la ingesta media en Occidente de flavanoles, flavanonas, flavonoles e isoflavonas es de 100-150 mg/día, a lo que habría que sumar las antocianinas y proantocianidinas (Beecher, 2003; Manach, 2004). No obstante, diversos estudios en distintos países proponen valores muy diferentes: en EEUU se ha estimado que el consumo total de flavonoides es de, aproximadamente, 190 mg/día (Chun, 2007); en Países Bajos dos autores ofrecen valores muy dispares, entre 25 mg/día (Hertog, 1993) y 75 mg/día (Arts, 2001). En Finlandia y Japón los valores son más bajos, de $24,2 \pm 26,7$ mg/día (Knekt, 2002) y de unos 63 mg/día (Arai, 2000), respectivamente; mientras que en Australia el consumo medio de estos compuestos llega a 454 mg/día (Johannot, 2006). Estas grandes variaciones entre distintos estudios parecen deberse, en parte, a características metodológicas de los trabajos, puesto que muchos autores realizan la estimación a partir del contenido de 5 flavonoides principales, mientras que otros utilizan hasta 24 y, en parte, a los diferentes hábitos alimenticios. La ingesta de polifenoles es muy variable según los gustos y otras características

personales: Chun et al. (2007) demostraron en un estudio con 8809 estadounidenses que el consumo de flavonoides en la dieta aumentaba con la edad y el nivel socioeconómico, y que era mayor en mujeres, en caucásicos y en consumidores habituales de suplementos vitamínicos. Así, los valores pueden oscilar entre 6 y 987 mg/día en Alemania y entre 4 y 100 mg/día en Países Bajos (Manach, 2004). Diversos factores culturales influyen en el tipo de flavonoides consumidos preferentemente. Así en Asia, donde la dieta es rica en soja, se consumen 25-40 mg/día de isoflavonas (Arai, 2000), frente a unos pocos miligramos en EEUU o Europa. En Finlandia, el flavonoide más consumido es la hesperetina, presente en cítricos, según Knekt et al. (2002). La ingesta de flavanoles varía de 18-31 mg/día en España a 5-1250 mg diarios en Italia (Manach, 2004).

1.2.2. Efectos sobre la salud de los flavonoides

De todos los efectos biológicos de los polifenoles, quizá, el más ampliamente estudiado sea la actividad antioxidante, incluyendo el barrido de radicales libres, inhibición de la oxidación de los lípidos, reducción de la formación de hidroperóxidos.

Los polifenoles pueden además actuar como antioxidantes a través de sus efectos en el plasma, las membranas, factores de transcripción y actividad enzimática in vivo. Así, la actividad antioxidante de los extractos de plantas ha sido ampliamente estudiada en diferentes sistemas biológicos. Algunas de ellas se presentan en la siguiente tabla:

Polifenoles	Actividad antioxidante
Extracto rico en uva	Reduce estrés oxidativo en suero
Extracto de semilla de uva	Reduce LDL oxidado en plasma
Extracto de etanol de uva Chardonnay	Conservante de pesados y aceites
Epicatenina y procianidina	Conservante para fruta
Hidroxytyrosol y derivados	Reduce LDL oxidado en plasma
Catequina, epicatequina y galato	Induce efecto dosis-respuesta en actividad antioxidante en plasma
Antocianinas	Barrido de radicales libres
Extracto de nueces y almendras	Reduce peroxidación de lípidos en plasma
Carnosol, rosmadialacidoro smarínico	Protege membranas del daño oxidativo.

Diversos estudios epidemiológicos y casos-control han encontrado asociación entre el consumo total de flavonoides, de algunos subgrupos o de flavonoides individuales y el riesgo de sufrir distintas enfermedades crónicas (An-Na Li, 2014).

Probablemente sea la relación inversa entre el consumo de flavonoides y el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares la mejor establecida. Así, el consumo de flavonoides, especialmente de flavonoles, ha demostrado reducir el riesgo de mortalidad y morbilidad por este tipo de patologías (Grassi, 2009). Existen estudios que demuestran que la quercetina disminuye el riesgo de morir por isquemia cardiaca (Knekt, 2002) y que un consumo elevado de flavonoles y flavonas previene la muerte por enfermedades coronarias o el infarto de miocardio no fatal (Knekt, 1996; Hirvonen, 2001). Es probable que parte de estos efectos protectores se deban a las acciones de estas moléculas sobre los niveles de colesterol plasmáticos: Arai et al. (2000) han demostrado una correlación inversa entre el total de flavonoides o de quercetina en la dieta y las concentraciones plasmáticas de colesterol y colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL). Además, la hiperlipemia posprandial y el

estrés oxidativo, como un bien definido factor de arteriosclerosis, podría verse reducida por los polifenoles. La arteriosclerosis va progresando afectando a las capas medias arteriales y puede estar presente y clínicamente silente durante décadas llegando con el tiempo a producir IAM, angina inestable y muerte. Numerosos estudios han mostrado las dietas ricas en polifenoles pueden reducir el riesgo de trombosis, que es una de las causas que conduce a la cardiopatía isquémica. Además estudios epidemiológicos avalan con fuerte evidencia que la incidencia de enfermedad cardiovascular en la cuenca mediterránea es baja. El consumo de dieta mediterránea rica en vegetales, frutas, pescado, vino, particularmente el tinto, aporta un gran beneficio en la prevención de las enfermedades coronarias más claro que otras dietas (An-Na Li, 2014)

Asimismo, estos compuestos parecen proteger frente a la degeneración neuronal: el consumo total de flavonoides se correlaciona con una menor pérdida de función cognitiva a lo largo del tiempo (Letenneur, 2007) y el de flavonoles y flavonas con menor incidencia de demencia (Commenges 2000). Además, las personas con mayores ingestas de kaempferol, naringenina y hesperetina muestran una menor incidencia de accidentes cerebrovasculares (Knekt, 2002). Debido a la notable actividad antioxidante de los polifenoles, podrían ser beneficiosos en revertir el curso del envejecimiento neuronal, incluyendo la degeneración de neuronas dopaminérgicas en la enfermedad de Parkinson. La propiedad neuroprotectora del extracto del té verde y las epigallocatequinas fue demostrada en un modelo de ratones con E. de Parkinson. (Levites 2001).

En otro estudio, Los resultados mostraron que la administración rutinaria en ratones atenuaba el déficit de memoria en la enfermedad de Alzheimer en ratones, disminuyendo los niveles de AB oligomérica, incrementando la actividad de la superóxido dismutasa, y la ratio glutatión/glutatión bisulfato,

recudiendo el glutatión sulfato y los niveles de MDA, y disminuyendo los niveles cerebrales de IL1B e IL6. (Xu 2014, Rossi 2008).

El consumo de hesperetina, naringenina y quercetina ha demostrado un efecto protector frente al asma (Knekt, 2002), mientras que el de isoflavonas, bien mediante la dieta, bien mediante suplementos, previene los síntomas asociados a la menopausia (Arai, 2000) y a la osteoporosis, aumentando la densidad del hueso y mejorando los marcadores de resorción ósea en orina (Alekel, 2000; Morabito, 2002; Yamori, 2002).

Además de estos estudios, más o menos controvertidos, sobre los efectos de los flavonoides de la dieta en la salud humana, existen numerosos trabajos experimentales para desentrañar, tanto in vitro como in vivo, los efectos de los flavonoides en cantidades próximas a las de la dieta o superiores. Estos estudios han demostrado que los flavonoides ejercen numerosos efectos biológicos: son eliminadores de radicales libres, antioxidantes, antimutagénicos, radio y fotoprotectores, antiinflamatorios, antivirales; disminuyen los niveles plasmáticos de LDL, inhiben la agregación plaquetaria, reducen la proliferación celular, bloquean el ciclo celular, inducen apoptosis, disminuyen el estrés oxidativo, aumentan la eficacia de enzimas detoxificantes, estimulan el sistema inmune, y resultan poco tóxicos (Patel, 2007; Benavente-García, 2008; Alcaraz, 2009; Sánchez-Campillo, 2009).

Son las características de los flavonoides, como la presencia de ciertos sustituyentes, la conformación espacial o la lipofilidad del compuesto, las que determinan en gran medida sus efectos biológicos (Heijnen, 2002). La actividad antioxidante de los flavonoides depende de la presencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 y de dos grupos hidroxilo en posición orto en el anillo B y otros dos en los carbonos 3 y 5 (Fig. 3a) (Benavente-García, 1997; Yang, 2001; Benavente-García, 2008; Crespo, 2008). El efecto antiproliferativo de los flavonoides frente a distintas líneas celulares tumorales aumenta si en la

molécula hay un doble enlace C2-C3 y un grupo hidroxilo en la posición 4', y es todavía mayor si, además, el compuesto es trihidroxilado (Fig. 3b), alcanzando el máximo cuando es metilado (Fig. 3c) (Rodríguez, 2002; Martínez, 2003; Benavente-García, 2008). Su capacidad antiangiogénica parece venir determinada por su actividad antioxidante, y depende del número de grupos hidroxilo presentes en el anillo B (Benavente-García, 2008). La estructura molecular también determina la afinidad de los flavonoides por distintos receptores y enzimas: la unión al receptor de tromboxano A2 (TXA2) se ve aumentada por la presencia del doble enlace C2-C3 y de un grupo ceto en el carbono 4, así como por la conjugación de los anillos A, B y C a través de una estructura de tipo lactona (Fig. 3d) (Guerrero, 2005). Para la inhibición de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) son críticos el doble enlace C2-C3 y un grupo hidroxilo en posición 4' (Fig. 3e) (Benavente-García, 2008; Ha, 2008), mientras que la estructura planar y dos grupos pequeños en el anillo A o B son determinantes para la inhibición de quinasas (Benavente-García, 2008; Lee, 2008).

Una pequeña diferencia en la estructura puede provocar que un flavonoide sea capaz de inhibir la actividad de enzimas relacionadas: así, la presencia del doble enlace C2-C3, de un grupo ceto en la posición 4 y de un grupo catecol en los carbonos 3' y 4' en el anillo B permiten el bloqueo de las quinasas dependientes de ciclinas (cdk) 1 y 2 (Fig. 3f), lo que conlleva la parada del ciclo celular en la fase G1, mientras que una molécula con un solo grupo hidroxilo en posición 4' únicamente es capaz de inhibir la cdk2, causando la parada del ciclo celular en G2/M (Fig. 3g) (Benavente-García, 2008).

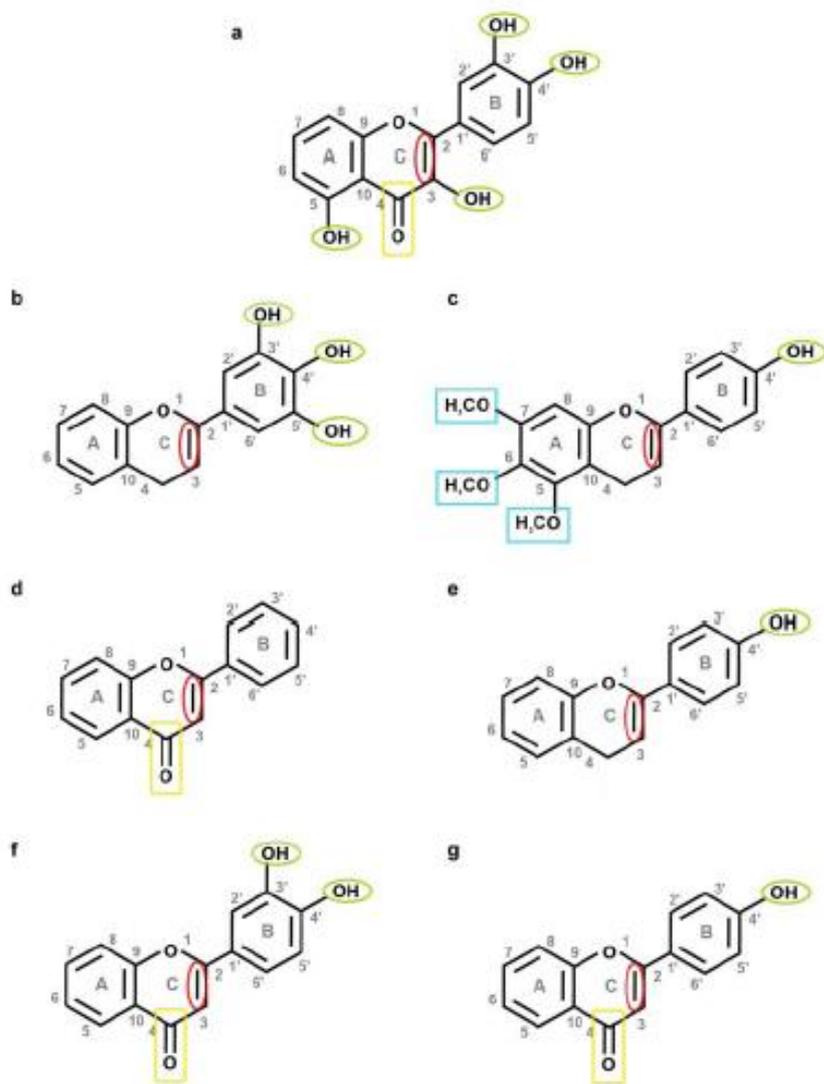


Figura 3. Relación de la estructura de los flavonoides con algunos de sus efectos biológicos: actividad antioxidante (a), antiproliferativa (b, c), afinidad por el receptor de tromboxano A₂ (d); inhibición de iNOS (e), de cdk 1 y 2 (f) y de cdk 1 (g). Rojo: enlace doble C₂-C₃; amarillo: grupo ceto; verde: grupo hidroxilo; azul: grupos metilo. Ver referencias en el texto.

Otros autores han encontrado evidencias de los efectos protectores de la ingesta de flavonoides en la dieta frente al cáncer, sugiriendo que los polifenoles podrían jugar un papel importante en esta actividad. Sus efectos

beneficiosos han sido observados en cáncer de boca, estomago, duodeno, colon, hígado, pulmón, mama, o piel. Muchos polifenoles como las prontosianidinas, flavonoides, resveratrol, taninos, epigallocatequinas, ácido gálico, y antocianinas han sido probados. Todos ellos han mostrado un efecto protector en algunos modelos aunque sus mecanismos de acción que encontraron fueron diferentes entre sí. García-Closas et al. (1999) demostraron una asociación inversa entre el consumo total de flavonoides, de quercetina o de kaempferol y el riesgo de padecer cáncer de estómago, mientras que, en otro estudio, la ingesta de catequinas se asoció con menor incidencia de cáncer rectal y del tracto digestivo alto (Arts, 2001). Las dietas ricas en quercetina o miricetina han demostrado proteger frente al cáncer de pulmón y de próstata, respectivamente, en hombres, y, en ese mismo estudio, se encontró una tendencia a un menor riesgo de cáncer de mama en mujeres con alta ingesta de quercetina (Knekt, 2002). Varios trabajos han encontrado que el consumo de isoflavonas previene el desarrollo de distintos cánceres, especialmente los relacionados con hormonas (Adlercreutz, 1995; Scalbert, 2005; Gates, 2009), mientras que los flavonoles y las flavonas, y, dentro de este grupo, la apigenina, protegen frente al cáncer de ovarios (Gates, 2007; Gates, 2009) y de mama (Patel, 2007). Sin embargo, otros estudios no encuentran ninguna relación entre el consumo de dietas ricas en estos compuestos y el cáncer (Wang, 2009).

Ahora vamos ya con descripción general de nuestros compuestos, y el efecto de unos sobre el otro.

En nuestro trabajo, hemos utilizado los flavonoides contenidos en los extractos que se describen a continuación:

2. Flavonoides/Extractos:

Apigenina/Apigenina potásica:

La apigenina (4', 5, 7 trihidroxiflavona), con fórmula C₁₅H₁₀O₅ y peso molecular 270.24 MW, existe también en la naturaleza como dímero (biapigenina). Reduce el estrés oxidativo (Patel, 2007), es sedante y ansiolítica (McKay 2006), antimutagénica (Siddique 2008; Siddique 2009) y radioprotectora (Rithidech, 2005a). Tiene efectos antitumorogénicos y antitumorales (Rithidech, 2005a; Patel, 2007) y actividad antialérgica y antiinflamatoria (Yano, 2007) y regula distintas vías de señalización (Kim, 2006; Van Dross, 2007). Por todas estas características, elegimos un derivado hidrosoluble de la apigenina, la apigenina potásica (figura 4), para el presente estudio.

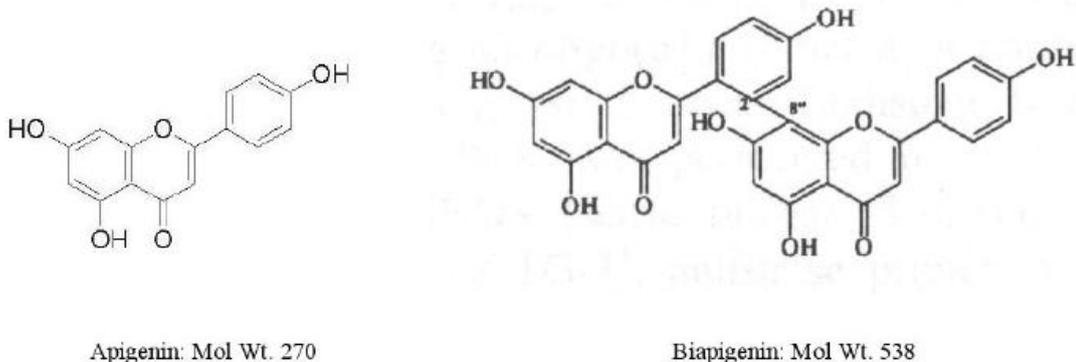


Figura 4: Estructura química de Apigenina y biapigenina

Está presente de forma abundante en frutas comunes como la uva, en bebidas derivadas de plantas como el perejil, cebolla, naranja, te, camomila, y en algunos condimentos. (Harnly, 2006; McKay, 2006; Usda, 2007). Una de las mayores formas de consumir apigenina es en la camomila de sustancias como el té preparado de las flores secas de la *Matricaria Chamomila*. Es una planta indígena procedente de Europa y el oeste de Asia, que ha sido importada a América, Australia y Europa. Las infusiones de camomila contienen el máximo de concentración de apigenina, alcanzando desde el 0.8-1.2% y está

en los aceites esenciales que dan las propiedades colorantes, saborizantes y aromáticas. La Camomila es consumida en forma de té en una tasa de alrededor de 1 millón de tazas al día. Otras formas de consumo de apigenina son el vino tinto, y elaborados de cerveza natural. En estas bebidas pueden aparecer en forma glicosilada o acetilada, siendo responsable del sabor. (Shukla 2010).

Apigenina y salud humana:

Ha ido ganando un interés creciente como agente promotor de salud a causa de su baja toxicidad intrínseca y sus llamativos efectos de protección de la célula normal frente a la cancerosa. Existe muy escasa evidencia de que promueva reacciones adversas metabólicas in vivo, cuando se consume como parte habitual de una dieta. En la actualidad ha sido recientemente reconocida como un factor quimioprotector. El interés en esta posible prevención se debe a su potente actividad antioxidante y antiinflamatoria.



Estudios recientes reportan su actividad reductora de estrés oxidativo en sangre y daño de DNA linfocitario. Se ha relacionado su actividad antioxidante con la de barrido de radicales libres. También ha mostrado actividad antimutagénica, antiinflamatoria, antiviral. Otros efectos biológicos incluyen la reducción de los niveles plasmáticos de LDL, inhibición de agregación plaquetaria y reducción de la proliferación celular. (Shukla 2010, Yang 2001, Thiery 2005, Surh 2003).

En cuanto a sus efectos antitumorales, han sido ampliamente estudiados: Inhibe la proliferación celular de varias líneas celulares neoplásicas humanas, incluyendo cáncer de mama (Yin, 2001), colon (Wang, 2000), próstata (Shukla, 2006), piel (Caltagirone, 2000), tiroides (Yin, 1999) y leucemia (Takahashi, 1998). Estos efectos inhibitorios son producidos debido a que la apigenina regula la carcinogénesis en todas sus etapas.

En la fase de iniciación, es capaz de proteger el DNA de distintas células del daño causado por compuestos genotóxicos, evitando mutaciones que podrían fomentar el desarrollo de tumores. Así, es capaz de promover la quelación metálica, regular la actividad de enzimas relacionadas con el metabolismo de carcinógenos como el citocromo P450, eliminar radicales libres o estimular a las enzimas detoxificadoras de la fase II (Patel, 2007).

En la fase de promoción, inhibe o ralentiza la división celular mediante la regulación del ciclo celular y su capacidad de inducir apoptosis (Gupta, 2001; Shukla, 2006; Shukla, 2008). Actúa como reguladora del ciclo celular en numerosas líneas celulares, entre ellas en células de cáncer mama (Yin, 2001; Choi, 2009), cuello de útero (Zheng, 2005), colon (Wang, 2000), próstata (Gupta, 2002; Shukla, 2006) y de piel (Lepley, 1997). Disminuye los niveles de varias ciclinas (A, D1, 2 y B1), inactiva a las cdk y regula positivamente a los inhibidores de las cdk. A esto se suma su capacidad para estabilizar la proteína p53, responsable de la activación de la proteína p21/waf, y de inducir la desfosforilación de Rb, evitando así la expresión de las ciclinas D y E relacionadas con la progresión del ciclo celular. Su actividad proapoptótica se debe a que aumenta la expresión de la proteína supresora p53, que aparece alterada con frecuencia en el cáncer, disminución de la expresión de las proteínas Bcl-2 y Bcl-xL (antiapoptóticas) y aumento de la expresión de Bax y Bak (proapoptóticas), aumenta el flujo de salida del citocromo c al citoplasma con la consiguiente activación de caspasa-9 y caspasa-3, activa la cascada de las caspasas e inhibe la DNA topoisomerasa II (Shukla, 2008).

En la última fase de la carcinogénesis, la progresión, la apigenina inhibe la angiogénesis y el proceso de metástasis (Fang, 2005; Hu, 2008; Lee, 2008). Se ha demostrado la apigenina que inhibe la angiogénesis en el melanoma y en el carcinoma de mama, piel, pulmón y colon (Wei, 1990; Caltagirone, 2000; Wang, 2000; Yin, 2001; Liu, 2005). Sus efectos parecen estar mediados principalmente a través de la supresión de la expresión del factor inducible por hipoxia 1- α , la ciclooxigenasa-2, la síntesis de óxido nítrico-2, la disminución del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y de la lipoxigenasa (Liang, 1999; Ramos, 2008). Al mismo tiempo la apigenina ha demostrado tener capacidad anti-metastásica al disminuir los niveles de metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs) en la línea celular SCC-4 (Yang, 2008) y en la línea celular MDA-MB231 del adenocarcinoma de mama humano (Lindenmeyer, 2001).

Naringenina/Extracto de pomelo:

Corresponde al compuesto químico 4', 5, 7 – trihidroflavanona 7-rahmnoglucosido. Es una glicosilación de una flavanona que se obtiene del tomate, uva y otros cítricos como el pomelo. (Figura 5). Está presente también en habichuelas, cerezas, coco, y orégano. Está presente en el zumo de uva en concentraciones de hasta 800mg/L. Naringina es una flavanona glicosilada compuesta de naringenina y una forma

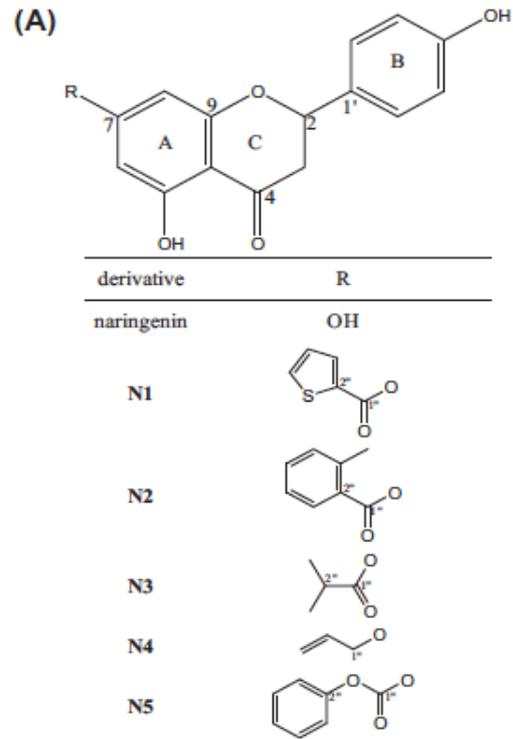


Figura 5: Estructura básica de Naringenina y derivados sintéticos

glicosilada unida al grupo hidroxilo del C7, responsable del sabor amargo. (Figura 6). (Hyuk Yoon 2012, Bharti 2014).

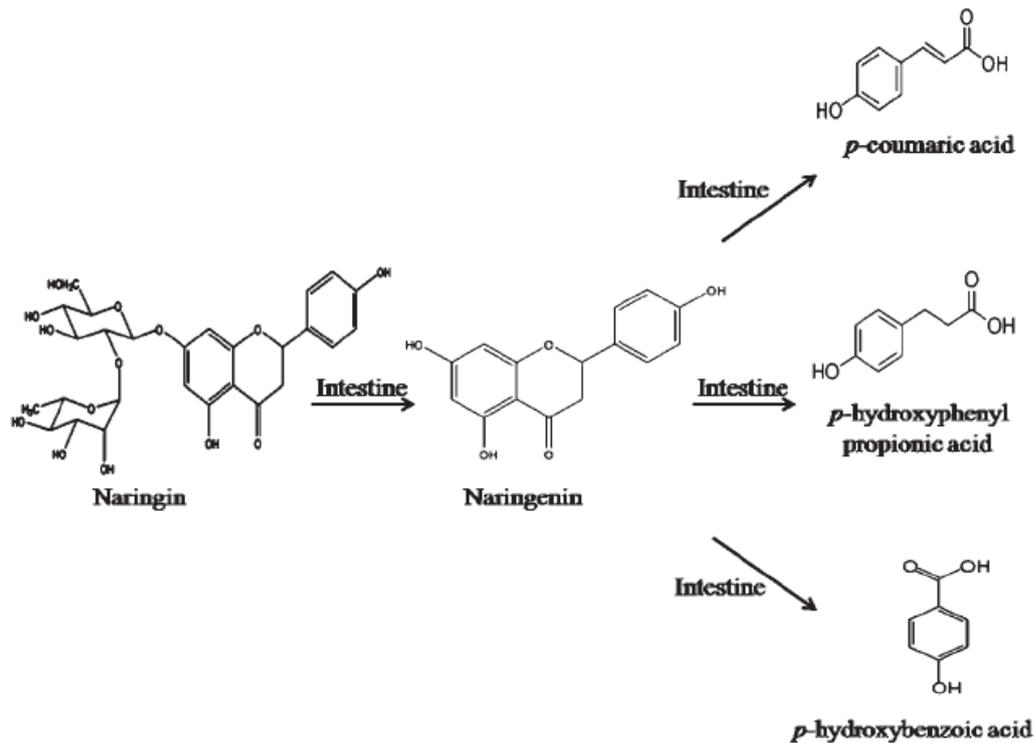


Figura 6: Estructura química Naringina y metabolitos

La naringina es un constituyente habitual de la dieta humana, estando presente en multitud de productos de consumo habitual, y la literatura está repleta de revisiones acerca de los numerosos potenciales efectos terapéuticos. De hecho se le atribuyen efectos como protección cardiovascular, hipolipemiante, antiarterioesclerótico, antidiabético, neuroprotector, hepatoprotector y anticanceroso. Esto ha hecho que se haya empelado como agente terapéutico en un gran número de alimentos humanos. (Bharti 2014, Chanet 2012, Benavente-García 2008).

El conocimiento escaso de las reacciones adversas y las propiedades farmacocinéticas y posibles interacciones con otros medicamentos, asume una vital importancia y requiere que se tomen medidas y precauciones durante el consumo de naringina como fármaco asociado a otras medicaciones.

Los estudios consultados sugieren que la naringina posee un potencial terapéutico en varias patologías humanas. En primer lugar, los datos ofrecidos por la bibliografía son escasos y el uso como medicación en humanos está limitado y deberían ampliarse estudios de efectos terapéuticos y de seguridad.

En segundo lugar: También es un constituyente natural de la dieta por lo tanto la ingesta regular de alimentos introduce naringina en el organismo; lo que no está claro es si esta administración es suficiente como para alcanzar niveles terapéuticos o si es necesario suplementación. Tampoco está claro cuánto tiempo debería ingerirse para ser beneficiosa, aunque sí parece que exposiciones cortas no tienen efecto. En tercer lugar el importante potencial de la naringina como causante de interacción medicamentosa debería recibir la debida consideración cuando se usa concomitantemente con otras medicaciones alopáticas. Sin embargo, la naringina parece representar la luz al final del túnel como un remedio que apoya los tratamientos alopáticos en su amplio rango de pretendida eficacia y la relativa escasa incidencia de reacciones adversas (Bharti 2014).



Existen estudios de diseño de compuestos derivados de la naringina y su relación y efecto in vitro sobre líneas celulares de cáncer de colon. Hay estudios de modificación de en la posición C7 de diversas flavanonas, incluida

la naringenina, valorando la actividad antiproliferativa en líneas celulares cancerosas. (Bharti 2014).

Procianidinas/Extracto de semilla de uva:

Los extractos procedentes de uva están siendo ampliamente estudiados debido a sus efectos beneficiosos sobre gran número de patologías incluyendo cáncer (Huang 2012), trastornos cardiovasculares (Du Y 2007, Huang 2012), o de base inflamatoria como la colitis ulcerosa (Wang 2011, Cheah 2013).

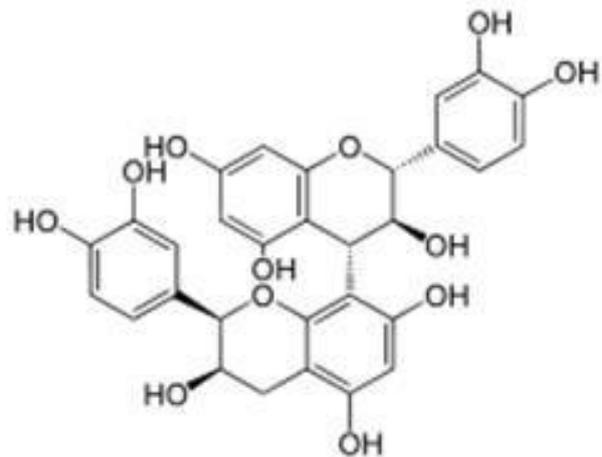


Figura 7: Estructura química de la proantocianidina.

Parece que estos efectos beneficiosos sobre la salud son debidos a los compuestos polifenólicos conocidos como procianidinas (PC), formadas por subunidades de flavanol-3-ol. Pero debido a su estructura polimérica, la absorción celular está restringida a los oligómeros con bajo grado de polimerización. Las moléculas más largas son absorbidas en la luz intestinal tras la ingesta. Existen multitud de estudios que sugieren que los extractos de semilla



de uva reducen la proliferación de las células cancerosas sin presentar toxicidad sobre las células sanas (Engelbrecht 2007). Además la administración de extractos de semilla de uva parece disminuir el daño en la mucosa intestinal, reduciendo la toxicidad de la quimioterapia en modelos animales de mucositis (Cheah 2007).

Sin embargo, el mecanismo de acción sobre el crecimiento celular sigue siendo desconocido, pero existen evidencias que indican que los extractos de semilla de uva podrían interferir en sistemas de señalización. En concreto ha sido publicado que podrían ser inhibidores del receptor de andrógenos en el cáncer de próstata y del factor de crecimiento epidérmico en células de cáncer de colon (Cheah 2014).

Hesperetina, Eriocitrina/Extracto de piel de limón

La eriocitrina es una flavanona que se encuentra en forma glicosilada en el hidroxilo situado en el C-7, esta glicosilación es de la estructura β -rutinosido (eriodictyol 7-O-rutinoside) (Figura 8). Es muy abundante en el limón y en la lima, obteniéndose de la piel de estos frutos cítricos. Las hojas de menta (*Mentha piperita L.*), constituyen también una fuente importante de polifenoles, siendo la eriocitrina (383,3 +/- 2,2 mg/g de extracto) y el ácido rosmarínico (381,2 +/- 1,9 mg/g extracto) los componentes más abundantes identificados dentro de estas hojas (Dorman, 2009). La menta es un remedio ampliamente conocido en la medicina tradicional que sirve para aliviar los trastornos digestivos. Sus hojas son, así mismo, útiles en el tratamiento de la bronquitis, diabetes, diarrea, fiebre, hipertensión, ictericia, náuseas, dolor, afecciones respiratorias e infecciones del tracto urinario (Baliga, 2010).

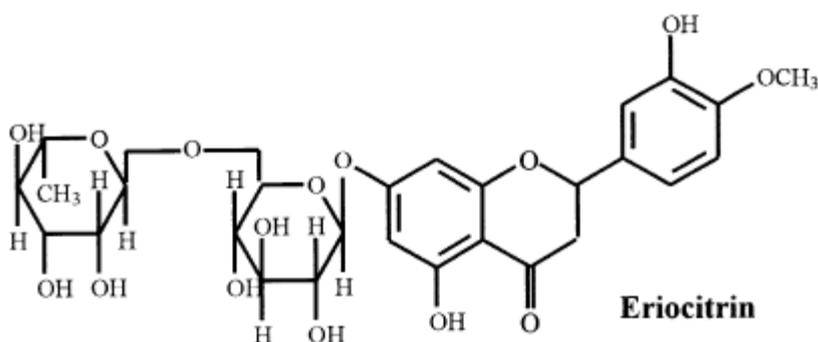


Figura 8: Estructura química de la eriocitrina.

La eriocitrina posee la actividad más antioxidante de todos los flavonoides glicosidos presentes en frutos de limón (Tripoli, 2007). Así se ha observado que, la eriocitrina suprime de forma significativa el estrés oxidativo inducido con estreptozotocina en el hígado de ratas diabéticas (Miyake, 1998) o causados por el ejercicio físico en ratas (Minato, 2003).

La hesperetina corresponde al compuesto 5,7,3´trihydroxyl4´methoxyflavanona. Es uno de los flavonoides más abundantes en cítricos, como limones, naranjas y uvas.



Muestra un amplio abanico de efectos como antiinflamatorio, anticanceroso, antihipertensivo, antiaterogénico y antioxidante. Inhibe la oxidación de LDL in vitro, y la actividad de la HMG-CoA reductasa in vivo.

Epicatequinas/Extracto de cacao

El cacao, que se obtiene de las semillas de *Theobroma Cacao*, es una importante fuente dietética de antioxidantes dado su elevado contenido en flavonoides, principalmente flavanoles (Adamson, 1999). Los flavanoles del cacao se presentan en dos formas estructurales, como entidades únicas o monómeros, o como estructuras oligoméricas (polímeros).

Dentro de los flavanoles, los monómeros más importantes que se encuentran en el cacao y en sus subproductos, están las catequinas o flavan-3-oles, y entre los productos poliméricos, las procianidinas (58%). La principal

catequina es la (-)-epicatequina, que supone aproximadamente el 35% del total de los polifenoles presentes en el cacao (Figura 9) (Wollgast, 2000).

Las catequinas y procianidinas aisladas en el cacao tienen fuertes propiedades antioxidantes in vitro, como se demuestra al comparar las catequinas del chocolate con las del té, con respecto a las cuales muestran un efecto antioxidante 4 veces mayor (Art, 1999), siendo las catequinas y sus oligómeros unidos por enlace C4→C8 las de mayor efecto (Osakabe, 2002).

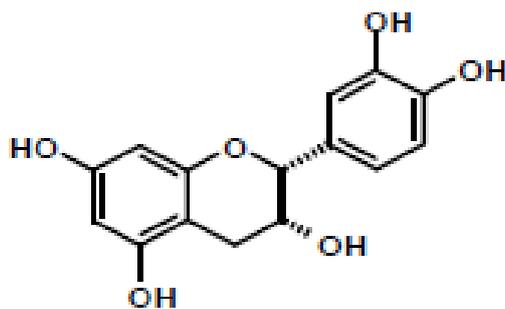


Fig. 9. Estructura química de la (-)-epicatequina.

Los productos de cacao tienen efectos beneficiosos para la salud ya que protegen contra el estrés oxidativo y la inflamación crónica, que son factores de riesgo para ciertas enfermedades crónicas, como las enfermedades cardiovasculares y el cáncer.

Los polifenoles del cacao previenen del riesgo de padecer enfermedad cardiovascular ya que: inhiben la oxidación de las LDL (Wan, 2001; Mathur, 2002); incrementan la producción del óxido nítrico en el tejido endotelial, efecto que se traduce en una acción vasodilatadora (Hermann, 2006), y de relajación vascular (Karim, 2000); inhiben tanto la activación como la agregación de las plaquetas en los vasos sanguíneos, efecto fisiológico que se complementa con la acción inhibitoria de la oxidación de las LDL (Rein, 2000; Hermann, 2006).

Recientemente han suscitado gran interés investigador por su gran eficacia quimiopreventiva. Como antioxidantes, los flavonoles del cacao han demostrado capacidad para limitar los factores de riesgo relacionados con el cáncer y otras enfermedades crónicas (Visioli 2009, Vinson 2006). Pero además, parece que podrían poseer otras actividades anticancerosas independientemente de las clásicas antioxidantes (D'Archivio 2008). En particular, recientes estudios in vitro han demostrado que determinados compuestos fenólicos del cacao pueden regular diversas señales de transducción (Martín 2010, Rodríguez-Ramiro 2005), activar factores de transcripción redox-sensibles (Granado-Serrano 2010) y modular la expresión de genes específicos involucrados en la supervivencia y muerte celular (Gonzalez-Sarrias). Por otro lado, comparado con otros alimentos ricos en polifenoles, los productos obtenidos del cacao presentan una alta concentración de procianidinas que no son absorbidas en el intestino, y consecuentemente sus efectos beneficiosos podrían focalizarse en el tracto gastrointestinal, donde podrían desarrollar una importante función local neutralizando especies reactivas del oxígeno.

Así mismo el cáncer es un ejemplo de las patologías que se relacionan con un aumento en la concentración de radicales libres (RL) en el organismo. La vulnerabilidad de las proteínas y el ADN al potencial oxidativo de organismo humano se ha considerado un factor carcinogénico de gran importancia. Las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, que se forman continuamente en el organismo como resultado de diferentes reacciones bioquímicas, pueden causar un daño oxidativo significativo, además de los carcinogénicos ambientales. Diferentes estudios experimentales han revelado las propiedades de los polifenoles del cacao para inhibir el daño oxidativo sobre el ADN de la célula de algunos carcinógenos externos (acción antígenotóxica), mostrando así su rol protector en la prevención del cáncer (Ohno, 2009). Se ha observado un efecto protector de los polifenoles del cacao contra la aflotoxina B1, que es un potente mutágeno y carcinógeno; la acción se produce al evitar la unión de

ésta y el benzoalfapireno con el ADN. La epicatequina tiene un efecto antimutagénico sobre uno de los componentes del tabaco, ya que previene su oxidación a la forma activa que daña el ADN. (Jardine, 1999).

También se ha investigado las propiedades de las flavonas del cacao en las diferentes etapas de la carcinogénesis. La procianidina obtenida de extractos de semilla de cacao, causa detención del ciclo celular en la fase G2 / M y una inhibición del crecimiento del 70% en las células Caco-2, una línea celular del cáncer de colon (Carnesecchi, 2002). Otro estudio ha demostrado los efectos de las procianidinas para inhibir selectivamente la proliferación del cáncer de mama humano mediante la desfosforilación o desregulación de varias proteínas implicadas en la progresión del ciclo celular (Ramljak, 2005). Amin et al., indicaron que el extracto de licor de cacao puede reducir la actividad de las enzimas de los marcadores tumorales en la hepatocarcinogénesis (Amin, 2004). Bisson et al., demostraron que los polifenoles del cacao disminuían la hiperplasia de próstata a través de la reducción de los niveles de dihidrotestosterona (Bisson, 2007). Posteriores estudios realizados por este autor, demostraron que también reducía la incidencia de tumores de próstata si se administraba previamente a la inducción del proceso de carcinogénesis (Bisson, 2008). Los polifenoles del cacao, a la concentración más alta ensayada (0,2%), inducen la inhibición completa del crecimiento en las líneas celulares metastásicas DU 145 y no metastásicas 22Rv1 del cáncer de próstata (Jourdain, 2006). Las procianidas del cacao inhiben, además, la expresión del gen de la tirosina quinasa ErbB2, lo que puede resultar en una disminución de la proliferación de células endoteliales disminuyendo de este modo la angiogénesis asociada a la patología tumoral (Kenny, 2004).

De igual forma, la inflamación crónica, incrementa la posibilidad de aparición del cáncer debido a que origina un recambio celular continuo estableciendo un ambiente propicio para la carcinogénesis (Willett, 2002). Respecto a la respuesta inflamatoria, las procianidinas del cacao han mostrado

la capacidad de modular las citokinas involucradas en la respuesta inflamatoria aguda (Steinberg, 2002). Tienen, además, un efecto inhibitorio sobre la fosfolipasa A2, la ciclooxigenasa y lipooxigenasa, disminuyendo de esta forma los niveles de prostaglandinas, sustancias que incrementan la respuesta inflamatoria (Wollgast, 2000).

3. Cáncer de Colon

3.2. Epidemiología:

La principal causa de muerte entre los mayores de 65 años en España son las enfermedades del aparato circulatorio (109.027 fallecimientos). El cáncer es la segunda causa de muerte con 77.788 fallecidos, de los cuales más de 14.000 se deben al CCR. La edad media de presentación del CCR en nuestro país es alrededor de los 70 años, con un predominio del sexo masculino en proporción de 1,5/1. (Morillas 2012).

La supervivencia media del CCR en España es similar a la de los países europeos de nuestro entorno y se estima que a los 5 años del diagnóstico sobreviven el 54,7% de los pacientes con cáncer de colon y el 50,2% de los que sufren cáncer de recto.

Según los datos del Instituto Nacional de Estadística, en el *año 2009 fallecieron en España 14.238* personas de cáncer colorrectal (CCR), lo que representa alrededor de 260 muertes semanales¹. En números absolutos, y según la misma fuente, dicha cifra supone un *aumento del 2,93% con respecto al año 2008 y del 22% si se compara con la publicada en 1999 (11.300 fallecimientos)*. El CCR es la segunda causa de muerte por tumores en España y en los países de la Unión Europea, tras el cáncer de pulmón. Se considera que el CCR representa la séptima causa global de fallecimiento en España¹. Las comunidades autónomas (CC.AA.) con mayor índice de mortalidad son Asturias, País Vasco, Galicia, Castilla-León, La Rioja y Cataluña; en el extremo opuesto están Ceuta, Melilla y Castilla-La Mancha. En la actualidad, el CCR es el tumor más frecuente en la población española si se consideran ambos sexos en conjunto, con un patrón de incidencia anual ascendente que alcanza el 2,5% en los hombres. La incidencia anual ajustada, según la edad, del CCR en

España es de 60,4/100.000 en los hombres y 34,10/100.000 en las mujeres, con tasas similares a la media de los países de la Unión Europea que son 60,5 y 37,2, respectivamente. En el año 2002 la incidencia estimada de CCR en España fue de 21.964 casos nuevos, mientras que 5 años después, en 2007, la cifra alcanzaba casi los 26.000 casos nuevos de la enfermedad. (Navarro 2012).

Las estimaciones epidemiológicas para el año 2012 son que se superaran los 33.000. Ello supone que en España casi 600 personas serán diagnosticadas de CCR todas las semanas, lo que equivale a 85 casos diarios.

Después del CCR se calcula que los tumores más frecuentes serán el cáncer de próstata (29.990 casos), el cáncer de mama (27.700 casos) y el cáncer de pulmón (25.300 casos).

En cuanto a los datos de prevalencia, también el CCR es el segundo tumor más frecuente en España, con más de 65.000 casos a los 5 años, solo por detrás del cáncer de mama (69.993 casos). Además, si se analizan las causas de ingresos hospitalarios en nuestro país por enfermedades oncológicas, el CCR es el tumor que provoca el mayor número de altas y de estancias hospitalarias. En el año 2009, se produjeron 43.379 altas hospitalarias por CCR con un número de estancias de 622.630. Estas cifras son muy superiores a las de otros tumores como el cáncer de pulmón, 32.319 altas y 347.494 estancias hospitalarias, y el cáncer de mama, con 32.034 y 161.067, respectivamente. Todo ello implica un elevado consumo de recursos sanitarios. Si se analiza la situación en los países europeos, los datos con respecto al CCR son similares a España. En Europa se diagnosticaron, en el año 2008, 3.200.000 casos nuevos de cáncer y fallecieron 1.700.000 personas por la enfermedad. En conjunto, el tumor más frecuente fue el CCR con 436.000 casos, lo que representa el 13,6% de todos los tumores, seguido del

cáncer de mama (13,1%), cáncer de pulmón (12,2%) y cáncer de próstata (11,9%).

Con respecto a la mortalidad, el CCR es la segunda causa de muerte por cáncer en Europa (212.000 casos), por detrás del cáncer de pulmón (342.000 casos), y muy por delante del cáncer de mama (129.000) y cáncer gástrico (117.000).

El CCR es el tercer tumor más frecuente en el mundo y la cuarta causa de fallecimiento por cáncer. Las aéreas geográficas con mayor incidencia son Australia, Nueva Zelanda, Estados Unidos (EE.UU.), Canadá y Europa, cuyas cifras prácticamente duplican las observadas en países asiáticos, excepto Japón y América del Sur. En el año 2008 se diagnosticaron en el mundo 1.200.000 casos nuevos de CCR (9,7% del total de tumores malignos), y fallecieron más de 600.000 personas. En los próximos decenios se estima que la incidencia aumentara un 80%, hasta superar los 2.200.000 casos anuales, con un incremento subsecuente de mortalidad. (Navarro 2012).

3.3. Herencia:

La mayoría de los casos de CCR (70%) se consideran esporádicos, ya que se producen en individuos mayores de 50 años, sin antecedentes personales ni familiares de la enfermedad, y se definen como población de riesgo medio.

En alrededor del 20-25% de los pacientes con CCR existen antecedentes familiares de la enfermedad, sin un patrón de herencia definido, y se denominan formas familiares. Por último, aproximadamente el 5% de los CCR acaecen en familias con síndromes hereditarios en los que se han identificado los genes relacionados, de baja frecuencia pero gran penetrancia, lo que conlleva un riesgo elevado de presentar la enfermedad. Las formas familiares y hereditarias se engloban como población de alto riesgo, y en ellas es obligado implantar programas de cribado y vigilancia primordialmente

mediante técnicas endoscópicas. Dentro de los cuadros hereditarios que existen en CCR, se puede dividir a la población en pacientes con síndrome de Lynch –también llamado cáncer de colon hereditario no polipósico- y pacientes con síndrome polipósico, los cuales a su vez se subdividen en adenomatosos y no adenomatosos (Morillas 2012).

3.4. Patología molecular del cáncer de colon:

En el cáncer de colon, como en la mayoría de los tumores, la acumulación de alteraciones oncogénicas se produce de manera progresiva, desde lesiones iniciales hiperplásicas, con displasia, hasta la formación de adenomas, de carcinomas intraepiteliales, de carcinomas infiltrantes y finalmente de metástasis ganglionares y/o a distancia. Todo este proceso de cambios histopatológicos requiere la acumulación de numerosas alteraciones moleculares que puede conllevar más de 10 años. Molecularmente, se pueden distinguir 2 grandes tipos de tumores de colon, con un origen genético diferente. El primero de ellos, y más frecuente (85%), se encuentra asociado a inestabilidad cromosómica, mientras que el otro grupo está asociado a la presencia de inestabilidad de microsatélites o a alteración de genes específicos de reparación del ADN (alrededor del 8-12%). Los avances en este campo en el entendimiento de las bases moleculares son la clave para un adecuado manejo. Desde la época en que se formuló el modelo de secuencia de carcinogénesis adenoma-carcinoma, hasta hoy día, se han identificado tres vías de carcinogénesis mayores que hacen pensar en cada cáncer colorrectal como diferentes entidades en sí mismas. Diferentes vías de inestabilidad cromosómica o de microsatélites dan lugar a diferentes fenotipos moleculares de tumores colorrectales. El conocimiento de estas bases dará lugar al tratamiento y manejo más especializado descubriendo nuevas dianas terapéuticas individualizadas (Hernandez-Losa 2011).

3.5. Anatomía patológica del cáncer de colon:

El aspecto macroscópico de los cánceres colorrectales es similar al de los adenocarcinomas de cualquier otra localización del aparato digestivo. Tienden a ser polipoides y ulcerosos o infiltrantes, y pueden ser anulares o constrictivos. Los cánceres polipoides son más frecuentes en el colon derecho, en particular en el ciego, donde el gran calibre del colon permite el desarrollo intraluminal sin impedimentos. Los tumores constrictivos anulares son más frecuentes en los segmentos distales del colon. Es frecuente la ulceración de los tumores, independientemente de su patrón de desarrollo.

La gran mayoría de los cánceres colorrectales son adenocarcinomas que son microscópicamente similares a los localizados en otros tramos del aparato digestivo.

Alrededor del 10-15% secretan cantidades considerables de mucina y se denominan adenocarcinomas mucinosos. El grado de diferenciación influye en el pronóstico; los tumores más diferenciados tienen tendencia a presentar un pronóstico más favorable. El cáncer colorrectal se disemina por propagación directa o por invasión de los vasos. La diseminación directa del cáncer colorrectal se observa con frecuencia en muestras resecadas. Los tejidos conjuntivos de la serosa ofrecen poca resistencia a la diseminación del tumor, y a menudo se detectan células cancerosas en el tejido adiposo y en la serosa a cierta distancia del tumor primario. En ocasiones, el peritoneo está afectado, y en este caso, puede haber múltiples depósitos en todo el abdomen. El cáncer colorrectal invade los vasos linfáticos, y afecta inicialmente a los ganglios linfáticos situados inmediatamente por debajo del tumor. La invasión venosa da lugar a metástasis de transmisión hemática, que en la mayoría de los pacientes con enfermedad metastásica afectan al hígado. El pronóstico del cáncer colorrectal está más estrechamente relacionado con la

extensión del tumor a través de la pared del intestino grueso que con su tamaño o sus características histopatológicas. Los cánceres colorrectales a menudo se clasifican según la clasificación de Dukes modificada por Astler y Coller usando los criterios siguientes:

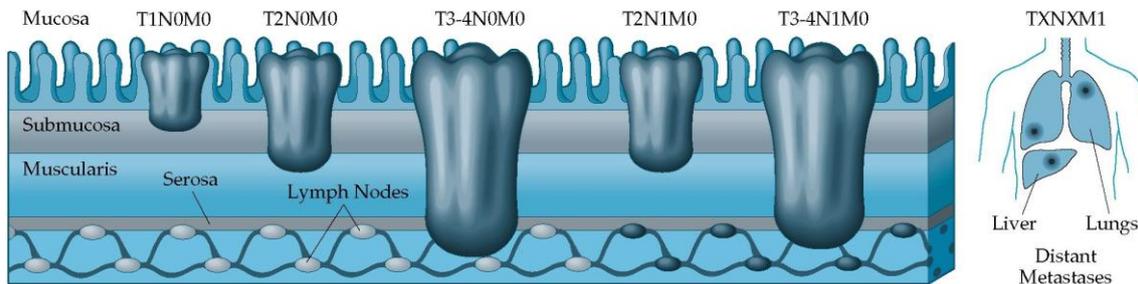


Figura 10: Estadaje TNM

Estadio A: Tumor limitado a mucosa.

Estadio B1: El tumor invade la muscular propia, pero no penetra en la serosa.

Estadio B2: El tumor invade la serosa pero no presenta metástasis en ganglios linfáticos.

Estadio C1: tumores B1 con metástasis a ganglios linfáticos regionales.

Estadio C2: tumores B2 con metástasis a ganglios linfáticos regionales.

Estadio D: metástasis a distancia.

(Rubin 2006)

3.6. CONSUMO DE FLAVONOIDEOS EN LA DIETA Y RIESGO DE CÁNCER COLORRECTAL

El cáncer colorrectal es la tercera neoplasia más común en el mundo desarrollado. Algunos factores relacionados con el estilo de vida como la actividad física, la obesidad, o el consumo de alcohol son factores de riesgo de cáncer colorrectal bien conocidos. Respecto a los relacionados con la dieta, el consumo elevado de carne roja se considera perjudicial, y el de fibra o calcio,

protector. En 2007, la fundación internacional de investigación oncológica (World Cancer Research Found) y el instituto Americano de Investigaciones Oncológicas (American Institute for Cancer Research) concluyeron que existen evidencias suficientes para considerar que una dieta rica en frutas y verduras puede proteger del cáncer colorrectal. (Wang 2013, Parkin 2002).

Las principales moléculas bioactivas frente a este y otros tipos de cáncer presentes en la dieta son flavonoides lignanos, abundantes en alimentos vegetales como frutas, verduras, cereales, té, vino o cacao. Estos polifenoles poseen propiedades anticancerosas que incluyen efecto antimutagénico, antiproliferativo, antiinflamatorio, inmunomodulador así como efectos antioxidantes como mejorar la sensibilidad a la insulina, modular señales celulares, y regular el ciclo celular y la angiogénesis.

Al menos seis trabajos caso-control han investigado la relación entre el consumo de antioxidantes y el cáncer colorrectal, uno de ellos en adenocarcinomas recidivantes (Yang 2011, Yang G 2007, Sun 2007, Zhang 2010, Je Y 2005, Galeone 2010, Suzuki 2009). Todos ellos han encontrado una relación inversa entre el riesgo de cáncer colorrectal y el consumo de ciertos subgrupos de flavonoides o flavonoides individuales concretos. Sin embargo, en estudios de cohortes o se ha encontrado una relación significativa entre la ingesta de flavonoides y el cáncer colorrectal, salvo en el estudio “Iowa women’s health” (U. S. Department of agriculture. Database 2010).

En un estudio prospectivo realizado en Norfolk, se sugería que el consumo de fitoestrógenos, especialmente lignanos mostraba una relación inversa con el riesgo de padecer cáncer colorrectal, sin embargo no pudo establecer una asociación entre dicho riesgo y los biomarcadores de fitoestrógenos en plasma o e orina. La diversidad de métodos de estudio y el uso de bases de datos antiguas en cuanto a la composición de los alimentos podrían explicar estas incongruencias. Además la biodisponibilidad de los

flavonoides difiere mucho entre subclases, por lo que es importante estudiarlos de forma individualizada.

En España, Zamora–Ros 2012 estudiaron la relación existente entre una dieta rica en flavonoides y lignanos y el cáncer colorrectal en pacientes del hospital de Bellvitge (Barcelona). En este estudio caso control se incluyeron 424 casos de pacientes con cáncer colorrectal y 401 controles de la base de datos de hospital, a los que se les realizaron cuestionarios validados y encuestas personales. Encontraron una relación inversa entre la ingesta total de flavonoides, lignanos, y los subgrupos de flavonoides, flavononas y prontosianidinas, y el riesgo de cáncer colorrectal, concluyendo que una dieta rica en estos agentes podría proteger frente a este tipo de de cáncer.

Sin embargo en el estudio realizado por Wang et al (2013), en la población japonesa de Fukuoka, se obtuvieron resultados diferentes. También se trataba de un estudio caso-control, con 816 casos de cáncer colorrectal y 815 controles. Se investigó sobre 148 ítems alimenticios que fueron recogidos mediante entrevista. Estos ítems estaban repartidos en las categorías de polifenoles totales, polifenoles del té, polifenoles del café. No hubo diferencias en el consumo de polifenoles totales ni los del té entre el grupo con cáncer colorrectal y el grupo control, pero sí que se observó un descenso estadísticamente significativo del consumo de polifenoles del café entre el grupo con cáncer colorrectal y el control, por lo que estos autores concluyen que la ingesta de café podría disminuir el riesgo de cáncer colorrectal.

4. Cultivos celulares.

CLAUDE BERNARD a finales del siglo XIX, estableció por primera vez las bases teóricas para crear un sistema artificial en el que pudieran sobrevivir las células o tejidos extraídos de un organismo vivo, independientemente de él. No obstante, se considera a ROSS HARRISON (1907) el iniciador de los cultivos de tejidos, puesto que fue quien comenzó a cultivar tejidos de anfibios. Durante esa época, la limitación más importante para el establecimiento de los cultivos era poder conseguir un medio nutritivo adecuado.

A principios del siglo XX, se inició el uso de los cultivos celulares y tisulares, que proporcionaron un método que permitía estudiar órganos y tejidos aislados del medio original, lo que hizo posibles conocer mejor la composición, fisiología, metabolismo, bioquímica y biología molecular de los cultivos.

Los estudios in vitro con cultivos de células animales permiten obtener datos preliminares del efecto biológico de cualquier molécula, sustancia o medicamento sobre células eucariotas en un sistema de variables ambientales muy controladas.

Entre las aplicaciones de los cultivos destacan:

- mantenimiento y propagación de líneas tumorales,
- requerimientos nutricionales y de factores de crecimiento,
- estudio de las interacciones célula-sustrato y célula-célula,
- estudios sobre la diferenciación y desdiferenciación celular,
- manipulación genética de células eucarióticas,
- obtención de sustancias del sobrenadante producidas por el cultivo (anticuerpos monoclonales, enzimas, factores de crecimiento),
- mantenimiento y obtención de virus,

- estudio del crecimiento y características antigénicas de una población celular,
- efectos citostáticos y citotóxicos de sustancias, etc.

Así, mediante tests de proliferación y citotoxicidad bien contrastados pueden determinarse, como es objetivo de este trabajo, valores de crecimiento y viabilidad celular de cultivos en contacto con la sustancia a ensayar respecto de cultivos control sin tratamiento. Cuantitativamente, uno de los datos farmacéuticos más relevantes que suele extraerse de estos tests biológicos es el valor de IC 50, que permite conocer la concentración a la cual una sustancia provoca una inhibición de funciones sobre un sistema biológico in vitro, de modo que puede determinarse de manera precisa la concentración de sustancia que provoca una inhibición de la proliferación celular de un 50 % respecto del control.

En particular, la **línea celular Vero** se utiliza en investigación fundamentalmente para realizar bioensayos de nuevos fármacos en los que se pretende comprobar en primera instancia su citotoxicidad o el efecto sobre la proliferación de células animales sanas. Presenta características genotípicas favorables, relativamente libre de variabilidad con el tiempo frente a otras líneas de células sanas sin genes tumorales naturales ni inducidos, ausencia de agentes externos o contaminantes, su cariotipo aneuploide estable que no forma tumores dentro de un rango amplio de subcultivos y su rápido crecimiento y adaptabilidad rentabiliza los ensayos. Además de todo ello ha sido la línea celular de elección para nuestro estudio debido a la relativamente escasa bibliografía en la que se relaciona a sustancias extraídas de materias primas vegetales con estructuras moleculares determinadas. Además la línea celular Vero se emplea como sustrato para la formación de colonias víricas y ensayos posteriores con diferentes sustancias antivirales y sus efectos en diversas especies de virus. Sin embargo el principal uso de esta línea es la producción industrial de varias vacunas, entre la que destaca la de la

poliomielitis, ampliamente distribuidas en la actualidad, en cuyo proceso de síntesis cultivos masivos de células Vero se usan como sustrato para la multiplicación vírica masiva y la obtención y posterior tratamiento de los antígenos producidos o virus inactivos.

La **línea celular CaCo-2**, derivada de un adenocarcinoma de colon humano, fue desarrollada por el Instituto para la Investigación oncológica Sloan-Kettering en la investigación coordinada por el profesor Jorgen-Fogh. Aunque derivan de adenocarcinoma de intestino grueso, cuando se cultivan bajo condiciones específicas se diferencian y polarizan sus núcleos de tal manera que su fenotipo, morfológica y función, se asemeja a los enterocitos que recubren el intestino delgado. Las células Caco-2 expresan uniones estrechas, microvellosidades, y un número de enzimas y transportadores que son características de estos enterocitos: peptidasas, esterases, P-glicoproteína, transportadores de captación de aminoácidos, ácidos biliares, ácidos carboxílicos, etc.

Las células Caco-2 se usan más comúnmente en confluencia que de forma aislada, formándose una monocapa de células epiteliales polarizadas que proporciona una barrera física y bioquímica para el paso de iones y moléculas pequeñas. La monocapa Caco-2 se utiliza ampliamente en toda la industria farmacéutica como un modelo in vitro de la mucosa intestinal humana para predecir la absorción de fármacos administrados por vía oral. La correlación entre la permeabilidad aparente vitro a través de monocapas de Caco-2 y la fracción absorbida in vivo (FA) está bien establecida.

II. OBJETIVOS

- Estudiar el **efecto** de los extractos de semilla de uva, extracto de cacao, extracto de pomelo, extracto de piel de limón y extractos vegetales purificados de apigenina potásica y de naringenina potásica sobre la **viabilidad y proliferación** de las líneas celulares Vero y CaCo-2.
- Determinar la **influencia sobre la apoptosis y el ciclo celular** de diversas concentraciones de dichos extractos vegetales sobre ambas líneas celulares.
- Establecer un **orden en la capacidad antiproliferativa** atendiendo a la conformación molecular de flavonoides, flavonoides glicosilados y polímeros de flavonoides.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL

1.1. Líneas celulares.

La **línea celular Vero** (European Collection of Cell Cultures) son células adherentes establecidas a partir de células de túbulo renal de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Fue establecida el 27 de marzo de 1962 por Yasumura y Kawakita en la Universidad de Chiba, Japón. Se trata de una línea celular continua muy estable, libre de agentes contaminantes o infecciosos y de marcada aneuploidía. Desde su establecimiento como línea continua su utilización se ha extendido por en laboratorios de todo el mundo debido fundamentalmente a que durante décadas ha constituido el sustrato para la obtención de la vacuna de la poliomielitis.

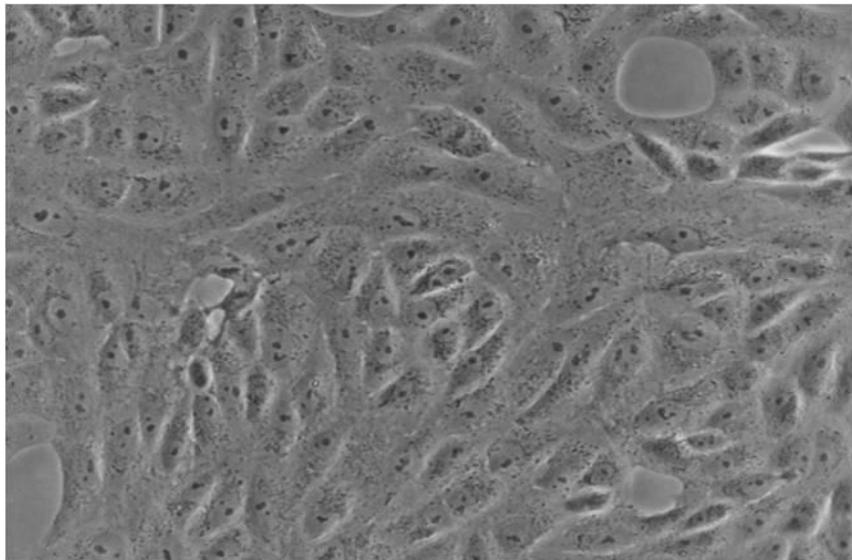


Figura 11: células Vero en cultivo.

Línea celular CaCo-2, derivada de un adenocarcinoma de colon humano (ATCC® HTB-37, EEUU). Aunque derivan de adenocarcinoma de intestino grueso, cuando se cultivan bajo condiciones específicas se asemejan a los enterocitos del intestino delgado. La línea Caco-2 en cultivo forma una monocapa de células epiteliales polarizadas que proporciona una barrera física

y bioquímica para el paso de iones y moléculas pequeñas, que es ampliamente utilizada por la industria farmacéutica como modelo in vitro de la mucosa intestinal humana para predecir la absorción de fármacos administrados por vía oral.

1.2. Medio de cultivo y reactivos.

- Para la línea Vero, el medio nutritivo para el mantenimiento del cultivo fue Medio Mínimo Esencial de Dulbecco, o DMEM (Gibco, USA) con rojo fenol como indicador de pH. Suplementamos el medio de cultivo con 10% de suero bovino fetal (Gibco, USA), glutamina 4 mM (Gibco, SA) y los antibióticos penicilina (100µg/mL) y estreptomina (100u/mL) (Gibco, USA).
- La línea Caco2 fue mantenida en medio EMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal, 1% de aminoácidos no esenciales, 1 mM de piruvato sódico, 2 mM de L-glutamina y 50 µg/mL de gentamicina.
- Bromuro de 3-(4-(4-dimetil-1H-1,2,4-triazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolio (Sigma-Aldrich, USA) o MTT.
- Dimetil sulfóxido (Sigma-Aldrich, USA).
- Para el crecimiento y mantenimiento de los cultivos celulares empleamos tripsina, ácido etilendiaminotetraacético (Sigma Co. España).
- Para el análisis del ciclo celular utilizamos yoduro de propidio y ribonucleasa A (Sigma Co. España), tampón fosfato salino y etanol puro (Sigma Co. España).

- Para el análisis de apoptosis empleamos el kit de detección de apoptosis Alexa Fluor® 488 AnnexinV, con anexina V y yoduro de propidio (Catalog. No. V13241; Invitrogen, USA), estaurosporina y tampón fosfato salino (Sigma Co. España).



Figura 12: Cabina de flujo laminar

1.3. Compuestos polifenólicos.

Nuestros criterios para seleccionar los extractos a investigar consistieron en rastrear familias de materias primas que permitieran obtener productos solubles en agua, sin necesidad de disolventes orgánicos en los trabajos con células. Consideramos productos o moléculas que fueran foco de atención actual de investigaciones y mercados gracias a referencias bibliográficas y compendios de artículos científicos con resultados concluyentes tanto clínicos como *in vivo* en animales de experimentación.

Tres familias de materias primas abarcan la selección de extractos elegidos:

- a) Cítricos: *EPL*; *EP*; *Apigenina potásica*; *Naringenina potásica*.
- b) Uva: *ESU*
- c) Cacao: *EC*

Los extractos vegetales (Nutrafur, España) testados fueron:

- Extracto de piel de limón (*EPL*).
- Extracto de pomelo (*EP*).
- Apigenina potásica.
- Naringenina potásica.
- Extracto de cacao (*EC*).
- Extracto de semilla de uva (*ESU*).

Patrones cromatográficos:

- Apigenina, naringenina, catequina, epicatequina, teobromina, dímero B2, naringina, neohesperidina (Sigma-Aldrich, USA).
- Eriocitrina, oleuropeína (Extrasynthese, Francia)

2. MÉTODOS.

a) Mantenimiento y conservación de la línea celular.

Crioconservación de la línea celular: Conservamos varios viales con 1×10^6 de células en un tanque de nitrógeno líquido hasta su empleo, previa descongelación y readaptación de las células a una nueva serie de ciclos de crecimiento. El reestablecimiento del contenido del vial congelado consistía en una rápida descongelación por inmersión en baño a 37°C. Inmediatamente en cabina de flujo laminar trasvasamos el contenido del vial a un tubo de centrífuga estéril y adicionamos 5 ml de medio de cultivo; de este modo diluimos el agente crioprotector, reduciendo sus efectos negativos sobre la supervivencia de las células descongeladas. A continuación centrifugamos durante 10 minutos a 200 g, tras lo cual eliminamos el sobrenadante.

Resuspendimos el *pellet* con 2 ml de medio de cultivo. Tomábamos una alícuota del resuspendido, la teñimos con el colorante vital azul tripán y llevábamos a cabo un recuento celular en una cámara hemocitométrica de Neubauer, estimando con los resultados obtenidos la viabilidad celular tras la congelación.

Mantenimiento: el cultivo masivo en monocapa se llevó a cabo en frascos de 75 cm² (Nunc, USA) y el medio adecuado según la línea celular, que se mantenían en estufa de cultivo (Jouan IG 650, España) a 37°C, en atmósfera con 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa.

Para optimizar el tiempo y la puesta en práctica de los ensayos de este trabajo tratábamos de mantener sin interrupción la fase exponencial de crecimiento. Por ello los subcultivos, o pases, se realizaban antes de que la monocapa de células en proliferación ocupase toda la superficie del fondo del frasco de cultivo, ya que el contacto de unas células con otras, entre otros

estímulos, provoca la entrada en la fase G0 o de quiescencia en que las células dejan de dividirse. Subcultivamos cada 2-3 días siguiendo siempre el siguiente procedimiento:

Añadimos al cultivo 2'5 ml de tripsina durante tres minutos e incubamos en estufa a 37°C para conseguir la completa pérdida de adherencia de las células a la base del frasco. Inmediatamente adicionamos al frasco 3 ml de medio de cultivo con suero bovino fetal con el objeto de inactivar la acción de la tripsina evitando posibles daños celulares que afectasen a la supervivencia. Recogimos el volumen total y centrifugamos a 200 g durante 10 minutos (Heraeus mod. Multifuge 1L-R, España). Decantamos el sobrenadante y resuspendimos con 3 ml de medio de cultivo el sedimento obtenido. A continuación obtuvimos la densidad de células vivas por mililitro mediante recuento celular. Para ello empleamos una cámara hemocitométrica a la que aplicamos una muestra del resuspendido previamente obtenido y teñido con el colorante vital azul tripán.

Esta técnica de uso habitual se basa en la compleja estructura del colorante, que le impide atravesar la membrana plasmática intacta de células viables. Por el contrario la desestructuración frecuente de la membrana plasmática en las células inviables o muertas permite la entrada y tinción del citoplasma de un color azul brillante fácilmente reconocible al microscopio. Una vez conocida la densidad de células viables calculamos la cantidad de inóculo necesario para la propagación del cultivo.

Comprobamos regularmente la ausencia de *Mycoplasma spp.* en todas las líneas celulares utilizadas mediante la tinción de fluorescencia directa del ADN con la tinción Hoechst 33258.

b) Análisis cromatográfico, distribución de compuestos activos y cuantificación de los extractos vegetales polifenólicos.

- Extractos cítricos:

En los casos de los extractos de pomelo (EP), de piel de limón (EPL), naringenina potásica (NK), apigenina potásica (A) disolvimos cada extracto empleando DMSO como disolvente:

-EP y Naringenina potásica (NK): 3 mg/ml

-EPL: 4mg/ml

-Apigenina potásica: 3mg/ml

La disolución obtenida se filtró a través de un filtro de 0,45 µm. Se empleó un cromatógrafo de líquidos Hewlett-Packard serie 1200 equipado con un detector UV asociado con un *array* de diodos. Como fase estacionaria empleamos una columna de C18 LiChrospher 100 (250 x 4 mm) con 5 µm de tamaño de partícula. El flujo fue de 1 ml/min. Los cambios de absorbancia se registraron a una longitud de onda de 280 nm. Las condiciones cromatográficas de elusión fueron las siguientes:

Fase móvil: A: Acido acético 2.5%

B: Acetonitrilo/Acido acético 2.5% (5/1)

T (min)	%A	%B
0	93	7
20	60	30
40	40	60
50	0	100
60	93	7

- **Extracto de cacao (EC):** Disolvimos 4 mg/ml de extracto en metanol. La disolución obtenida se filtró a través de un filtro de 0,45 µm. Se empleó un cromatógrafo de líquidos Hewlett-Packard serie 1200 equipado con un detector UV asociado con un *array* de diodos. Como fase estacionaria empleamos una columna de C18 LiChrospher 100 (250 x 4 mm) con 5 µm de tamaño de partícula. El flujo fue de 1 ml/min. Los cambios de absorbancia se registraron a una longitud de onda de 280 nm. Las condiciones cromatográficas de elusión fueron las siguientes:

Fase móvil: A) Ac. Acético 1%
B) Acetonitrilo

T (MIN)	% A	% B
0	96	4
25	90	10
30	87	13
33	85	15
35	50	50
40	96	4
45	96	4

- **Extracto de semilla de uva (ESU):** Disolvimos 3 mg/ml de extracto en metanol. La disolución obtenida se filtró a través de un filtro de 0,45 µm. Se empleó un cromatógrafo de líquidos Hewlett-Packard serie 1100 equipado con un detector UV asociado con un *array* de diodos. Como fase estacionaria empleamos una columna de C18 LiChrospher 100 (250 x 4 mm) con 5 µm de tamaño de partícula (Merck, Alemania). El flujo fue de 1 ml/min. Los cambios de absorbancia se registraron a una longitud de onda de 280 nm. Las condiciones cromatográficas de elusión fueron las siguientes:

Fase móvil: A: Agua

B: Ácido acético / Agua (1/9)

C: Metanol / Acetonitrilo (1/1)

T (min)	%A	%B	%C
0	90	10	0
45	70	30	0
60	22	78	0
70	0	100	0
75	0	0	100

c) Solubilización.

En todos los casos procedimos a preparar disoluciones de *stock* a la concentración más adecuada que permitiese la total disolución de los productos, lo cual se comprobaba apreciando la ausencia de sedimento o partículas en suspensión. Todos resultaron ser relativamente bien solubles en el disolvente, que en nuestro caso fue medio de cultivo DMEM con todos los suplementos antes expuestos salvo el indicador de pH rojo fenol. De este modo fijamos una concentración de *stock* para los flavonoides mayoritarios en cada extracto de entre 0'5mM y 2mM. En todos los casos realizamos esterilización física de cada una de las disoluciones resultantes mediante el empleo de filtros con tamaño de poro 0'22 μm (Millipore Co, USA). Posteriormente alicuotamos en tubos Eppendorf y los almacenamos a una temperatura de -4°C hasta su empleo en los ensayos.

d) Control de osmolalidad.

Cualquier sustancia que forme parte del medio de cultivo es susceptible de modificar el potencial osmótico modificando la viabilidad, proliferación e incluso la supervivencia de las células en cultivo. Comprobamos que las concentraciones seleccionadas con las que realizamos los ensayos no alteraban significativamente la osmolaridad del medio de cultivo. Para ello preparamos alícuotas de cada uno de los extractos a 50 μM . Se empleó un osmómetro de vapor de vacío (Wescor, Vapro 5520, USA). Todos los valores obtenidos se comparaban con el valor de una alícuota control de DMEM suplementado y sin rojo fenol. En ningún caso encontramos variación significativa.

e) Cuantificación de la viabilidad y proliferación.

Para evaluar el efecto de los extractos sobre la viabilidad y proliferación de células Vero aplicamos el test de formación de cristales de formazano tras la aplicación de bromuro de 3-(4-5 dimetiltriazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolio (MTT). Utilizamos placas de 96 pocillos de fondo plano (Nunc, USA) con capacidad máxima de 300 μ L por pocillo. Sembramos 1600 células por pocillo para asegurar un crecimiento exponencial durante todo el ensayo. Pasadas 24 horas tras la siembra para permitir la adhesión de las células al fondo de los pocillos, procedimos a aplicar los distintos tratamientos con los extractos. Por cada placa dispusimos 6 réplicas de cada concentración de extracto además de 12 réplicas control sin tratamiento y pocillos-blancos que contenían únicamente tratamientos sin células.

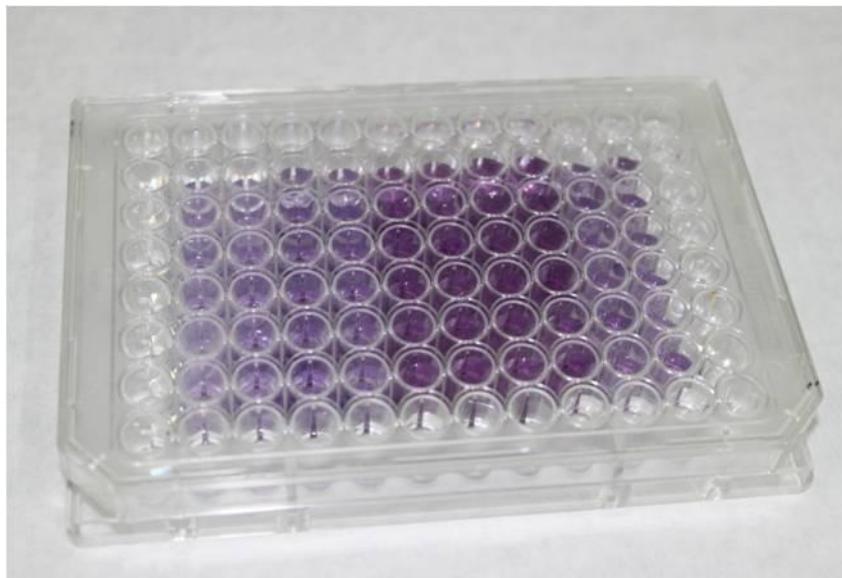


Figura 13: Placa de 96 pocillos de fondo plano.

Las concentraciones utilizadas fueron 1, 5, 10, 25 y 50 μ M. Realizamos el ensayo a tres tiempos: 24, 48 y 72 horas desde la aplicación de cada extracto.

Mantuvimos todas las placas a una temperatura de 37°C, 90% humedad relativa y un 7'5% CO₂ en estufa de incubación (Jouan, IG650).

Pasado el tiempo correspondiente eliminamos el medio y agregamos a cada pocillo 50 µl de una disolución de MTT a 5 mg/ml más 200 µl de DMEM sin suplementos, de modo que la concentración final de MTT fuese 1 mg/ml. Dejamos incubar durante 4 horas en oscuridad a 37°C. Vaciamos los pocillos dejando sólo las células, adheridas al fondo de los pocillos y procedimos a disolver el formazano sintetizado en el interior celular mediante la adición de 100 µl de DMSO a cada pocillo. Tras una agitación de 10 minutos a 80 rpm procedimos a la lectura de absorbancia en espectrofotómetro (Labsystems, Multiskan MCC340, Finlandia) a longitudes de onda 570 nm y 690 nm.

f) Análisis del ciclo celular por citometría de flujo (Caco 2).

El modo en que se distribuyen las células de un cultivo, en diferentes poblaciones en función de su contenido de ADN, permite determinar las fases del ciclo celular en que se encuentran. El ciclo celular es un proceso extremadamente complejo en el que intervienen rutas de señalización extra- e intra-celulares, complejos enzimáticos reguladores, genes reguladores, etc. Tal complejidad requiere un alto control de todos los procesos que se llevan a cabo para evitar cualquier tipo de error que sería fatal para la supervivencia de la célula. Existen unos *checkpoint* en distintos puntos concretos del ciclo en los que se verifica si el proceso está funcionando correctamente. En caso contrario, un determinado punto de control será el límite hasta donde llegue la célula en su proceso de división y gracias a ello puede determinarse sobre qué fase del ciclo celular interfiere, por ejemplo, una sustancia en estudio.

Las células, en función de la fase del ciclo en la que se halle, varían en su contenido de ADN:

- Fase G0-G1: dotación cromosómica normal (2n)
- Fase G2-M: dotación cromosómica doble (4n)
- Fase S (síntesis pre-mitótica de ADN): dotación cromosómica intermedia respecto de las dos anteriores citadas.

El análisis del contenido de ADN celular se realizó del siguiente modo: pasado el tiempo de tratamiento de la muestra tripsinizamos el cultivo y obtuvimos un resuspendido de células a una concentración de $0.5 - 1 \times 10^6$ por ml en PBS. Para fijar las células agregamos 2 ml de Etanol-PBS (70:30) en frío a 200 μ l de muestra y mantuvimos 30 minutos a 4°C. Centrifugamos a 1000 rpm durante 10 minutos, eliminamos el sobrenadante y resuspendimos el pellet en 800 μ l de PBS. Procedimos a la tinción agregando 100 μ l de ribonucleasa (1 mg/ml) y 100 μ l yoduro de propicio (400 μ g/ml) e incubamos durante 30 minutos a 37°C.

Analizamos con el citómetro y su software asociado (CELLQUEST) los datos de FSC (*forward scatter*), SSC (*side scatter*) y PLA-2 (intensidad de fluorescencia del yoduro de propicio) de una muestra de 20.000 células en G1-R1 Para obtener la cuantificación detallada de cada población empleamos el software de análisis ModFitLT V2.0.

g) Análisis de apoptosis por citometría de flujo (Caco 2).

La fosfatidil serina se encuentra de modo normal en la superficie interna de la membrana plasmática de las células. Por otro lado, la anexina V es una proteína normal del organismo que participa en importantes vías de señalización celular, endocitosis y tráfico intracelular al interaccionar con alta afinidad con la fosfatidil serina de la membrana plasmática, actuando como inhibidor competitivo de otras proteínas señalizadoras que tienen como diana la fosfatidil serina.

La técnica empleada en este trabajo se basa en una característica común a todas las células que se hallan en apoptosis: la translocación de la fosfatidil serina desde su localización normal en la superficie citoplasmática hacia la superficie externa de la membrana celular, quedando expuesta al medio externo. La anexina V incluida en el kit de detección de apoptosis está conjugada con un fluoróforo, Alexa Fluor[®] 488, que emite luz verde al someterlo al láser argón a 488 nm del citómetro de flujo. Como resultado la anexina V- Alexa Fluor[®] 488 (AV) emite fluorescencia verde asociada a células en apoptosis. El test se complementa con yoduro de propidio (IP), que se une al ADN de células necróticas cuya membrana plasmática se encuentra completamente desestructurada. El efecto de esta tinción fluorescente combinada permite distinguir poblaciones de células en apoptosis temprana (AV⁺⁺⁺ - PI⁻), en apoptosis tardía (AV⁺⁺⁺ - PI⁺⁺⁺), en necrosis (AV⁺ - PI⁺⁺⁺) y viables (AV⁺ - PI⁻).

El análisis de apoptosis por citometría de flujo se realizó mediante el kit de detección de apoptosis Alexa Fluor[®] 488 AnnexinV, con anexina V y yoduro de propidio (catalog n^o: V13241; Invitrogen, USA) siguiendo el protocolo facilitado por el fabricante.

Para la determinación del porcentaje de células apoptóticas se analizaron las células según la presencia e intensidad de fluorescencia de AV e IP, y se distribuyeron en diferentes cuadrantes de un diagrama que relaciona frecuencia de conteo con intensidad de fluorescencia de cada fluorocromo.

h) Método estadístico.

Se realizó una estadística descriptiva de cada una de las variables obteniendo los parámetros característicos: media, desviación típica, máximo y mínimo.

La comparación de grupos se ha realizado mediante un análisis de la varianza ANOVA de una y de varias vías.

Además complementamos los análisis con contrastes de igualdad de pares de medias mediante la mínima diferencia significativa (DMS) con la corrección de Bonferroni.

Realizamos la relación entre variables cuantitativas mediante un análisis de regresión y correlación lineales.

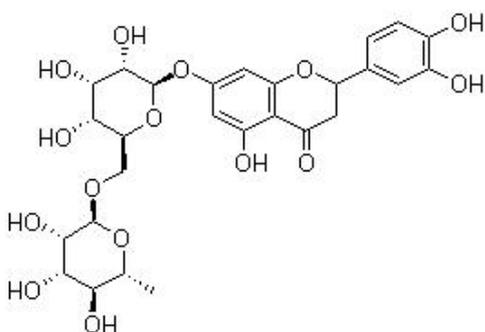
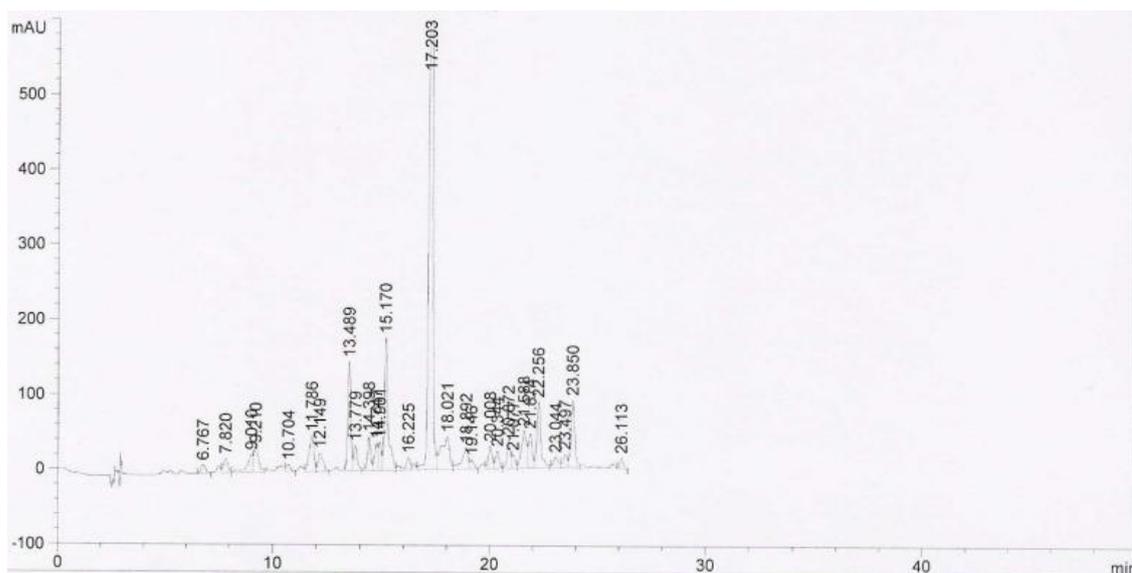
Consideramos significativos los valores de p inferiores o iguales a 0,05.

IV. RESULTADOS

a) Resultados del análisis cromatográfico:

A continuación se muestran los patrones cromatográficos de cada uno de los agentes del estudio expresados en forma gráfica, así como los valores porcentuales de los componentes mayoritarios.

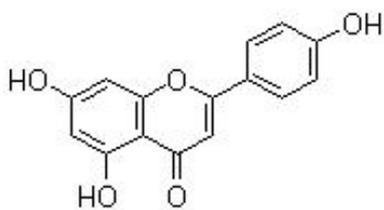
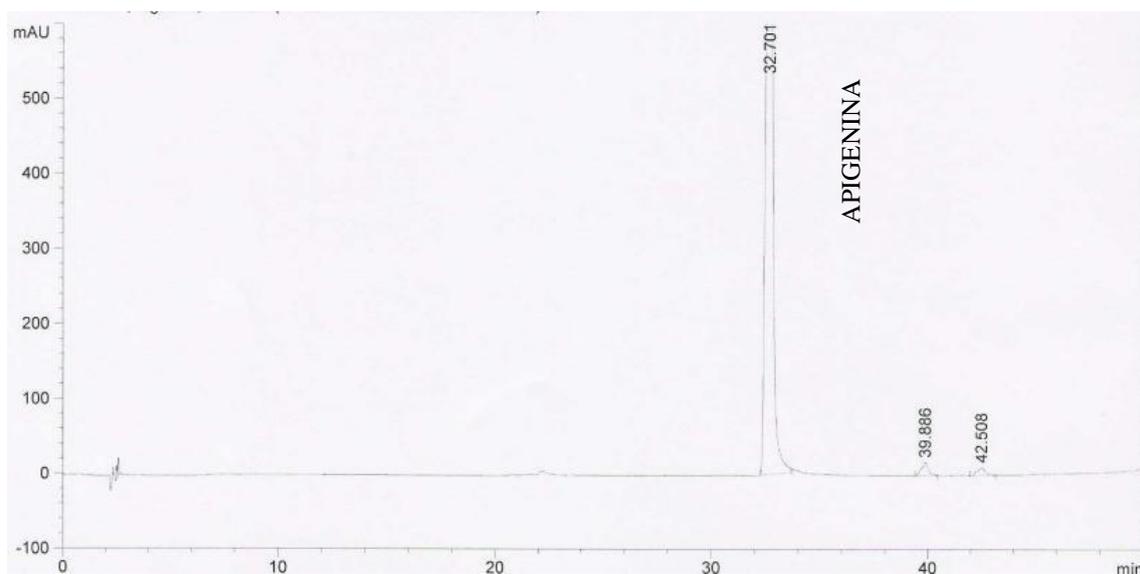
1. Extracto de piel de limón (EPL)



Fórmula estructural de eriocitrina

Eriocitina	25,27%
Otros flavonoides	5-7 %
Otros polifenoles	3-4 %
Agua	5 %
Fibra vegetal	58,73
(soluble e insoluble)	

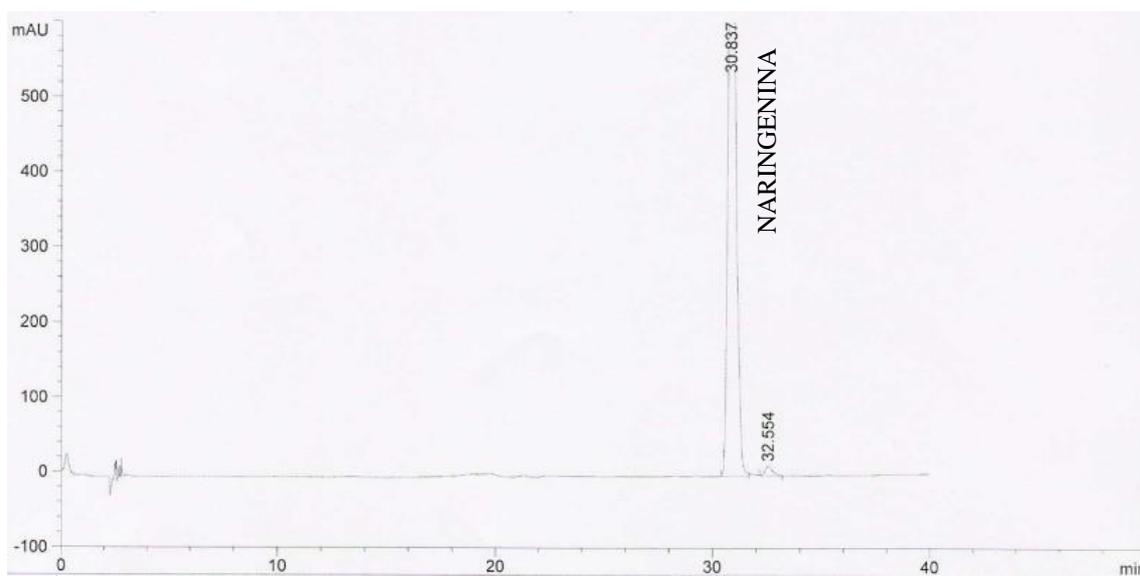
2. Apigenina potásica



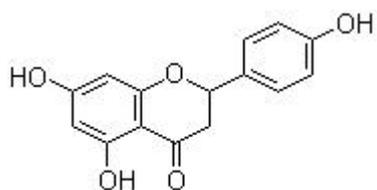
Apigenina potásica 90%

Fórmula estructural de la Apigenina

3. Naringenina potásica

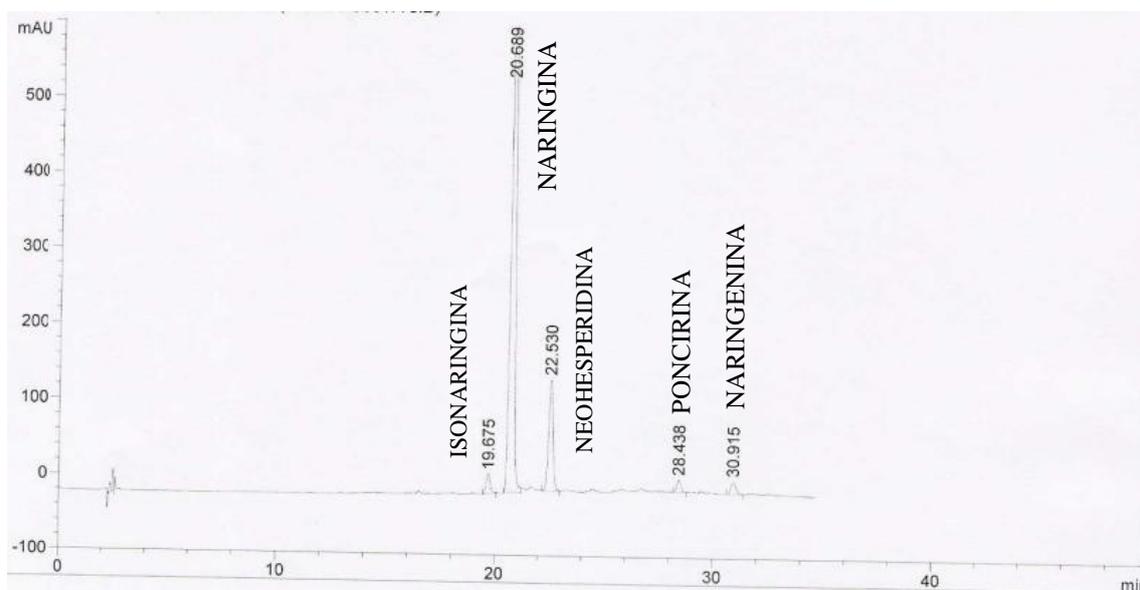


Naringenina 92 %

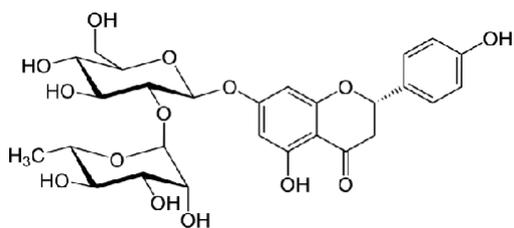


Fórmula estructural de naringenina

4. Extracto de Pomelo (EP)

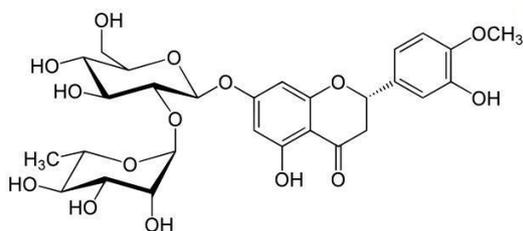


a)



Naringina	53,21 %
Neohesperidina	10,86 %
Isonaringina	1,57 %
Poncirina	0,68 %
Naringenina	0,33 %
Otros flavonoides	2,61 %
Total flavonoides	69,26 %
Agua	5 %
Fibra vegetal (soluble e insoluble)	25,74 %

b)

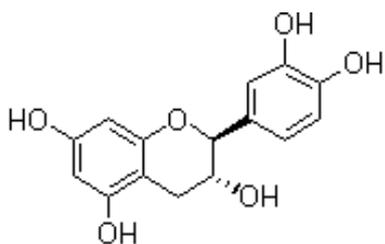
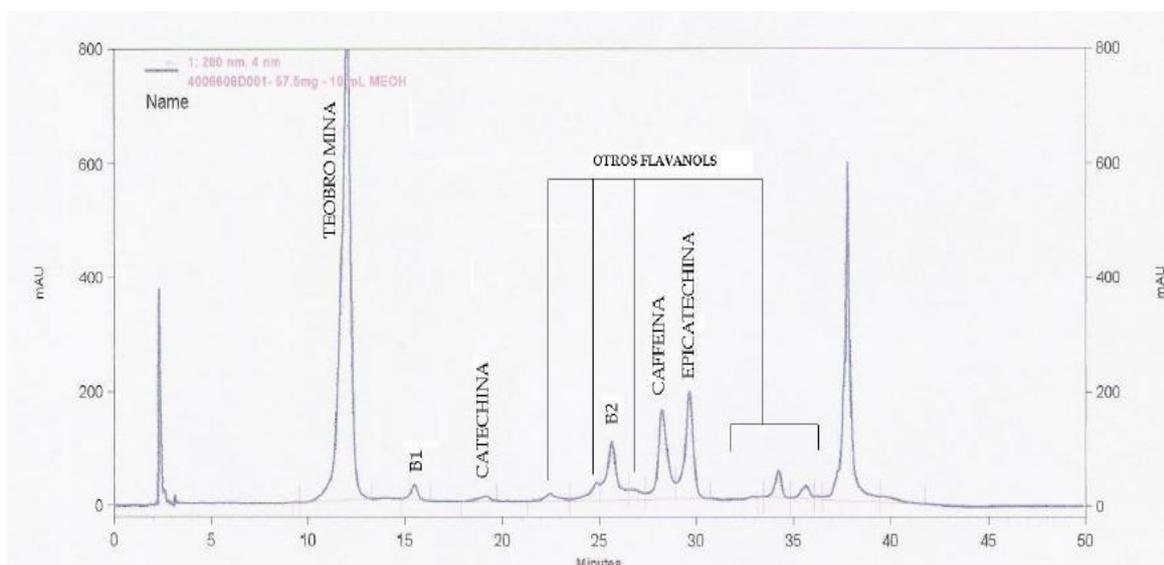


Fórmulas estructurales:

a) *Naringina;*

b) *Neohesperidina*

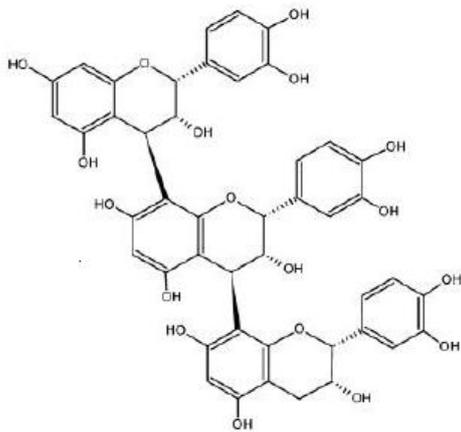
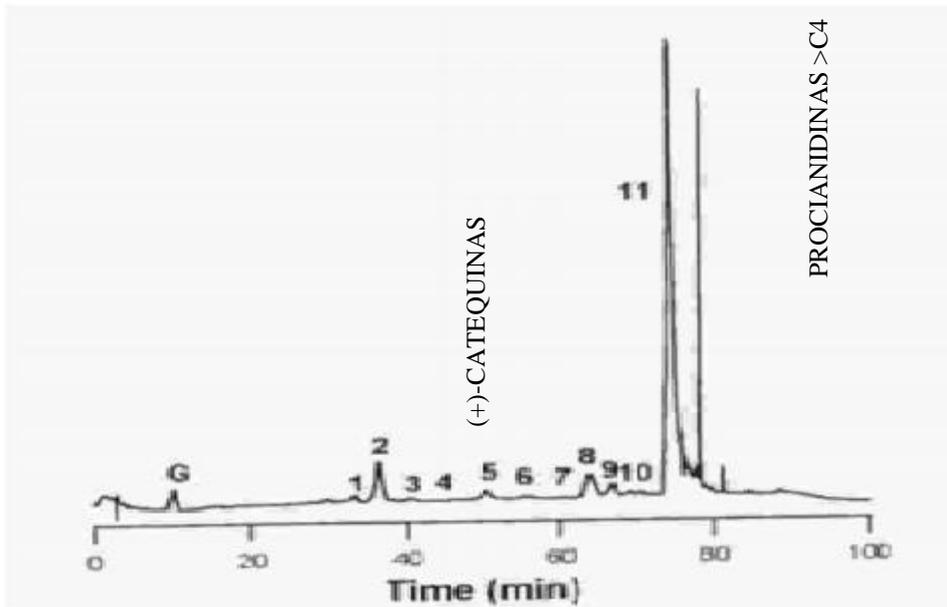
5. Extracto de cacao (EC).



Fórmula estructural de epicatequina

Teobromina	10,03%
Flavonoles	29,59%
Flavan-3-oles	
Epicatequina	10,96%
Catequina	1,04%
Dímero B2	7,10%
Dímero B1	0,96%
TOTAL	20,06%

6. Extracto de semilla de uva (ESU)



*Fórmula estructural
general de trímero de flavanoles.*

Polímeros procianidinas >C ₄	90,9 %
(+)-catequinas	2,11 %
Flavanoles (dímeros y trímeros)	1,40 %
(-)-epicatequinas	1,06 %
B4 (dímero)	0,96 %
Ácido gálico	0,83 %
B3 (dímero)	0,71 %
B1-3-O-galato	0,52 %
B1 (dímero)	0,52 %
B2 (dímero)	0,48 %
C1 (trímero)	0,2 %
B-2-3'-O-galato	0,16 %
T2 (trímero)	0,11 %

b) Test de proliferación-citotoxicidad sobre la línea celular Vero de cada uno de los compuestos y extractos objeto de estudio.

Los ensayos se realizaron por duplicado durante tres periodos de tiempo (24, 48 y 72 horas) siendo, los resultados gráficos presentados a continuación, la media ponderada de ambos ensayos.

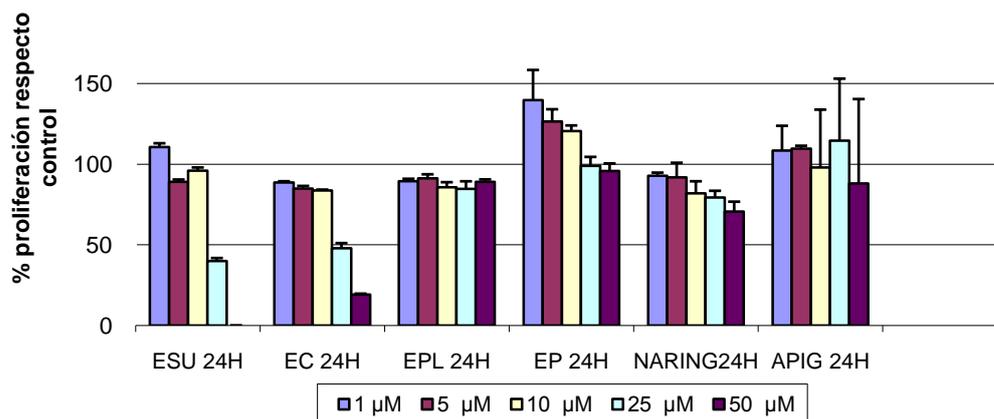


Gráfico 1. Efecto sobre la proliferación in vitro de células Vero de los extractos de polifenoles a distintas concentraciones tras un periodo de 24 horas de tratamiento con las concentraciones indicadas.

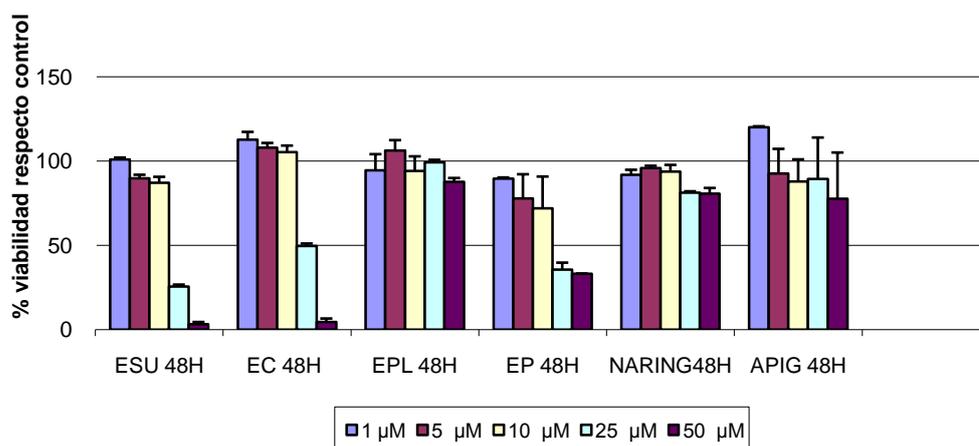


Gráfico 2. Efecto sobre la proliferación in vitro de células Vero de los extractos de polifenoles a distintas concentraciones tras un periodo de 48 horas de tratamiento con las concentraciones indicadas.

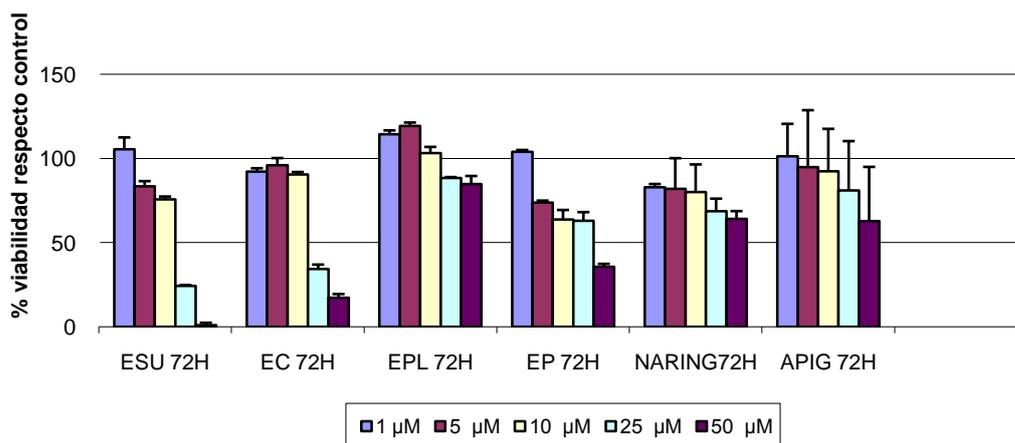


Gráfico 3. Efecto sobre la proliferación in vitro de células Vero de los extractos de polifenoles a distintas concentraciones tras un periodo de 72 horas de tratamiento con las concentraciones indicadas.

Los resultados obtenidos muestran un discreto efecto sobre la proliferación celular, en la mayoría de los extractos, a concentraciones inferiores de 10 µM, a las cuales el porcentaje de proliferación respecto del control sin tratamiento es superior al 63 % en todos los casos del experimento.

En el caso de ESU y EC, extractos ricos en catequinas (flavan-3-ol), encontramos evidencias de un efecto dosis-respuesta en todos los tiempos ensayados, remarcándose el efecto antiproliferativo a concentraciones mayores de 25 µM ($p=0,005$).

También observamos este efecto dosis-respuesta en algunos extractos y compuestos de origen cítrico, eso sí, mostrando una mayor heterogeneidad en su capacidad de influir sobre la proliferación celular, tanto en la intensidad del efecto dosis-respuesta como en la influencia de las distintas duraciones de los tratamientos.

La apigenina, en los tratamientos de 48 y 72 horas, mostraba un efecto dosis-respuesta moderado ya que, a la máxima concentración ensayada, solo inhibiría la proliferación celular en un 38 % respecto del control.

La naringenina presentaba un efecto dosis-respuesta aún menos marcado, mostrando una capacidad de inhibición de la proliferación poco significativa ($p=122$).

Los resultados para el EPL reflejaron una muy baja inhibición de la proliferación celular a todas las concentraciones del experimento de modo que las diferencias fueron poco significativas ($p=0,5$).

Finalmente, el extracto de pomelo (EP) mostraba, en general, un efecto pronunciado de inhibición del crecimiento celular a concentraciones crecientes y un reducido efecto a concentraciones bajas, tal vez con la excepción de la no justificada reducción en el caso de 72 h.

Así, podría establecerse como **orden de actividad antiproliferativa** de las estructuras flavonoides estudiadas: **flavan-3-ol > flavanona > flavona**. Dentro del grupo de las estructuras flavan-3-ol estudiadas, el orden sería el siguiente: polímeros (> C4 unidades de catequina) > monómeros + polímeros (< 4 unidades de catequina). En el caso de las estructuras flavanona-glicosiladas, el orden de actividad antiproliferativa sería: glicosilación tipo neohesperidósido > glicosilación tipo rutinósido.

La mayor linealidad estructural de las moléculas de flavonoides que componen los extractos del estudio parece correlacionarse con una mayor proliferación de la línea celular Vero in vitro. Por ello, de forma específica, podría establecerse como orden de actividad antiproliferativa de las estructuras aglicón estudiadas, el siguiente: flavanona > flavona.

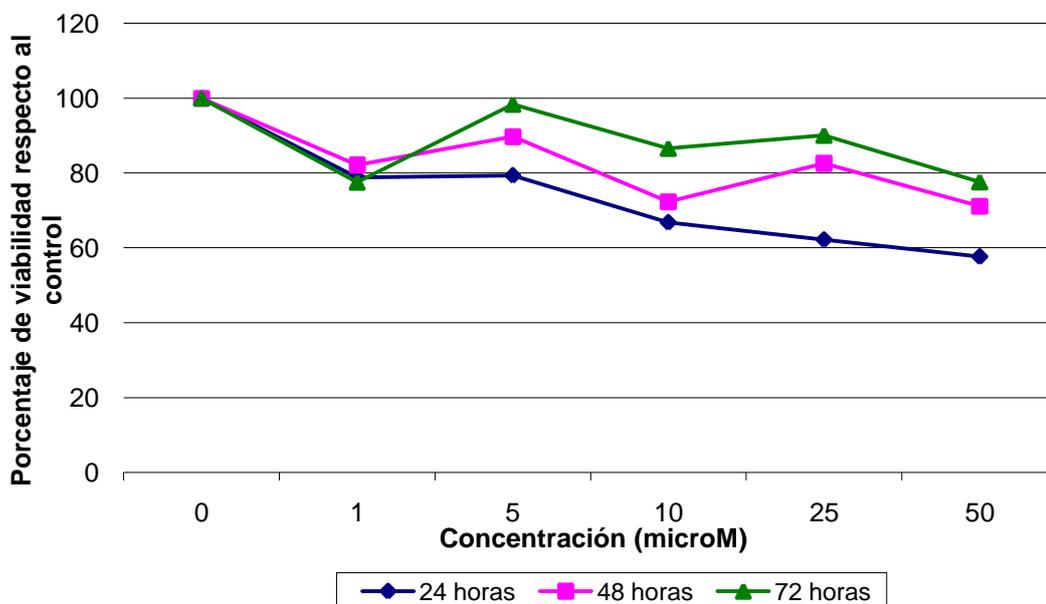
c) Test de proliferación-citotoxicidad sobre la línea celular CaCo-2.

A continuación, se muestran los resultados tabulados y expresados en gráficas, obtenidos en los ensayos de citotoxicidad:

Apigenina:

Concentración (µM)		0	1	5	10	25	50
	Media	1,02	0,80	0,81	0,68	0,63	0,58
24 h.	Desv. est.	0,13	0,10	0,14	0,10	0,05	0,14
	% respecto control	100	78,84*	79,28*	66,78*	62,20*	57,65*
	Media	1,32	1,09	1,19	0,96	1,09	0,94
48 h.	Desv. est.	0,25	0,28	0,15	0,42	0,17	0,22
	% respecto control	100	82,11*	89,75	72,36*	82,53*	71,14*
	Media	1,08	0,84	1,06	0,94	0,97	0,84
72 h.	Desv. est.	0,11	0,24	0,14	0,26	0,19	0,49
	% respecto control	100	77,52*	98,32	86,58	90,08	77,62

Tabla 2: Efecto de la Apigenina sobre la viabilidad de células CaCo-2 tras un periodo de 24, 48 y 72 horas de tratamiento con las concentraciones indicadas.

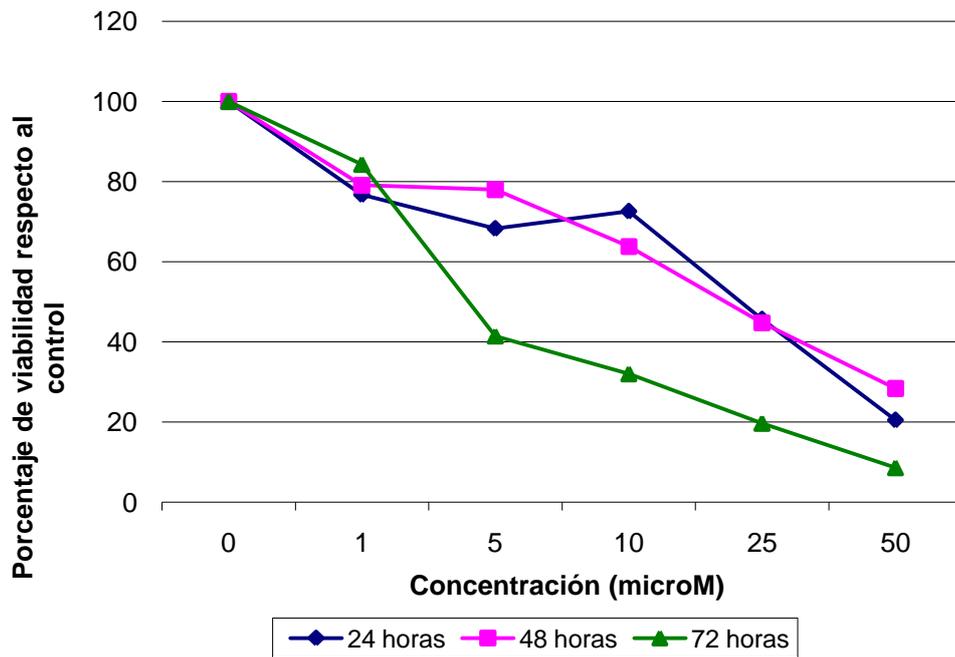


Observamos un efecto dosis-respuesta ($p < 0,05$) a las 24 y 48 horas, excepto a 5 µM en las 48 horas. La mayor inhibición de la proliferación se observó a las 24 horas, y fue decreciendo progresivamente en las 48 y 72 horas.

Apigenina potásica:

Concentración (µM)		0	1	5	10	25	50
	Media	0,096	0,073	0,065	0,069	0,043	0,019
24 horas	Desv. est.	0,013	0,006	0,021	0,018	0,024	0,008
	% respecto control	100	76,710*	68,297*	72,582*	45,676*	20,487*
	Media	0,127	0,100	0,099	0,081	0,056	0,036
48 horas	Desv. est.	0,022	0,0181	0,023	0,011	0,016	0,007
	% respecto control	100	79,142*	78,013*	63,872*	44,824*	28,361*
	Media	0,264	0,222	0,109	0,084	0,052	0,022
72 horas	Desv. est.	0,033	0,066	0,042	0,011	0,015	0,007
	% respecto control	100	84,303*	41,480*	32,062*	19,712*	8,611*

Tabla 3: Efecto de la Apigenina potásica sobre la viabilidad de células CaCo-2 tras un periodo de 24, 48 y 72 horas de tratamiento con las concentraciones indicadas.

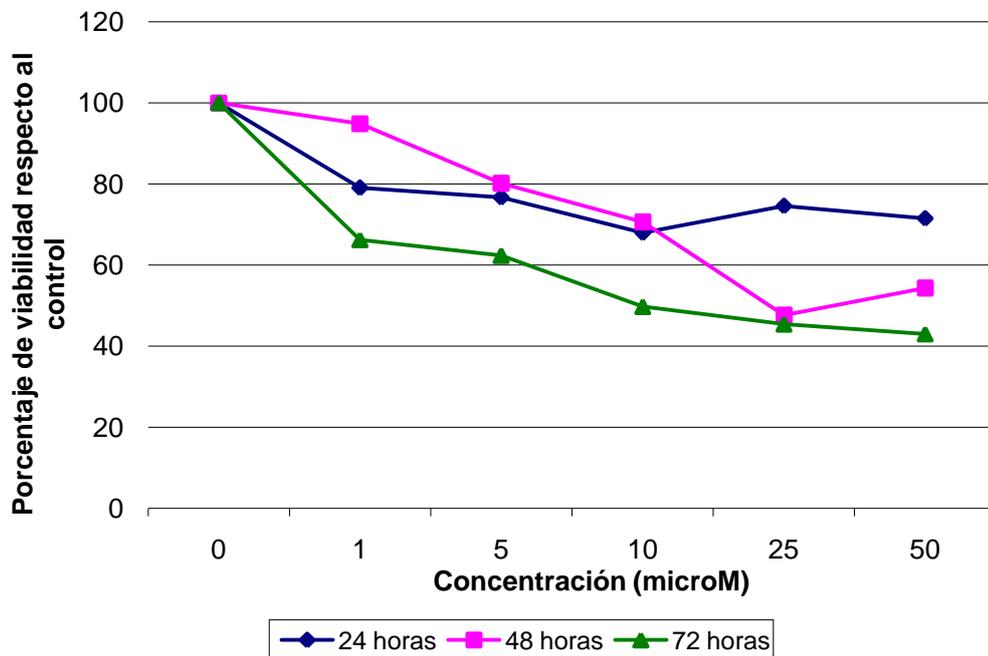


En el caso de la apigenina potásica, observamos un marcado efecto dosis-respuesta, muy acusado a partir de la concentración 10 µM. Con la máxima concentración (50 µM) se produjo una inhibición de la proliferación muy relevante, bajando incluso por debajo del 10% a las 72 horas ($p < 0,001$).

Extracto de Cacao:

Concentración (μM)		0	1	5	10	25	50
	Media	0,615	0,486	0,472	0,418	0,459	0,440
24 horas	Desv. est.	0,054	0,030	0,060	0,076	0,094	0,233
	% respecto control	100	78,991*	76,671*	67,923*	74,557	71,504
	Media	0,851	0,808	0,682	0,601	0,405	0,462
48 horas	Desv. est.	0,069	0,114	0,091	0,043	0,049	0,047
	% respecto control	100	94,883	80,114	70,609*	47,612*	54,286*
	Media	0,875	0,579	0,545	0,435	0,397	0,376
72 horas	Desv. est.	0,114	0,171	0,026	0,056	0,055	0,053
	% respecto control	100	66,217*	62,318*	49,748*	45,369*	42,993*

Tabla 4: Efecto del EC sobre la viabilidad de células CaCo-2 tras un periodo de 24, 48 y 72 horas de tratamiento con las concentraciones indicadas.

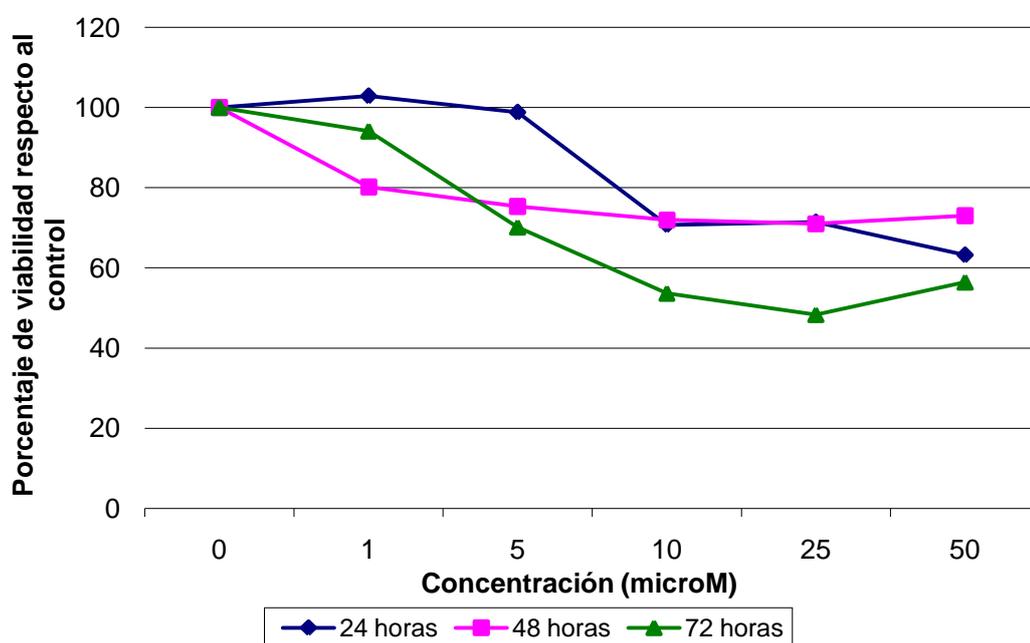


Observamos efecto dosis-respuesta a las concentraciones más altas (10, 25 y 50 μM) ($p < 0,05$). La máxima inhibición se produjo con la dosis 50 μM a las 72 horas.

Eriocitrina:

Concentración (μM)		0	1	5	10	25	50
	Media	0,508	0,523	0,502	0,359	0,363	0,321
24 horas	Desv. est.	0,092	0,0585	0,070	0,092	0,073	0,063
	% respecto control	100	102,9	98,81	70,75	71,44	63,2
	Media	0,757	0,607	0,570	0,545	0,538	0,553
48 horas	Desv. est.	0,211	0,138	0,057	0,139	0,080	0,145
	% respecto control	100	80,17	75,3	72,03	71,08	73,04
	Media	1,492	1,404	1,047	0,800	0,721	0,842
72 horas	Desv. est.	0,410	0,278	0,264	0,116	0,140	0,348
	% respecto control	100	94,13	70,2	53,66*	48,37*	56,47*

Tabla 5: Efecto de Eriocitrina sobre la viabilidad de células CaCo-2 tras un periodo de 24, 48 y 72 horas de tratamiento con las concentraciones indicadas.

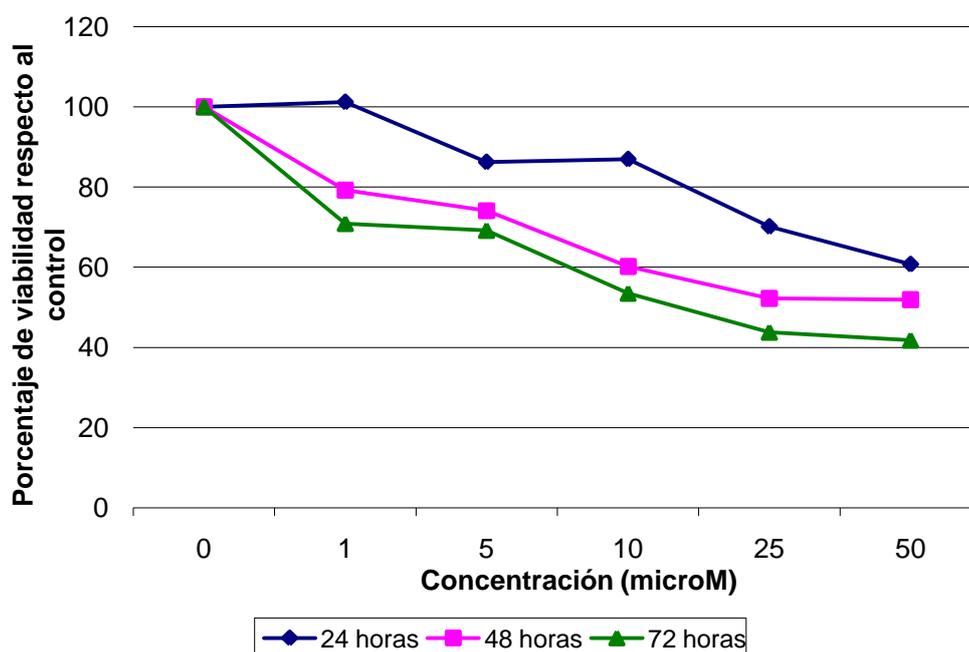


La eriocitrina no mostró efecto antiproliferativo a ninguna concentración en los ensayos a 24 y 48 horas. Fue a las 72 horas donde observamos una inhibición de la proliferación del cultivo a las concentraciones 10, 25 y 50 μM , aunque no bajaba de alrededor del 50%.

Extracto de pomelo:

Concentración (μM)		0	1	5	10	25	50
	Media	0,155	0,157	0,134	0,135	0,109	0,094
24 horas	Desv. est.	0,022	0,044	0,019	0,031	0,018	0,027
	% respecto control	100	101,204	86,231	86,916	70,134*	60,716*
	Media	0,193	0,153	0,143	0,116	0,101	0,100
48 horas	Desv. est.	0,055	0,046	0,065	0,038	0,041	0,040
	% respecto control	100	79,228*	74,147*	60,146*	52,194*	51,884*
	Media	0,366	0,259	0,253	0,195	0,160	0,153
72 horas	Desv. est.	0,063	0,066	0,070	0,083	0,049	0,072
	% respecto control	100	70,875*	69,181*	53,492*	43,735*	41,795*

Tabla 6: Efecto del EP sobre la viabilidad de células CaCo-2 tras un periodo de 24, 48 y 72 horas de tratamiento con las concentraciones indicadas.

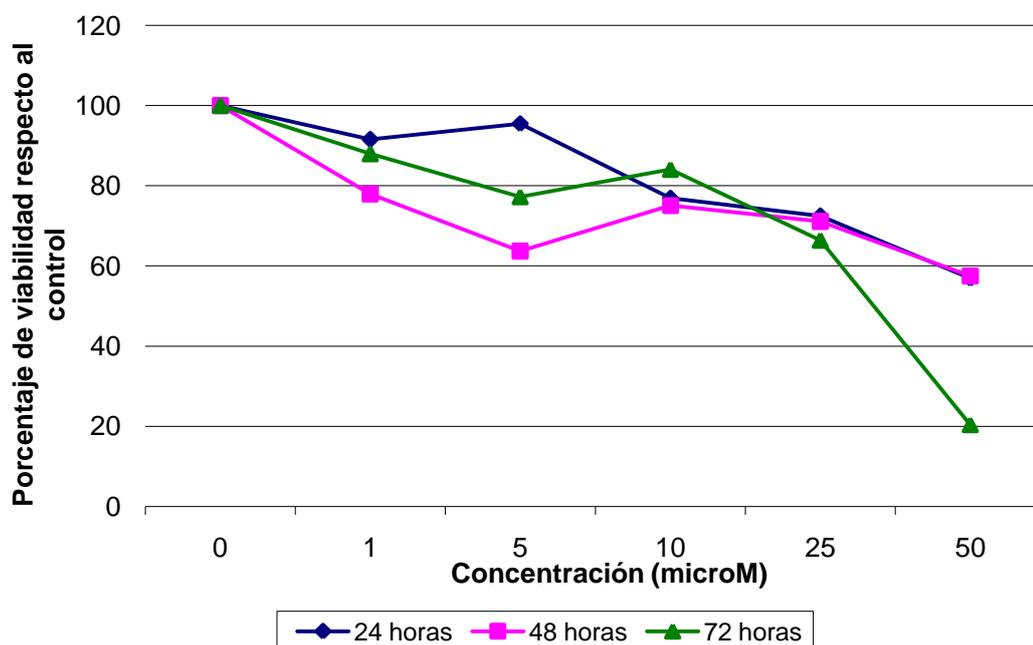


El extracto de pomelo mostró actividad antiproliferativa significativa en las concentraciones 25 y 50 μM a las 24 horas y en todas las concentraciones a las 48 y 72 horas.

Extracto de Semilla de Uva:

Concentración (μM)		0	1	5	10	25	50
	Media	0,490	0,448	0,468	0,377	0,355	0,279
24 horas	Desv. est.	0,075	0,032	0,027	0,045	0,062	0,038
	% respecto control	100	91,58	95,52	76,95*	72,46*	56,92*
	Media	0,578	0,451	0,368	0,434	0,411	0,332
48 horas	Desv. est.	0,103	0,109	0,098	0,053	0,102	0,167
	% respecto control	100	77,95*	63,69*	75,11	71,07	57,5*
	Media	0,805	0,708	0,622	0,677	0,534	0,164
72 horas	Desv. est.	0,138	0,144	0,141	0,097	0,111	0,213
	% respecto control	100	87,97	77,27*	84,1	66,37*	20,4*

Tabla 7: Efecto del ESU sobre la viabilidad de células CaCo-2 tras un periodo de 24, 48 y 72 horas de tratamiento con las concentraciones indicadas.



El ESU mostró resultados variables, destacando la acusada inhibición de la proliferación de la concentración 50 μM a las 72 horas.

A continuación, se muestran unas tablas resumen de resultados del estudio de citotoxicidad/proliferación en CaCo-2 en los diferentes tiempos:

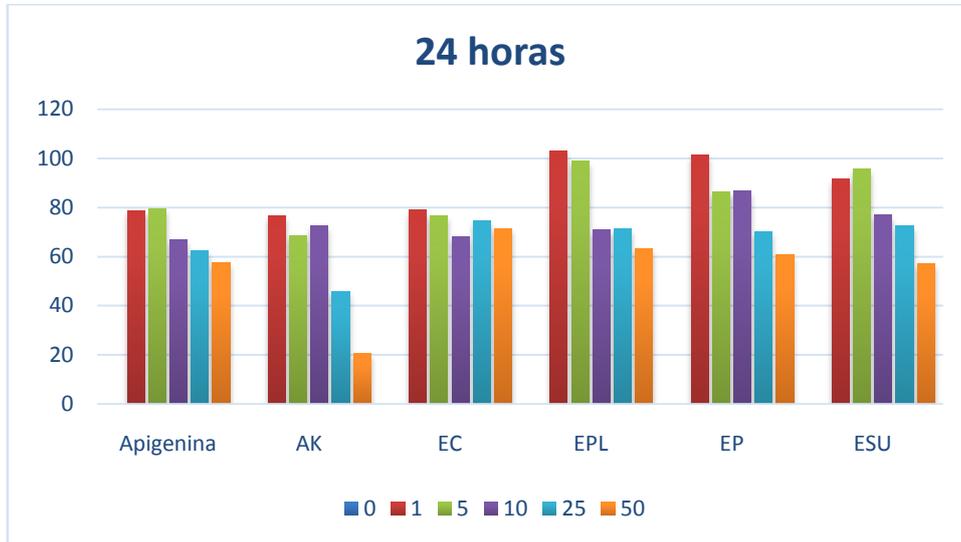


Gráfico 4: Resumen proliferación de células CaCo-2 a las 24 horas.

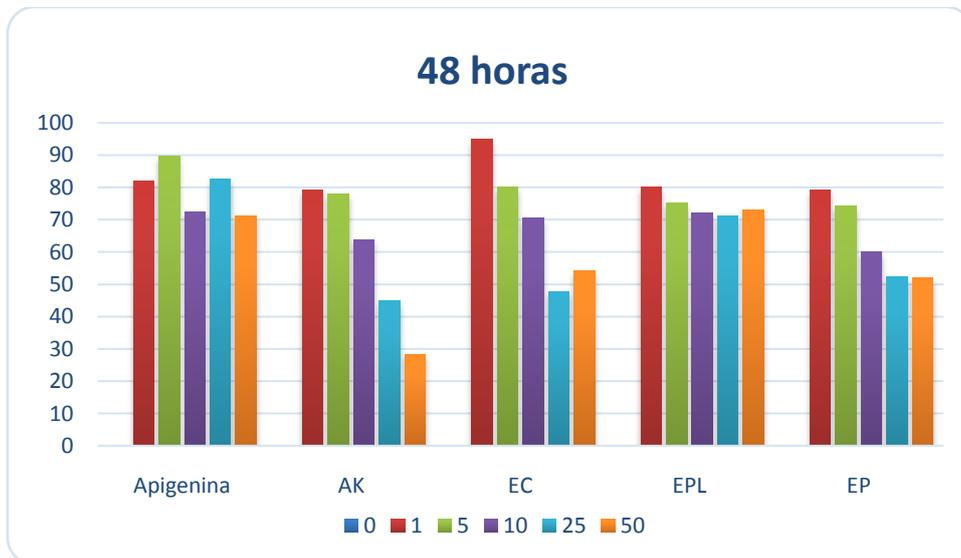


Gráfico 5: Resumen proliferación de células CaCo-2 a las 48 horas.

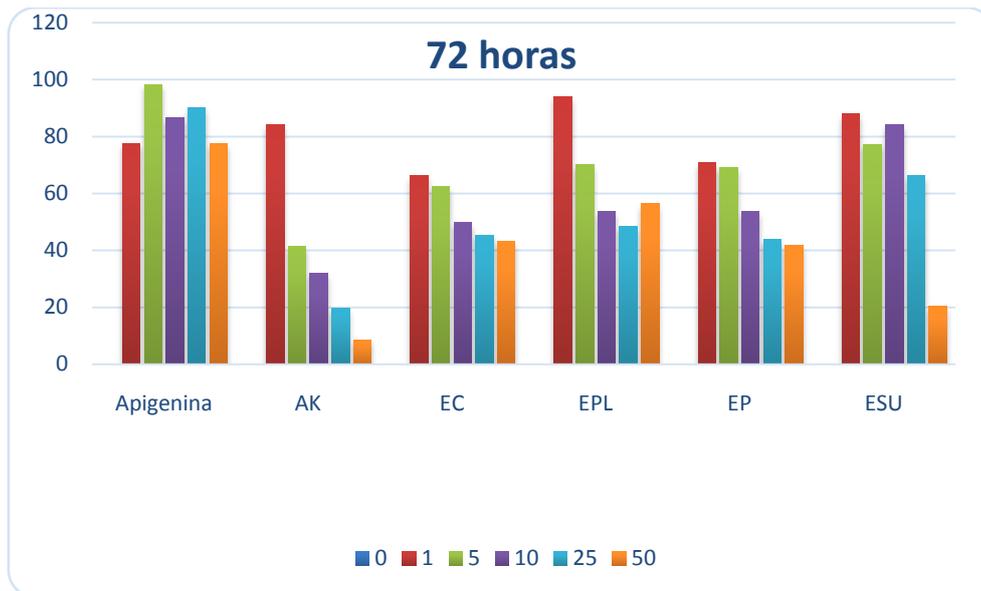


Gráfico 6: Resumen proliferación de células CaCo-2 a las 72 horas.

d) Efectos sobre el ciclo celular en las líneas Vero y CaCo-2.

En el estudio del ciclo celular, la distribución en las diferentes fases para la **línea Vero** fue $56,05 \pm 1,21\%$ en G_0-G_1 , $10,25 \pm 0,54\%$ en G_2-M y $33,69 \pm 0,68\%$ en fase S.

El efecto de la flavona AK mostró un bloqueo en G_0-G_1 del 74,87% observándose un 50% de pérdida de población celular de la fase S.

El flavonol ESU bloqueó el transcurso normal del ciclo celular en un 72,97%.

Las dos flavanonas analizadas, EPL y EP revelaron una incidencia significativa aunque menos intensa, en el que el bloqueo del ciclo ocurría en la fase S (43,34 y 43,27%, respectivamente). No existían diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

Atendiendo a los efectos después de 72 horas de tratamiento, observamos un bloqueo significativo del 70,11% en fase G_0-G_1 de Apigenina y una atenuación del bloqueo por la AK en esa misma fase respecto de 24 horas.

En la familia de flavonoles observamos efectos contrapuestos entre los dos extractos. ESU provocaba un bloqueo significativo de G_0-G_1 de 75,98%. EC también causó una alteración del perfil del ciclo pero en sentido opuesto, y más leve, en el que observamos un bloqueo significativo del 36,24% en fase S.

En el caso de flavanonas, los efectos significativos los hallamos en las primeras 24 horas de tratamiento donde, sin mostrar diferencias entre ambos extractos, se produjo un bloqueo en la fase S de 32,24% y 32,95% por EPL y EP respectivamente.

Las siguientes tablas muestran los valores absolutos expresados en media más/menos desviación típica del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular:

	G₀ –G₁	S	G₂ –M
Control 24 h	56,05 ± 1,21	33,69 ± 0,68	10,25 ± 0,54
Apig	54,06 ± 3,87	33,20 ± 1,81	12,74 ± 2,08
AK	74,87 ± 0,55	15,78 ± 0,57	9,36 ± 1,03
EPL	49,79 ± 0,99	43,34 ± 0,63	6,87 ± 1,61
EP	47,19 ± 2,43	43,27 ± 1,33	10,54 ± 4,32
ESU	72,97 ± 5,07	19,35 ± 4,52	7,68 ± 0,69
EC	50,76 ± 0,71	33,50 ± 4,26	15,75 ± 4,97

Tabla 8: Efectos sobre el ciclo celular de Vero a las 24 h.

	G₀ –G₁	S	G₂ –M
Control 72 h	59,58 ± 2,26	29,79 ± 1,56	10,63 ± 1,17
Apig	70,11 ± 1,86	22,85 ± 1,95	7,04 ± 0,18
AK	63,82 ± 1,91	23,13 ± 1,09	13,05 ± 0,82
EPL	58,40 ± 0,96	32,24 ± 2,44	9,35 ± 1,51
EP	59,34 ± 4,65	32,95 ± 5,54	7,67 ± 1,43
ESU	75,98 ± 2,18	18,34 ± 2,09	5,67 ± 0,77
EC	54,32 ± 4,09	36,24 ± 4,47	9,45 ± 0,49

Tabla 9: Efectos sobre el ciclo celular de Vero a las 72 h.

En el caso de la **línea CaCo-2**, observamos que EPL provocó un bloqueo de la fase S de 65,67% y 69,72% tras 24 y 72 horas respectivamente. En el caso de flavonoles, EC también causó un bloqueo en fase S en los dos tiempos de tratamiento de 66,47% y 55,05% respecto al total de la población

celular analizada. Además EC desarrolló un bloqueo de la fase G₂-M tanto a 24 horas como a 72 horas de 18,67% y 26,69%, respectivamente, siendo este último dato algo más del doble del valor del control en la misma fase. ESU provocó cambios en el mismo sentido pero sólo significativos tras 72 horas, en que observamos un 60,78% de la población celular en la fase S. Las flavonas tuvieron un efecto más amortiguado en la línea celular Caco2, siendo destacables, no obstante, el bloqueo de AK en fase G₂-M de 19,03% tras 24 horas, y bloqueo de Apigenina en fase G₀-G₁ de 45,57% tras 72 horas de tratamiento:

	G₀-G₁	S	G₂-M
Control 24 h	36,12 ± 7,16	54,24 ± 5,94	9,64 ± 2,20
Apig	35,86 ± 2,28	54,64 ± 2,32	9,49 ± 0,84
AK	30,30 ± 1,19	50,67 ± 0,51	19,03 ± 0,98
EPL	24,52 ± 3,84	65,67 ± 1,49	9,82 ± 2,45
EP	38,62 ± 3,03	51,05 ± 3,89	10,34 ± 1,52
ESU	22,16 ± 3,05	59,65 ± 2,27	18,20 ± 0,99
EC	14,87 ± 1,71	66,47 ± 0,51	18,67 ± 2,22

Tabla 10: Efectos sobre el ciclo celular de CaCo-2 a las 24 h.

	G₀-G₁	S	G₂-M
Control 72 h	39,54 ± 3,30	49,02 ± 2,73	11,44 ± 1,90
Apig	45,57 ± 1,38	45,53 ± 3,29	8,89 ± 1,97
AK	37,23 ± 1,40	50,23 ± 3,23	12,64 ± 2,09
EPL	27,74 ± 3,39	69,72 ± 2,55	2,59 ± 1,93
EP	39,63 ± 2,99	50,88 ± 1,59	9,67 ± 1,40
ESU	26,03 ± 2,92	60,78 ± 4,78	13,19 ± 1,86
EC	18,26 ± 2,65	55,05 ± 7,75	26,69 ± 6,94

Tabla 11: Efectos sobre el ciclo celular de CaCo-2 a las 72 h.

Las siguientes gráficas muestran un resumen por grupo de flavonoides (flavonas, flavanonas y flavan-3-oles) de sus efectos sobre el ciclo celular de la línea tumoral CaCo-2:

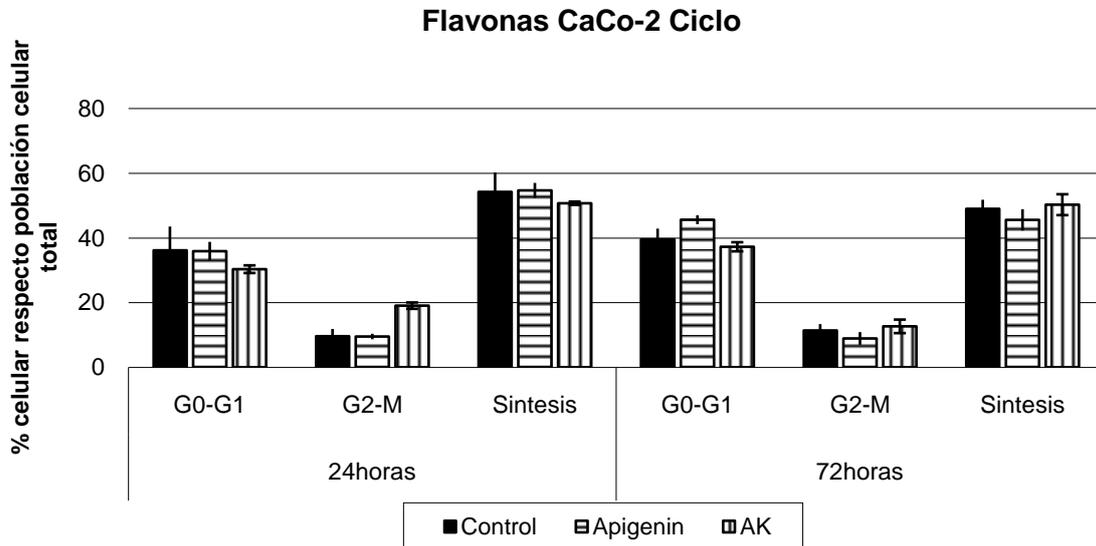


Gráfico 7: Efectos de Apigenina y Apigenina potásica sobre ciclo celular en CaCo-2.

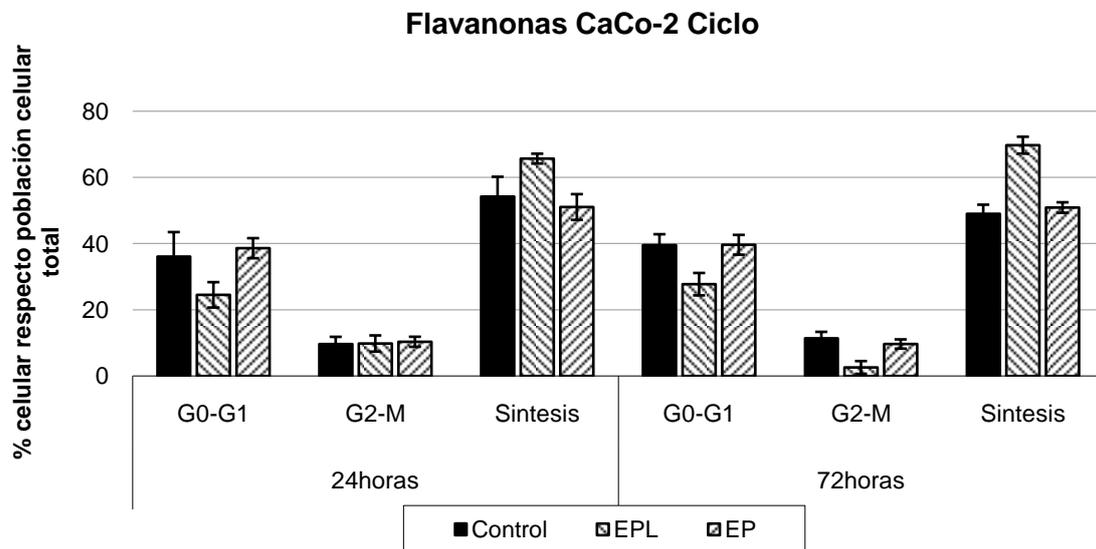


Gráfico 8: Efectos de EPLy EP sobre ciclo celular en CaCo-2.

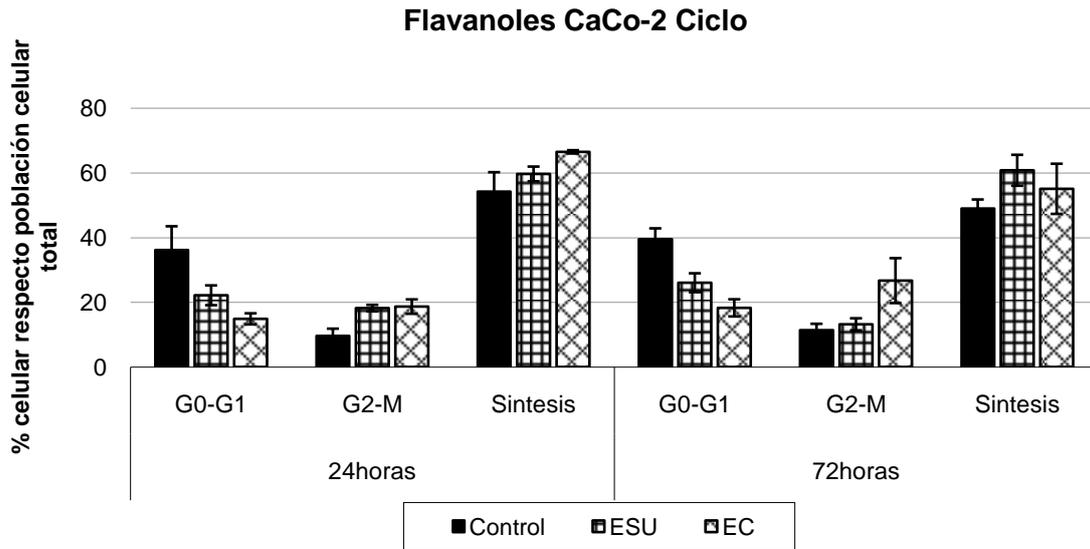


Gráfico 9: Efectos de ESU y EC sobre ciclo celular en CaCo-2.

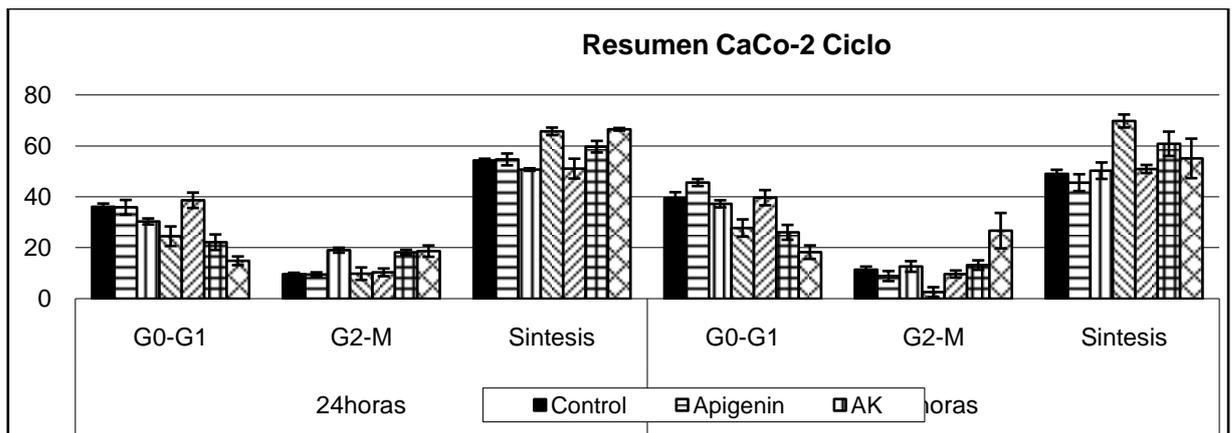


Gráfico 10: Resumen de efectos sobre ciclo celular en CaCo-2 de nuestros extractos.

e) Efectos sobre la apoptosis en las líneas Vero y CaCo-2.

Sobre la **línea celular Vero**, en el estudio de la apoptosis celular, los flavonoles provocaron fundamentalmente necrosis celular, con el caso de EC que en los dos tiempos de tratamiento mostró valores de necrosis 17,40% y 18,30% en 24 y 72 horas respectivamente. Las células tratadas con ESU se encontraban en necrosis en un porcentaje del 3,20% y del 6,90% a las 24 y 72 horas respectivamente.

El EC demostró tener cierta capacidad apoptótica pues tanto a 24 horas como a 72 horas de tratamiento los valores de apoptosis inicial fueron 1,30% y 4,95% respectivamente, significativos en ambos casos respecto al control. En menor medida, ESU provocó una apoptosis inicial de 1,10% tras 72 horas. Flavona y flavanonas no mostraron diferencias significativas en el control de células sanas Vero excepto una reducción de la población necrótica a las 72 horas por parte de Apig y EPL con unos valores de 2,10% y 2,20% respectivamente, siendo la mitad de los valores control para células en necrosis.

	Apoptosis Inicial	Apoptosis Tardía	Necrosis	Viables
Control 24h	0,2 ± 0	1,15 ± 0,64	1,65 ± 0,35	97 ± 0,28
Staurosporine	12,8	0,5	0,6	86,1
Apig	0,4 ± 0,28	0,95 ± 0,07	1,2 ± 0,14	97,5 ± 0,28
AK	0,45 ± 0,00	1,2 ± 0,07	1,15 ± 0,49	97,15 ± 0,35
EPL	0,2 ± 0,14	1,25 ± 0,21	1,9 ± 0,14	96,7 ± 0,42
EP	0,3 ± 0,14	1,65 ± 0,49	2,15 ± 0,35	95,9 ± 0,14
ESU	0,2 ± 0,00	0,15 ± 0,21	3,2 ± 0,28	96,45 ± 0,49
EC	1,3± 0,14	0,15 ± 0,07	17,4 ± 0,42	81,1 ± 0,28

Tabla 12: Apoptosis sobre Vero a las 24 horas.

	Apoptosis Inicial	Apoptosis Tardía	Necrosis	Viables
Control 72h	0	0,2 ± 0,28	4,05 ± 1,06	95,75 ± 0,78
Staurosporine	15,2 ±	2,9 ±	12,6 ±	69,3 ±
Apig	0,1 ± 0,14	0,25 ± 0,21	2,1 ± 0,42	97,6 ± 0,14
AK	0,1 ± 0	0,35 ± 0,07	2,85 ± 0,49	96,75 ± 0,35
EPL	0	0,15 ± 0,07	2,2 ± 0,42	97,6 ± 0,57
EP	0	0,45 ± 0,21	3,3 ± 0,28	96,2 ± 0,42
ESU	1,1 ± 0,28	0,2 ± 0,14	6,9 ± 0,71	91,8 ± 0,57
EC	4,95 ± 0,21	0,35 ± 0,07	18,3 ± 0,71	76,45 ± 0,49

Tabla 13: Apoptosis sobre Vero a las 72 horas.

Los efectos apoptóticos de las tres familias flavonoides sobre la línea de células tumorales **CaCo-2** fueron los siguientes:

La flavona AK mostró capacidad apoptótica relevante a partir de las 72 horas de tratamiento, cuando observamos valores de 6,70% y 16,25% en apoptosis inicial y tardía respectivamente, además de un valor significativamente bajo en necrosis respecto del control.

Los efectos de ambas flavanonas, EPL y EP fueron significativos a las 72 horas de tratamiento con unos valores de apoptosis inicial de 4,10% y 1,85% respectivamente, y de apoptosis tardía de 11,30% y 10,15% respectivamente. Esta familia presenta también valores significativamente bajos de necrosis tras 72 horas, de 0,80% y 1,45% respectivamente.

Los flavonoles presentaron efectos muy significativos a las 72 horas. EC provocó una población de células apoptóticas tardías del 19,75% y de células apoptóticas en fase inicial de 5,95%, tres y seis veces superior a los respectivos valores de los controles. EC también causó un significativo aumento del valor de apoptosis inicial a 24 horas en 5,95%. En cuanto a la necrosis provocada por ESU y EC observamos una elevada incidencia tras 72 horas de tratamiento, con 10,55% y 10,65% respectivamente. Además, en el

caso de EC a 24 horas, observamos más doble de población necrótica que en el control, 4,00%.

	Apoptosis Inicial	Apoptosis Tardía	Necrosis	Viables
Control 24 h	2,25 ± 0,35	11 ± 0,85	1,7 ± 0,14	85,05 ± 1,34
Staurosporine	20,1	15,8	0,5	63,6
Apig	3,45 ± 0,21	3,05 ± 0,07	2,15 ± 0,07	91,4 ± 0,14
AK	5,25 ± 0,35	6,35 ± 0,64	2,9 ± 0,42	85,5 ± 0,57
EPL	4,45 ± 0,78	4,5 ± 0,57	2 ± 0,14	89,05 ± 1,48
EP	1,1 ± 0,14	1,35 ± 0,07	2,15 ± 0,21	95 ± 0,28
ESU	2,8 ± 0,42	11,35 ± 0,35	2 ± 0,28	83,85 ± 0,35
EC	5,95 ± 0,21	11,5 ± 0,28	4 ± 0,28	78,55 ± 0,35

Tabla 14: Apoptosis sobre CaCo-2 a las 24 horas.

	Apoptosis Inicial	Apoptosis Tardía	Necrosis	Viables
Control 72 h	0,7 ± 0,57	7,15 ± 2,53	4,45 ± 0,07	87,65 ± 1,91
Staurosporine	19,9	8,1	0,6	71,5
Apig	1,15 ± 0,07	8,85 ± 3,18	4,25 ± 0,64	85,75 ± 3,89
AK	6,7 ± 0,49	16,25 ± 0,64	1,5 ± 0,42	75,5 ± 0,71
EPL	4,1 ± 0,57	11,3 ± 0,71	0,8 ± 0,14	83,8 ± 0,00
EP	1,85 ± 0,21	10,15 ± 1,63	1,45 ± 0,07	86,55 ± 1,77
ESU	1,6 ± 0,71	6,3 ± 0,42	10,55 ± 0,21	81,55 ± 0,49
EC	5,95 ± 0,21	19,75 ± 1,20	10,65 ± 0,21	63,7 ± 0,49

Tabla 15: Apoptosis sobre CaCo-2 a las 72 horas.

A continuación, se muestran unas gráficas resumen por grupos de flavonoides sobre sus efectos sobre la apoptosis en la línea CaCo-2:

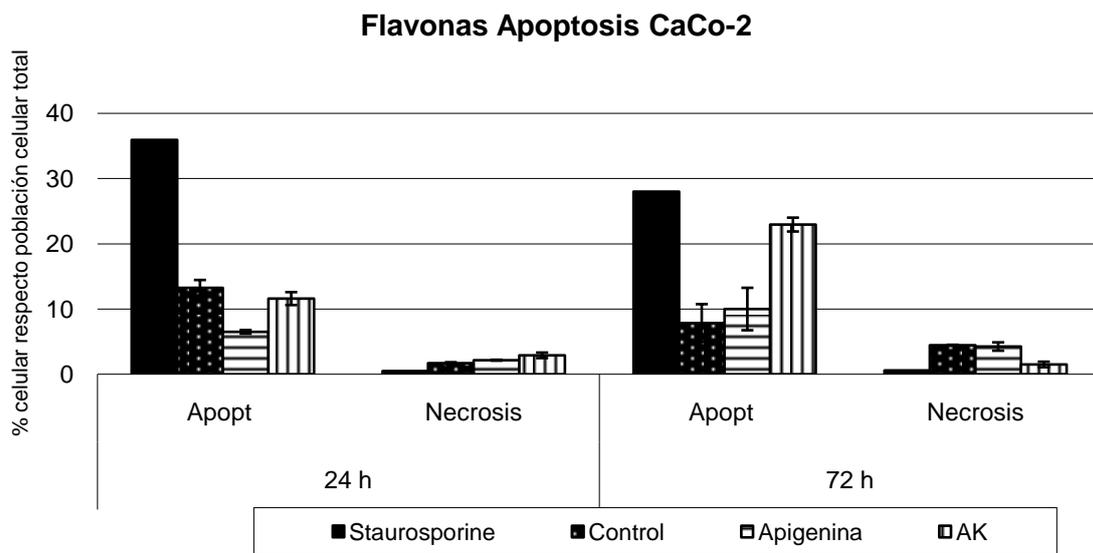


Gráfico 11: Efectos de Apigenina y Apigenina potásica sobre Apoptosis en CaCo-2.

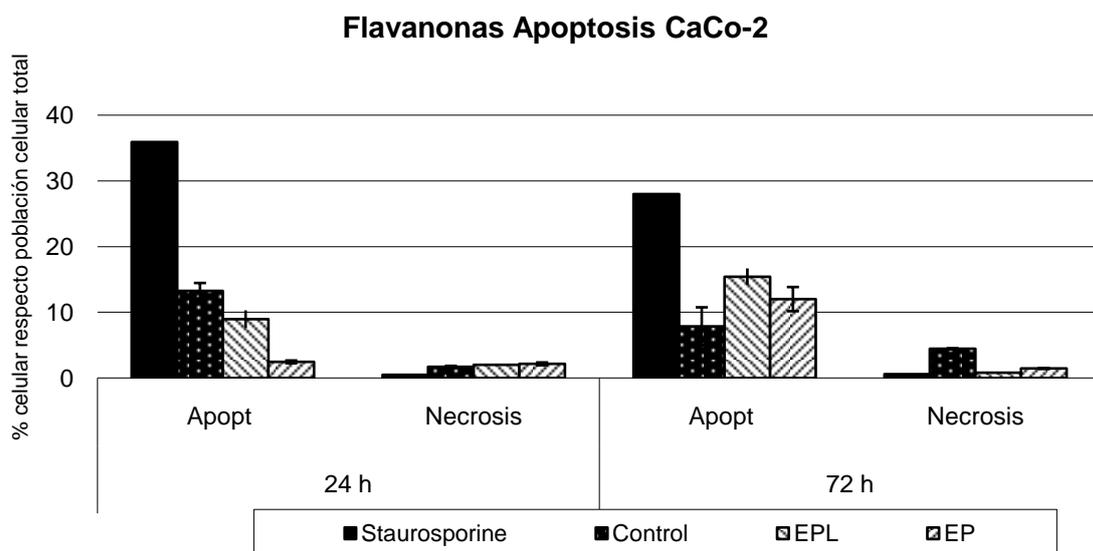


Gráfico 12: Efectos de EPL y EP sobre Apoptosis en CaCo-2.

Flavanoles Apoptosis CaCo-2

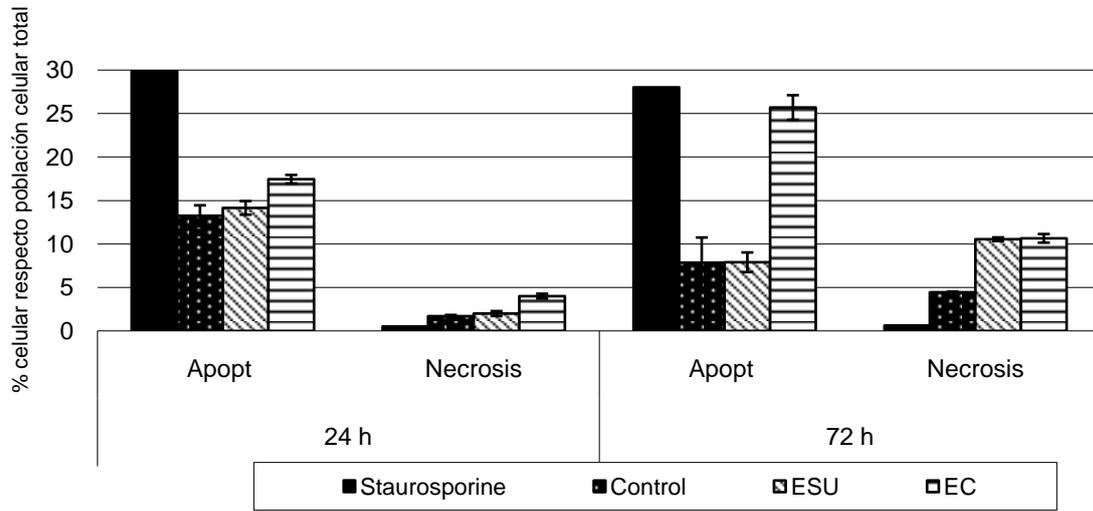


Gráfico 13: Efectos de ESU y EC sobre Apoptosis en CaCo-2.

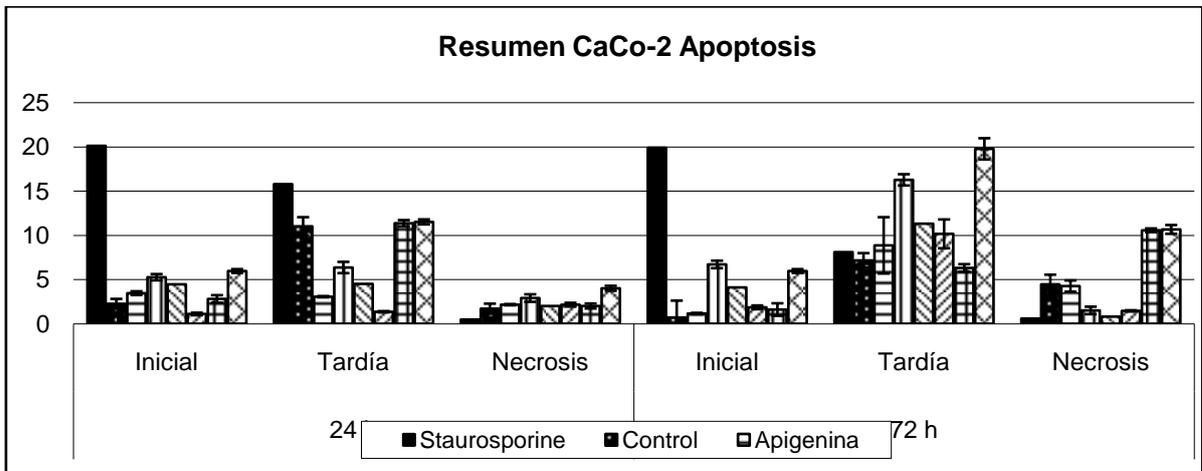


Gráfico 14: Resumen de efectos sobre Apoptosis en CaCo-2 de nuestros extractos.

V. DISCUSIÓN

El **cáncer colorrectal** es la patología neoplásica con mayor incidencia en los países occidentales; junto con los tumores de mama y de pulmón, son los que conllevan mayor mortalidad mundial. Alrededor del 25-30% de los pacientes se diagnostican en estadio IV (metastásicos) y del resto, principalmente los diagnosticados en estadios II ó III, más del 20-50% van a progresar a estadios más avanzados y metástasis. La supervivencia global a 5 años es de aproximadamente el 50%, llegando a ser del 10% en los pacientes con enfermedad en estadio IV1.

Dada la gran incidencia y las altas tasas de mortalidad, se han ido aplicando diversos protocolos terapéuticos basados en agentes quimioterapéuticos generales, y más recientemente se han implementado nuevos protocolos que prevén el uso combinado de dichos quimioterapéuticos con anticuerpos monoclonales frente a dianas oncogénicas específicas. Aún así, el abordaje con protocolos quimioterapéuticos clásicos sigue siendo fundamental en el tratamiento, y se aplican de manera combinada diferentes agentes, como platinos, irinotecan, 5 Fu, capecitabine, etc., siguiendo los esquemas propuestos en diversos protocolos clínicos. Estos fármacos quimioterápicos siguen teniendo una alta tasa de efectos indeseables, y por tanto se han desarrollado estudios en busca de agentes protectores de las células sanas y que eviten la proliferación de las células cancerosas. (Hernández-losa 2011).

La evidencia sugiere que la carcinogénesis es un proceso de múltiples pasos de anomalías genéticas y epigenéticas que conducen a la progresiva transformación de las células sanas hacia la malignización. El cáncer es una enfermedad prevenible, de hecho, algunos cánceres son fáciles de tratar e incluso curar si se detectan precozmente. El cribado de varios órganos puede detectar las lesiones precancerosas antes de su progresión al cáncer. Más de la mitad de los cánceres humanos se deben a causas evitables como el humo del tabaco, las infecciones recurrentes, la exposición solar, y toxinas ambientales. La combinación de una dieta saludable, actividad física regular y el control del peso, podría conducir a la prevención de varios cánceres. Una dieta basada en vegetales, especialmente frutas y verduras

contiene importantes cantidades de moléculas con capacidad preventiva de luchar contra el desarrollo de neoplasias. Carotenos, flavonoides, polifenoles, isoflavonas, catequinas, y otras muchas sustancias se encuentran en estas dietas y han demostrado reducir el riesgo de padecer varios tipos de cáncer humanos (Shukla 2010).

Además de los flavonoides y otras sustancias antioxidantes que han demostrado su papel quimiopreventivo, sustancias como la fibra, el ácido fólico, calcio, vitamina D o el ácido acetil salicílico, han sido ensayadas tanto in vitro como in vivo, en el tratamiento del cáncer colorrectal obteniendo prometedores resultados.

Para el estudio de los diferentes flavonoides sobre la viabilidad celular se empleó el test de MTT, descrito por Carmichael et al y Alley (1988). Esta técnica se basa en la capacidad de las células viables, mediante deshidrogenasas mitocondriales, de reducir el MTT, una sal de tetrazolio amarilla, a un producto de formazano de color azul. Esta técnica tiene la ventaja de que puede realizarse de forma semiautomática, utilizando placas de 96 pocillos, ya que el producto de formazano se puede cuantificar mediante un espectrofotómetro de placas. Esta ventaja, junto a que sus resultados son similares a los de otras técnicas empleadas para evaluar la viabilidad celular, lo convierten en una de las técnicas más utilizadas para este tipo de ensayos.

El **primer objetivo** de nuestro trabajo no fue únicamente realizar un estudio de potencial **viabilidad/citotoxicidad** sobre las líneas celulares Vero y CaCo-2 de una serie de extractos y compuestos polifenólicos, sino intentar establecer una relación estructura-actividad en este ensayo modelo. En el trabajo hemos investigado sobre 3 familias de flavonoides procedentes de tres grupos de materia prima vegetal bien conocidos: los cítricos (flavanonas y flavonas), la semilla de uva (flavan-3-ol, polímeros) y el cacao (flavan-3-ol, monómeros).

La naturaleza de los ensayos biológicos que llevamos a cabo nos ha permitido vislumbrar posibles correlaciones entre la estructura del esqueleto

molecular y la capacidad de inhibición de la **proliferación celular** *in vitro*, de cada extracto. La determinación del mecanismo preciso mediante el cual estas sustancias influyen en el metabolismo celular, o en las estrategias de relación de la célula con el medio, será objeto de atención específica en futuras investigaciones.

Para las **células Vero**, en el caso de los flavan-3-oles presentes en los extractos ESU y EC existía un marcado paralelismo en sus efectos antiproliferativos, tanto en efecto dosis-respuesta como a lo largo de los tres tiempos ensayados (24, 48 y 72 horas). ESU es un extracto compuesto mayoritariamente por procianidinas tetraméricas o, incluso, de mayor peso molecular (hasta 15 unidades de catequina, esta determinación no se ha incluido específicamente en este trabajo por su complejidad), mientras que en el caso de EC, los flavan-3-ol presentes son, principalmente, estructuras monoméricas, destacando la presencia de epicatequina (es también reseñable la presencia del denominado dímero B2). Inicialmente, podríamos establecer la hipótesis de que el efecto dosis-respuesta más atenuado en EC frente a ESU, entre 1 y 10 μM así como el menor impacto negativo (aunque a pesar de todo elevado) en la proliferación celular a mayores concentraciones (25 μM y 50 μM), podría relacionarse con la predominancia de monómeros y dímeros del esqueleto flavan-3-ol que, por su menor peso molecular, interferirían en menor grado con el mecanismo de intercambio de sustancias entre la célula y el medio.

En el caso de los flavonoides presentes en los extractos y compuestos cítricos estudiados, existe un mayor número de modificaciones estructurales que pueden ser estudiadas. La estructura más sencilla es la de la naringenina, en este caso en su forma de sal potásica para facilitar su solubilidad en agua. Se trata, precisamente, de la primera estructura básica en la cadena biosintética de las plantas, siendo un compuesto de naturaleza aglicón (sin restos azucarados en su molécula) y esqueleto molecular con estructura plana, lo que podría explicar el muy discreto efecto dosis-respuesta y la escasa inhibición de la viabilidad celular a los tres tiempos ensayados.

Al igual que en el caso anterior, los extractos EPL y EP contienen mayoritariamente flavanonas, pero a diferencia de la naringenina, se trata de compuestos glicosilados, con la presencia en su molécula de dos azúcares enlazados, glucosa y ramnosa. Entre ambos extractos existen, no obstante, diferencias estructurales significativas. Por un lado, EPL tiene como flavanona mayoritaria a la eriocitrina, que posee una estructura catecol en el anillo B de su esqueleto molecular. Adicionalmente, su sustitución glicosídica presenta una estructura lineal, debido a que el enlace entre glucosa y ramnosa es de tipo O-(1-6) (denominada tipo rutinósido), lo que supone un alineamiento del radical disacárido con el esqueleto molecular. Creemos que estas características causarían una mínima interacción-distorsión en la bicapa lipídica de la membrana celular, lo que concuerda experimentalmente con el leve efecto negativo sobre la viabilidad celular a lo largo de las 72 horas de duración del tratamiento a diversas concentraciones.

En el caso del extracto EP, la flavanona mayoritaria es la naringina y, en menor grado la neohesperidina. Ambos son también compuestos glicosilados y su sustitución en el anillo B es diferente, el primero es un compuesto monohidroxilado y el segundo es similar a la eriocitrina pero con uno de los grupos hidroxilo esterificado (metilado). Además, la conformación molecular de la estructura glicosilada respecto del resto de la molécula no es lineal, sino que el enlace glicosídico O-(1-2) (denominada tipo neohesperidósido) de ambas flavanonas confiere al sustituyente disacárido una estructura en ángulo de aproximadamente 90° respecto al grupo benzo-pirona del núcleo flavonoide.

Estas evidentes diferencias estructurales podrían relacionarse con los resultados experimentales obtenidos, en función de la marcada inhibición de EP sobre la proliferación celular, alcanzando valores de 38% de viabilidad celular respecto el control y en el marcado efecto dosis-respuesta. Esto podría ser resultado de una interacción dinámica con la membrana celular superior a EPL, la distorsión de la bicapa lipídica ocasionada sería más profunda pudiendo interferir de modo considerable en el equilibrio entre citoplasma y medio externo. Encontramos difícil explicar sin embargo, y debido a éste

razonamiento, la proliferación observada a las 24 horas de tratamiento en la que incluso a máxima concentración, el porcentaje de viabilidad celular es próximo al 100 %.

El estudio de la apigenina introduce un nuevo elemento estructural. La configuración espacial del esqueleto molecular de la apigenina difiere de las flavanonas debido a la presencia del doble enlace C2=C3, que genera una estructura totalmente plana y evita que la disposición del anillo B se sitúe en un plano distinto del que ocupan los anillos A y C. Este hecho apoyaría la hipótesis de un menor efecto adverso sobre la proliferación celular de aquellas sustancias con una estructura tridimensional planar, como es el caso de la apigenina y, probablemente, de las flavonas en general, que alterarían en menor grado la bicapa lipídica de la membrana celular. No obstante, remarcamos que los datos obtenidos tanto para flavonas como para flavanonas muestran un reducido efecto antiproliferativo y que las diferencias observadas se encuentran en un rango bajo aunque fundamentalmente a favor del menor efecto antiproliferativo de la naringenina.

Así, podemos decir que la mayor linealidad estructural de las moléculas de flavonoides que componen los extractos del estudio parece correlacionarse con una mayor proliferación de la línea celular Vero in vitro. Por ello, de forma específica, podría establecerse como orden de actividad antiproliferativa de las estructuras aglicón estudiadas, el siguiente: flavan-3-ol > flavanona > flavona. No obstante, no podemos descartar en este orden la potencial influencia del diferente patrón de sustitución en el anillo B del esqueleto flavonoide.

Para comprobar los efectos citotóxicos/antiproliferativos de los agentes del estudio en células cancerosas, elegimos la línea celular **CaCo-2**, derivada de un adenocarcinoma de colon humano. Estas células, aunque derivan de adenocarcinoma de intestino grueso, cuando se cultivan bajo condiciones específicas se asemejan a los enterocitos del intestino delgado. La línea Caco-2 en cultivo forma una monocapa de células epiteliales polarizadas que proporciona una barrera física y bioquímica para el paso de iones y moléculas pequeñas, que es ampliamente utilizada por la industria farmacéutica como modelo in vitro de la mucosa intestinal humana para predecir la absorción de fármacos administrados por vía oral.

En nuestro estudio, hemos tomado varios tiempos de incubación con los diferentes agentes (24, 48 y 72 horas) para poder evaluar tanto su efecto citotóxico como antiproliferativo sobre la citada línea celular. Varios autores han establecido que en el tratamiento durante periodos cortos de tiempo, tales como 24 horas, los cambios de viabilidad celular son debidos, fundamentalmente, a la muerte celular directa (Yáñez, 2004); otros autores, sin embargo, proponen la incubación con concentraciones muy elevadas durante periodos muy cortos (3-4 horas) para estudiar la citotoxicidad (Kuntz, 1999). Los ensayos durante 72 horas, por otra parte, permiten evaluar el poder antiprolifeativo del compuesto, ya que dan tiempo a que se produzcan fenómenos de apoptosis, de parada del ciclo celular, etc...

En nuestro estudio, destacamos el potente efecto citotóxico observado en el tratamiento con apigenina potásica. Esta flavona, ampliamente estudiada por nuestro grupo de investigación y que ya ha mostrado previamente su capacidad antitumoral en múltiples líneas celulares y modelos animales, provocó un marcado efecto dosis-respuesta, muy acusado a partir de la concentración 10 μ M. Con la concentración 50 μ M se produjo un efecto citotóxico muy marcado, bajando incluso por debajo del 10% a las 72 horas. Su efecto fue más potente que el de la apigenina no potásica, lo que confirma la mejora de la molécula al añadirle el ión potasio. En estudios in vitro, la apigenina ha demostrado efecto inhibitorio sobre el crecimiento de varias líneas celulares de cáncer: mama (Yin, 2001), piel (Caltagirone,2000), tiroides (Yin,

1999), páncreas (Ujiki, 2006) y también colon (Wang, 2000). Su mecanismo de acción no está totalmente aclarado pero se conoce que posee actividad antiinflamatoria, de captación de radicales libres e inhibición de COX-2 entre otras.

Con los restantes agentes, solía existir efecto dosis-respuesta a las concentraciones más altas (10, 25 y 50 μM) y a las 72 horas, mostrando más que efecto citotóxico directo, interferencia con la viabilidad celular. Son destacables los resultados obtenidos con el extracto de pomelo, que no habiendo afectado prácticamente al cultivo en las células Vero (no transformadas), sobre las células neoplásicas CaCo-2 mostró actividad citotóxica y antiproliferativa significativa en las concentraciones 25 y 50 μM a las 24 horas y en todas las concentraciones a las 48 y 72 horas.

En **nuestro tercer objetivo**, para localizar posibles interacciones metabólicas entre alguno de los flavonoides analizados y el complejo sistema enzimático y de señalización que comprende el **ciclo celular**, realizamos un análisis de contenido de ADN mediante fluorescencia y citometría de flujo. El modo en que se distribuyen las células de un cultivo, en diferentes poblaciones en función de su contenido de ADN, permite determinar las fases del ciclo celular en que se encuentran. El ciclo celular es un proceso extremadamente complejo en el que intervienen rutas de señalización extra- e intra-celulares, complejos enzimáticos reguladores, genes reguladores, etc. Tal complejidad requiere un alto control de todos los procesos que se llevan a cabo para evitar cualquier tipo de error que sería fatal para la supervivencia de la célula. Existen unos checkpoint en distintos puntos concretos del ciclo en los que se verifica si el proceso está funcionando correctamente. En caso contrario, un determinado punto de control será el límite hasta donde llegue la célula en su proceso de división y gracias a ello puede determinarse sobre qué fase del ciclo celular interfiere, por ejemplo, una sustancia en estudio.

Las células, en función de la fase del ciclo en la que se halle, varían en su contenido de ADN:

- Fase G0-G1: dotación cromosómica normal (2n)
- Fase G2-M: dotación cromosómica doble (4n)
- Fase S (síntesis pre-mitótica de ADN): dotación cromosómica intermedia respecto de las dos anteriores citadas.

Tras 24 horas de contacto con los diferentes extractos a 50 μ M observamos moderados efectos sobre la distribución en las distintas fases del ciclo tanto en la línea celular Vero como en CaCo-2.

Así, los controles de la **línea Vero** se distribuían de la siguiente forma: 56,05 \pm 1,21% en G0-G1, 10,25 \pm 0,54% en G2-M y 33,69 \pm 0,68% en fase S. Sin embargo, tras el tratamiento con la flavona AK, se observó un bloqueo en G0-G1 del 74,87%, observándose un 50% de pérdida de población celular de la fase S. El flavonol ESU provocó un perfil poblacional similar al de AK, bloqueando el transcurso normal del ciclo celular en un 72,97%. Las dos flavanonas analizadas, EPL y EP revelaron una incidencia significativa aunque

menos intensa, con un perfil distinto, en el que el bloqueo del ciclo ocurría en la fase S (43,34 y 43,27%, respectivamente) además la diferencia entre sus efectos no fue significativa, lo que permite establecer un paralelismo entre ellos. Atendiendo a los efectos después de 72 horas de tratamiento, observamos un bloqueo significativo del 70,11% en fase G0-G1 de Apigenina y una atenuación del bloqueo por la AK en esa misma fase respecto de 24 horas.

En la familia de flavonoles observamos efectos contrapuestos entre los dos extractos. Así, mientras el tratamiento con ESU provocaba un bloqueo significativo de G0-G1 de 75,98%, el EC también provocaba una alteración del perfil del ciclo pero en sentido opuesto, y más leve, en el que observamos un bloqueo significativo del 36,24% en fase S.

En el caso de flavanonas, los efectos significativos los hallamos en las primeras 24 horas de tratamiento donde, sin mostrar diferencias entre ambos extractos, se produjo un bloqueo en la fase S de 32,24% y 32,95% por EPL y EP respectivamente.

En la **línea CaCo-2**, el tratamiento con EPL provocó un bloqueo de la fase S de 65,67% y 69,72% tras 24 y 72 horas respectivamente. En el caso de flavonoles, EC también causó un bloqueo en fase S en los dos tiempos de tratamiento de 66,47% y 55,05% respecto al total de la población celular analizada. Además, el EC desarrolló un bloqueo de la fase G2-M tanto a 24 horas como a 72 horas de 18,67% y 26,69%, respectivamente, siendo este último dato algo más del doble del valor del control en la misma fase. Sin embargo, el ESU provocó cambios en el mismo sentido pero más tardíos, sólo significativos tras 72 horas, donde observamos un 60,78% de la población celular en la fase S.

Las flavonas tuvieron un efecto más amortiguado en la línea celular Caco2, siendo destacables, no obstante, el bloqueo de AK en fase G2-M de 19,03% tras 24 horas, y bloqueo de Apigenina en fase G0-G1 de 45,57% tras 72 horas de tratamiento. En este sentido Bokyoung Sung et al (2014) estudiaron el efecto del tratamiento con apigenina sobre el ciclo celular en la línea de

cáncer de colon humano HCT116, y observaron que se producía un arresto en la fase G2/M. Además, constataron una supresión de la expresión de ciclina B1 y sus activadores Cdc2 y Cdc25c, mientras que la expresión de los inhibidores como p53 o 21CIP1/WAF1, estaba incrementada tras el tratamiento con apigenina.

La homeostasia celular está regulada por el equilibrio entre las velocidades de proliferación, diferenciación y muerte celular (**apoptosis**). En el cáncer este equilibrio está alterado debido a un aumento en la proliferación celular y una disminución de la apoptosis (Hanahan 2000). El mecanismo central de la apoptosis consiste en la activación de una familia de proteasas denominadas caspasas (Meier 2007, Taylor 2008), que se produce esencialmente por 2 vías: la vía de los receptores de muerte (extrínseca) y la vía mitocondrial (intrínseca) (Figura 14). Diferentes miembros de la maquinaria de apoptosis están frecuentemente mutados en el cáncer colorrectal. La mayoría de las líneas de cáncer colorrectal son resistentes a la apoptosis inducida por Fas (Huerta 2006). El mecanismo de pérdida de Fas y de resistencia no está claro, pero en muchos casos no se debe a alteraciones en el receptor Fas, sino en otras proteínas (O'Connell 2000). En el cáncer colorrectal se observa a menudo la sobreexpresión de Bcl-2 y la baja expresión y/o mutación de Bak, Bax u otros miembros proapoptóticos de la familia de Bcl-2 (O'Connell 2000). Más del 50% de los adenocarcinomas que muestran defectos en los mecanismos de reparación del ADN, presentando, por ello, el denominado "fenotipo mutador", tienen mutaciones en BAX (Rampino 1997, Gil 1999). En este tipo de tumores también se han descrito mutaciones que alteran la pauta de lectura de los genes de Fas y Apaf-1 (Yamamoto 2000). La sobreexpresión de survivina, un miembro de la familia de los inhibidores de caspasas IAP (inhibitors of apoptosis), también se ha descrito en más de un 60% de los pacientes con cáncer colorrectal (Huerta 2006, Watson 2006), y los valores altos de survivina correlacionan con una evolución desfavorable. p53 no se expresa o está mutado en el 85% de todos los cánceres de colon. Las mutaciones de p53 aparecen tarde en la progresión del cáncer de colon en el estadio de transición de adenoma a carcinoma (Huerta 2006). La mayoría de los fármacos utilizados actualmente en la terapia del cáncer (15 de los 17

fármacos esenciales según la Organización Mundial de la Salud) inducen la activación de p53. Por tanto, las mutaciones de p53 o de genes importantes de la vía confieren a las células tumorales resistencia a la quimioterapia. Uno de los mecanismos involucrados en la estabilización de p53 en respuesta al daño del ADN es su fosforilación por la proteína ATM (ataxia telangiectasia mutated). La ATM se encuentra inactivada en algunos tipos de cáncer, siendo éste un mecanismo alternativo para inactivar la vía de p53. Los tumores con alteraciones en la vía de p53 no responderán adecuadamente a la quimioterapia genotóxica. (Fabregat 2009).

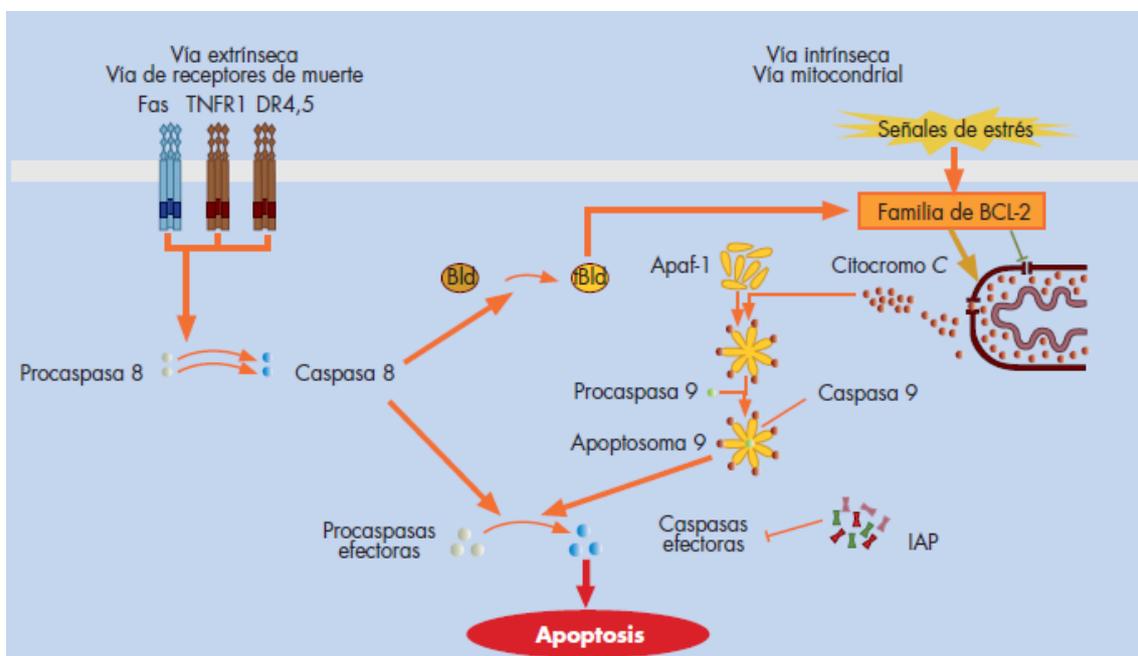


Figura 14: Principales vías de activación de las caspasas en la apoptosis.

En nuestro estudio, el análisis del porcentaje de población celular que se encontraba en lo que denominamos apoptosis inicial, apoptosis tardía y necrosis mostró unos valores en general muy bajos en relación a la población total analizada en la **línea celular Vero**. No obstante, pudimos observar cambios estadísticamente significativos en algunos casos. Así, los flavonoles provocaron fundamentalmente necrosis celular, que en el caso del EC fueron elevados en los dos tiempos de tratamiento, con valores del 17,40% y 18,30% en 24 y 72 horas respectivamente. Algo menores, pero muy significativos fueron los valores de ESU con 3,20% y 6,90%, respectivamente. Sin embargo,

el EC sí demostró tener cierta capacidad apoptótica pues tanto a 24 horas como a 72 horas de tratamiento los valores de apoptosis inicial fueron 1,30% y 4,95% respectivamente, significativos en ambos casos respecto al control. En menor medida, ESU provocó una apoptosis inicial de 1,10% tras 72 horas.

Respecto a la **línea de células tumorales CaCo-2**, consideramos especialmente relevantes los resultados obtenidos por la flavona **Apigenina Potásica**, que mostró una capacidad apoptótica significativa a partir de las 72 horas de tratamiento, cuando observamos valores de 6,70% y 16,25% en apoptosis inicial y tardía respectivamente, además de un valor significativamente bajo en necrosis respecto del control. La apigenina ha sido ampliamente estudiada en diversos tipos de cáncer incluyendo el cáncer colorrectal. Así, en varias líneas celulares de cáncer de colon humanos el tratamiento con apigenina condujo a una inhibición del crecimiento celular y detención del ciclo en G2/M, que se asoció con inhibición de p34 kinasa (cdc2), y con la reducción de acúmulo de p34 y proteína B1 ciclina. Otros estudios adicionales valoraron la actividad individual y la interacción de 7 análogos de apigenina en el ciclo celular, número de células y viabilidad celular de líneas celulares de cáncer de colon humano (Shukla 2010, Wang 2000, Wang 2004). Estos estudios indicaron que la inducción a la detención del ciclo celular por 5 de estos 7 análogos en adicción a otros flavonoides a bajas dosis, cooperaban en la protección contra el cáncer colorrectal a través del bloqueo conjunto de la progresión del ciclo celular.

Un efecto importante de la apigenina es el incremento de la estabilidad del gen supresor de tumores P53 en células normales. Se especula que la apigenina puede jugar un papel significativo en el papel protector modificando los efectos de la proteína p53. La exposición a la apigenina de las células mutantes en la p53 conlleva la inhibición del crecimiento celular y alteración del ciclo celular como demostró un estudio en el que el tratamiento con apigenina resultó en la inhibición del crecimiento y la detención en fase G2/M en dos líneas celulares con p53 mutante. (Shukla 2010, Takagaki 2005) Estos efectos fueron asociados con un marcado incremento en la expresión de p21/WAF1 e inhibición del crecimiento. Nuevas evaluaciones de la poliposis adenomatosa

colónica (APC) podrían ser críticas para la apigenina al inducir la parada del ciclo celular en el cáncer de colon humano (células mutadas HT29-APC). Estudios sinérgicos de apigenina y 5, 6 dicloro ribifuranosyl-benzimidazol, inducen la sensibilización de las células del cáncer de colon a la apoptosis mediada por el FNT α . La inhibición de la CK2 en células de HTC-116 y HT-29 con el uso de 2 inhibidores específicos de CK2, resultó en una sinérgica reducción en la supervivencia de la célula cuando fue usada con FNT α . (Shukla 2010, Farah 2003) La actividad quimiopreventiva de la apigenina puede ser mediada por su capacidad de modular la cascada MAPK. La apigenina induce una fosforilación dosis dependiente de ERK y p38 kinasa pero tiene escaso efecto en la fosforilación de c-jun amino terminal kinasa (JNK). Más estudios sobre apigenina sugieren que inhibe la actividad de la ornitina descarboxilasa (ODC) y la formación de focos de criptas aberrantes en dos modelos de ratones con poliposis adenomatosa de colon. (Shukla 2010, Au 2006).

Las interacciones entre sulforafano y apigenina resultaron en la inducción de UGT1A1 y GSTA1, la fase 2 detoxificante de enzimas en células de CaCo2. La apigenina mostró inducir la transcripción de UGT1A1 pero no la de GSTA1; el sulforafano indujo la transcripción de ambos y dosis y tiempo dependiente. La combinación de sulforafano y apigenina resultó en una sinérgica inducción de la expresión del ARNm de UGT1A1 aunque esta interacción no fue vista en GSTA1, sugiriendo los diferentes caminos de transducción de señales que regulan la expresión de enzimas de detoxificación. Estudios adicionales sugirieron que la apigenina es más potente que la tricina o quercetina en disminuir la expresión inducible de la COX2 en células HCEC. (Shukla 2010)

También fueron destacables los resultados obtenidos por ambas flavanonas, **EPL y EP**, que eran significativos a las 72 horas de tratamiento con unos valores de apoptosis inicial de 4,10% y 1,85% respectivamente, y de apoptosis tardía de 11,30% y 10,15% respectivamente. Esta familia presentó también valores significativamente bajos de necrosis tras 72 horas, de 0,80% y

1,45% respectivamente. Varios estudios realizados sobre los flavonoides presentes en los cítricos, han demostrado su capacidad para inhibir la proliferación de muchos tipos de líneas celulares cancerosas en ensayos in vitro. Por ejemplo, se observó que la **eriocitrina** y sus metabolitos secundarios producidos por la hidrólisis de una bacteria intestinal (eriodictyol, ácido 3,4-dihydroxy-hydrocinnamic y phloroglucinol) (Miyake, 1997), inducen la apoptosis en las líneas celulares leucémicas HL-60 (Ogata, 2000). En otro trabajo, se estudió la actividad antiproliferativa de 27 flavonoides de Citrus contra varias líneas celulares normales y tumorales. En todos los casos se comprobó una actividad contra las células tumorales incluyendo las del carcinoma A549 y TGBC11TKB de cáncer gástrico, sin afectar las células normales (Kawaii, 1999). Otro estudio demostró que los flavonoides del limón y sus metabolitos inducen la apoptosis en la línea de células leucémicas HL-60, en dosis y tiempo dependientes (Ogata, 2000).

Se ha evaluado en estudios la eficacia antiproliferativa de la **hesperetina** en epitelio de colon mediante el estudio de marcadores de proliferación celular tipo AgNORs, PCNA y focos de criptas aberrantes. Estos estudios muestran un marcado descenso del número de focos pre-neoplásicos pero además un importante descenso de la incidencia de tumores. Los resultados subrayan la potencialidad de la hesperetina en inhibir/disminuir la tumorigénesis en colon de ratas (Aranganathan 2013).

Por otro lado, los flavonoles presentaron efectos muy significativos en 72 horas. El tratamiento con **EC** provocó una población de células apoptóticas tardías de 19,75% y de células apoptóticas en fase inicial de 5,95%, tres y seis veces superior a los respectivos valores de los controles. Además, EC también causó un significativo aumento del valor de apoptosis inicial a 24 horas en 5,95%. En cuanto a la necrosis provocada por **ESU** y EC observamos una elevada incidencia tras 72 horas de tratamiento, con 10,55% y 10,65% respectivamente. Además, en el caso de EC a 24 horas, observamos más doble de población necrótica que en el control, 4,00%.

Rodríguez-Ramiro et al (2011), estudiaron el efecto de una dieta rica en **cacao** en la prevención en fase temprana de la **carcinogénesis colónica** así como los mecanismos de acción involucrados en el modelo animal de cáncer de colon mediante la administración de azoximetano (AOM) en ratas. Estos autores observaron que los animales alimentados con dieta rica en cacao, mostraron una menor formación de focos de criptas aberrantes y menor multiplicidad de criptas. Parece que este efecto podría explicarse por la reducción del estrés oxidativo, comprobado por la reducción de los niveles de los marcadores de oxidación y el incremento de las defensas antioxidantes endógenas enzimáticas y no enzimáticas. También observaron un efecto antiproliferativo provocado por la disminución de los niveles tisulares de las quinasas extracelulares proteína quinasa B y ciclina D1 junto con los efectos proapoptóticos producidos por la reducción de Bcl-x_L y el incremento de la actividad de Bax y caspasa-3.

También se ha investigado las propiedades de las flavonas del cacao en las diferentes etapas de la carcinogénesis. La procianidina obtenida de extractos de semilla de cacao, causa detención del ciclo celular en la fase G2 / M y una inhibición del crecimiento del 70% en las células Caco-2, una línea celular del cáncer de colon (Carnesecchi, 2002).

Respecto a los ESU, algunos autores han publicado que podrían atenuar la acción de Serina y Treonina proteína quinasa, induciendo el arresto del ciclo celular en la fase G1 y la activación de la apoptosis. En un estudio realizado por Cheah y cols. (2014) se utilizaron seis fracciones diferentes de Procianidinas procedentes de semillas de Cabernet Sauvignon en dos estadios de maduración diferenciados. Dichas fracciones fueron testadas sobre la línea CaCo-2, solas y en combinación con el quimioterápico 5-Fluoruracilo. Todas las fracciones estudiadas redujeron la viabilidad celular respecto al control, algunas incluso en mayor grado que el 5-Fluoruracilo solo (65-68% vs 37% respectivamente). Combinadas con el 5-FU algunas fracciones aumentaron la efectividad del quimioterápico hasta en un 83%.

A la luz de los resultados obtenidos en nuestro trabajo, consideramos que este grupo de sustancias, presentes de forma habitual en frutas y vegetales, poseen una capacidad de interaccionar in vitro con la proliferación y el ciclo celular, tanto de células sanas como de células tumorales. Por eso, siendo la quimioterapia la primera línea de tratamiento en el cáncer de colon, consideramos también, que son necesarios más estudios en los que se administren in vivo estos compuestos con el fin de reducir los efectos indeseables de la terapia antineoplásica por su conocida capacidad antioxidante y protectora de la célula sana y su capacidad de influir en el ciclo celular y en la apoptosis de la célula cancerosa.

VI. CONCLUSIONES.

- En las condiciones de nuestro estudio, no hallamos efecto negativo significativo sobre la proliferación celular en ninguno de los extractos testados a concentraciones inferiores a 10 μ M en la línea celular Vero. A dosis altas, solamente el EPL no ocasionaba una pérdida de viabilidad celular mayor del 40 por ciento. Podría establecerse como orden de actividad antiproliferativa de las estructuras flavonoides estudiadas: flavan-3-ol > flavanona > flavona.
- Sobre la línea transformada CaCo-2, todos los extractos estudiados mostraron efecto antiproliferativo y/o citotóxico, destacando los resultados obtenidos por apigenina potásica.
- Sobre la línea Vero, fueron los tratamientos con apigenina potásica y extracto de semilla de uva, los que provocaron un mayor bloqueo del ciclo celular, que era mayor del 70% y en la fase G_0 - G_1 .
- En el estudio del ciclo celular sobre la línea CaCo-2, destacaban los tratamientos con extracto de piel de limón y el de cacao. En ambos casos, se daba en la fase de síntesis y en los dos tiempos de estudio.
- El análisis del porcentaje de población celular que se encontraba en lo que denominamos apoptosis inicial, apoptosis tardía y necrosis mostró unos valores en general muy bajos en relación a la población total analizada en la línea celular Vero. Sin embargo, sobre la línea de células tumorales CaCo-2, aunque también las flavanonas estudiadas mostraron resultados destacables, consideramos especialmente relevantes los resultados obtenidos por la flavona apigenina potásica, que mostró una capacidad apoptótica significativa a partir de las 72 horas de tratamiento en apoptosis inicial y tardía, además de un valor significativamente bajo en necrosis respecto del control.

VII. BIBLIOGRAFÍA.

Adams JB, Brown HM. Discoloration in raw and processed fruits and vegetables. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2007;47(3):319–333.

Adamson GE, Lazarus SA, Mitchell AE y cols. HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. *J Agric Food Chem* 1999; 47: 4184-8.

Adlercreutz CH, Goldin BR, Gorbach, SL, Hockerstedt KA, Watanabe S, Hamalainen EK, Markkanen MH, Makela TH, Wahala KT, Adlercreutz T. Soybean phytoestrogen intake and cancer risk. *J Nutr.* 1995; 125(3 Suppl): 757S-70S.

Aherne SA, O'Brien NM. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition.* 2002; 18(1): 75-81.

Alcaraz M, Acevedo C, Castillo J, Benavente-García O, Armero D, Vicente V, Canteras M. Liposoluble antioxidants provide an effective radioprotective barrier. *Br J Radiol.* 2009; 82(979): 605-09

Alekel DL, Germain AS, Peterson CT, Hanson KB, Stewart JW, Toda T. Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 2000; 72(3): 844-52.

Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, Abbott BJ, Mayo JG et al. Feasibility of drug screening with panel of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer res.* 198; 48(3): 589-601.

Amin I, Koh BK, Asmah R. Effect of cacao liquor extract on tumor marker enzymes during chemical hepatocarcinogenesis in rats. *J. Med. Food* 2004; 7: 7-2.

An-Na L, Sha L, Zhang YJ, Xu XR, Chen YM and Li HB. Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols. *J Nutrients*. 2014; 6, 6020-6047.

Arai Y, Watanabe S, Kimira M, Shimoi K, Mochizuki R, Kinae N. Dietary Intakes of Flavonols, Flavones and Isoflavones by Japanese Women and the Inverse Correlation between Quercetin Intake and Plasma LDL Cholesterol Concentration. *J Nutr*. 2000; 130(9): 2243-50.

Aranganathan S, Alini N. (2013) Antiproliferative Efficacy of Hesperetin (Citrus Flavonoid) in 1,2-Dimethylhydrazine-Induced Colon Cancer. *Phytotherapy Res*. 2013; 27: 999–1005.

Arts ICW, Hollman PCH, Bueno de Mesquita HB, Feskens EJM, Kromhout D. Dietary catechins and epithelial cancer incidence: the Zutphen elderly study. *Int J Cancer*. 2001; 92(2): 298-302.

Au A, Li B, Wang W, Roy H, Koehler K, Birt D. Effect of dietary apigenin on colonic ornithine decarboxylase activity, aberrant crypt foci formation, and tumorigenesis in different experimental models. *Nutr Cancer* 2006;54:243–251.

Bharti S, Rani N, Krishnamurthy B, Arya D. Preclinical Evidence for the Pharmacological Actions of Naringin: A Review. *Planta Med* 2014; 80: 437–451

Beecher GR. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J Nutr*. 2003; 133(10): 3248S-54S.

Benavente-García O, Castillo J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *J Agric Food Chem*. 2008; 56(15): 6185-205.

Benavente-García O, Castillo J, Marín FR, Ortuño A, Del Río JA. Uses and properties of citrus flavonoids. *J Agric Food Chem.* 1997;45(12): 4505-15.

Bergquist SA, Gertsson UE, Knuthsen P, Olsson ME. Flavonoids in baby spinach (*Spinacia oleracea* L.): changes during plant growth and storage. *J Agric Food Chem.* 2005; 53(24): 9459-64.

Bisson JF, Guardia-Llorens MA, Hidalgo S, Rozan P, Messaoudi M. Protective effect of Acticoa powder, a cocoa polyphenolic extract, on prostate carcinogenesis in Wistar-Unilever rats. *Eur. J. Can. Prev.* 2008; 17: 54-61.

Breinholt V, Lauridsen ST, Dragsted LO. Differential effects of dietary flavonoids on drug metabolizing and antioxidant enzymes in female rat. *Xenobiotica* 1999;29(12):1227–40.

Brown JE, Khodr H, Hider RC, Rice-Evans CA. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu^{2+} ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem J.* 1998;15;330(Pt 3):1173-8.

García-Closas R, González CA, Agudo A, Riboli E. Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of gastric cancer in Spain. *Cancer Causes Control* 1999; 10(1): 71-75.

Caltagirone S, Rossi C, Poggi A, et al. Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. *Int J Cancer* 2000; 87: 595–600.

Carmichael J, DeGraf WG, Gafdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity. *Cancer Res.* 1987 ; 47 (4) :936-946.

Carneseccchi S, Schneider Y, Lazarus SA, et al. Flavanols and procyanidins of cocoa and chocolate inhibit growth and polyamine biosynthesis of human colonic cancer cells. *Cancer Lett* 2002;175:147-55.)

Castillo J, Benavente-García O, Lorente J, Alcaraz M, Redondo A, Ortuño A, Del Río JA. Antioxidant activity and radioprotective effects against chromosomal damage induced in vivo by X-rays of flavanols (procyanidins) from grape seeds (*Vitis vinifera*): comparative study versus other phenolic and organic compounds. *J Agric Food Chem.* 2000;48:1738-45.

Chanet A, Milenkovic D, Manach C, Mazur A, Morand C. Citrus flavanones: what is their role in cardiovascular protection? *J Agric Food Chem* 2012; 60: 8809–8822.

Cheah KY, Bastian SE, Acott TM, Abimosleh SM, Lymn KA, et al. Grape seed extract reduces the severity of selected disease markers in the proximal colon of dextran sulphate sodium-induced colitis in rats. *Dig Dis* 2013. *Sci* 58: 970–97.

Cheah KY, Howarth GS, Yazbeck R, Wright TH, Whitford EJ, et al. Grape seed extract protects IEC-6 cells from chemotherapy-induced cytotoxicity and improves parameters of small intestinal mucositis in rats with experimentally-induced mucositis. *Cancer Biol Ther* 2009; 8: 382–390.

Cheah KY, Gordon S, Howarth, Keren A, Bindon, James A, Kennedy, Susan E, P. Bastian. () Low Molecular Weight Procyanidins from Grape Seeds Enhance the Impact of 5-Fluorouracil Chemotherapy on Caco-2 Human Colon Cancer Cells. *Plos one* 2014; 9(6):98921;doi: 10.1371/journal.pone.0098921

Choi EJ, Kim GH. Apigenin causes G(2)/M arrest associated with the modulation of p21(Cip1) and Cdc2 and activates p53-dependent apoptosis pathway in human breast cancer SK-BR-3 cells. *J Nutr Biochem.* 2009;20(4):285-90.

Chun OK, Chung SJ, Song WO. Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of US adults. *J Nutr.* 2007; 137(5): 1244.

Clifford MN. Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health. *Planta Med.* 2004; 70: 1103-1114.

Commenges D, Scotet V, Renaud S, Jacqmin-Gadda H, Barberger-Gateau P, Dartigues JF. Intake of flavonoids and risk of dementia. *Eur J Epidemiol.* 2000; 16(4): 357-63.

Crespo I, García-Mediavilla MV, Almar M, Gonzalez P, Tunon MJ, Sánchez-Campos S, González-Gallego J. Differential effects of dietary flavonoids on reactive oxygen and nitrogen species generation and changes in antioxidant enzyme expression induced by proinflammatory cytokines in Chang Liver cells. *Food Chem Toxicol.* 2008; 46(5): 1555-69.

Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep* 2009; 26(8):1001-43.

D'Archivio M, Santangelo C, Scazzocchio B, Vari R. et al. Modulatory effects of polyphenols on apoptosis induction: relevance for cancer prevention. *Int. J. Mol. Sci.* 2008, 9, 213–228.

Del Río JA, Gómez P, Baidez AG, Arcas MC, Botia JM, Ortuno A. Changes in the levels of polymethoxyflavones and flavanones as part of the defense

mechanism of *Citrus sinensis* (cv. Valencia Late) fruits against *Phytophthora citrophthora*. *J Agric Food Chem*. 2004;52(7): 1913-17.

Du Y, Guo H, Lou H. Grape seed polyphenols protect cardiac cells from apoptosis via induction of endogenous antioxidant enzymes. *J Agric Food Chem* 2007;55: 1695–1701.

Engelbrecht AM, Mattheyse M, Ellis B, Thomas M, Smith R, Peters S, Smith C, Myburgh K. Proanthocyanidin from grape seeds inactivates the PI3-kinase/PKB pathway and induces apoptosis in a colon cancer cell line. *Cancer Letters* 2007;258: 144–153.

Fabregat I, Roncero C, Fernández M. Survival and apoptosis: a dysregulated balance in liver cancer. *Liver Int*. 2007;27:155-62.

Fabregat I, Gil J. Implicaciones clínicas de la investigación básica. Desregulación de la apoptosis en tumores colorrectales y hepáticosGH Continuada. 2009. Vol. 8 N.o 1.

Farah M, Parhar K, Moussavi M, Eivemark S, Salh B. 5,6-Dichloro-ribifuranosylbenzimidazole and apigenin-induced sensitization of colon cancer cells to TNF- α -mediated apoptosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285:919–928.

Fenton JI, Hord NG. Flavonoids promote cell migration in nontumorigenic colon epithelial cells differing in Apc genotype: implications of matrix metalloproteinase activity. *Nutr Cancer* 2004; 48: 182–188

Funes L, Laporta O, Cerdán-Calero M, Micol V. Effects of verbascoside, a phenylpropanoid glycoside from lemon verbena, on phospholipid model membranes. *Chem Phys Lipids*. 2010;163(2):190-9.

Galeone C, Turati F, La Vecchia C, Tavani A. Coffee consumption and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of case-control studies. *Cancer Causes Control* 2010; 21: 1949-1959 [PMID: 20680435 DOI: 10.1007/s10552-010-9623-5].

Gates MA, Tworoger SS, Hecht JL, De Vivo I, Rosner B, Hankinson SE. A prospective study of dietary flavonoid intake and incidence of epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer*. 2007; 121(10):2225-32.

Gates MA, Vitonis AF, Tworoger SS, Rosner B, Titus-Ernstoff L, Hankinson SE, Cramer DW. Flavonoid intake and ovarian cancer risk in a population-based case-control study. *Int J Cancer*. 2009; 124(8): 1918-25.

Gil J, Yamamoto H, Zapata JM, Reed JC, Perucho M. Impairment of the proapoptotic activity of Bax by missense mutations found in gastrointestinal cancers. *Cancer Research*. 1999;59:2034-7.

Granado-Serrano AB, Martín MA, Haegeman G, Goya L et al. Epicatechin induces NF- κ B, activator protein-1 (AP-1) and nuclear transcription factor erythroid 2p45-related factor-2 (Nrf2) via phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) and extracellular regulated kinase (ERK) signalling in HepG2 cells. *Br. J. Nutr.* 2010, 103, 168–179.

Grassi D, Desideri G, Croce G, Tiberti S, Aggio A, Ferri C. Flavonoids, vascular function and cardiovascular protection. *Curr Pharm Des*. 2009; 15(10): 1072-84.

Gonzalez-Sarrias A, Espin JC, Tomas-Barberan FA, Garcia-Conesa MT. Gene expression, cell cycle arrest and MAPK signalling regulation in Caco-2 cells exposed to ellagic acid and its metabolites, urolithins. *Mol. Nutr. Food Res.* 2009, 53, 686–698.

Gould KS, Lister C. Flavonoid functions in plants. *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications.* 2006; pp. 397–442.

Guerrero JA, Lozano ML, Castillo J, Benavente-García O, Vicente V, Rivera J. Flavonoids inhibit platelet function through binding to the thromboxane A2 receptor. *J Thromb Haemost.* 2005; 3(2): 369-76.

Gupta S, Afaq F, Mukhtar H. Selective growth-inhibitory, cell-cycle deregulatory and apoptotic response of apigenin in normal versus human prostate carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 287(4): 914-920.

Ha SK, Lee P, Park JA, Oh HR, Lee SY, Park JH, Lee EH, Ryu JH, Lee KR, Kim SY. Apigenin inhibits the production of NO and PGE2 in microglia and inhibits neuronal cell death in a middle cerebral artery occlusion-induced focal ischemia mice model. *Neurochem Int.* 2008; 52(4-5): 878-86.

Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell.* 2000;100:57-70.

Harnly J, Doherty R, Beecher G, Holden J, Haytowitz D, Bhagwat S, Gebhardt S. Flavonoid content of U.S. fruits, vegetables, and nuts. *J Agric Food Chem.* 2006; 54(26): 9966-77.

Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther.* 2002; 96(2-3): 67-202.

Heijnen CG, Haenen GR, Oostveen RM, Stalpers EM, Bast A. Protection of flavonoids against lipid peroxidation: the structure-activity relationship revisited. *Free Radic Res.* 2002; 36(5): 575-81.

Hermann F, Spieker L, Ruschitzka F, Sudano I, Hermann M, Binggeli C, Luscher T, Reisen W, Noll G, Corti R. Dark chocolate improves endothelial and platelet function. *Heart* 2006; 92: 119-120.

Hernández-Losa J, Sanz J, Landolfia S, López-Ríos F. Recomendaciones para la determinación de mutaciones de K-RAS en cáncer de colon. *Revista española de patología* 2011. Doi 10.1016/j.patol.2011.11.005.

Hertog MG, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, Giampaoli S, Jansen A, Menotti A, Nedeljkovic S. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med.* 1995; 155(4):381-86.

Hertog MG, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr Cancer.* 1993;20(1):21-9.

Hirvonen T, Pietinen P, Virtanen M, Ovaskainen ML, Hakkinen S, Albanes D, Virtamo J. Intake of flavonols and flavones and risk of coronary heart disease in male smokers. *Epidemiology.* 2001; 12(1):62-67.

Huang S, Yang N, Liu Y, Gao J, Huang T, et al. Grape seed proanthocyanidins inhibit colon cancer-induced angiogenesis through suppressing the expression of VEGF and Ang1. *Int J Mol Med* 2012;30: 1410–1416.

Huang S, Yang N, Liu Y, Hu L, Zhao J, et al. () Grape seed proanthocyanidins inhibit angiogenesis via the downregulation of both vascular endothelial growth factor and angiopoietin signaling. *Nutr Res* 2012; 32: 530–536.

Huerta S, Goulet EJ, Livingston EH. Colon cancer and apoptosis. *Am JSurg*. 2006;191:517-26.

Kern M, Tjaden Z, Ngiewih Y, Puppel N, Will F, et al. Inhibitors of the epidermal growth factor receptor in apple juice extract. *Mol Nutr Food Res* 2005;49:317–328.

Jardine NJ. Phytochemicals and phenolics. En: *Chocolate and Cocoa Health and Nutrition*. Lan knight, 1999; 119-142.

Je Y, Liu W, Giovannucci E. Coffee consumption and risk of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Int J Cancer* 2009; 124: 1662-1668.

Jourdain C, Tenca G, Deguercy A, Troplin P, Poelman D. In-vitro effects of polyphenols from cocoa and beta-sitosterol on the growth of human prostate cancer and normal cells. *Eur J Cancer Prev*. 2006;15(4):353-61.

Johannot L, Somerset SM. Age-related variations in flavonoid intake and sources in the Australian population. *Public Health Nutr*. 2006;9(08): 1045-54.

Karim M, McCormick K, Kappagoda C. Effects of cocoa procyanidins on endothelium-dependent relaxation. *J Nutr* 2000; 130(S): 2105S-2108S.

Kawaii S, Yomono Y, Katase E, Ogawa K, Yano M. Antiproliferative activity of flavonoids on several cancer cell lines. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 1999, 63, 896-899.

Kenny TP, Keen CL, Jones P, Kung HJ, Schmitz HH, Gershwin ME. Pentameric procyanidins isolated from *Theobroma cacao* seeds selectively downregulate ErbB2 in human aortic endothelial cells. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2004;229(3):255-63.

Kim JS, Kim JC, Shim SH, Lee EJ, Jin W, Bae K, Son KH, Kim HP, Kang SS, Chang HW. Chemical constituents of the root of *Dystaenia takeshimana* and their anti-inflammatory activity. *Arch Pharm Res.* 2006; 29(8): 617-23.

Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ.* 1996; 312(7029):478-81.

Knekt P, Kumpulainen J, Jarvinen R, Rissanen H, Heliovaara M, Reunanen A, Hakulinen T, Aromaa A. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr.* 2002; 76(3): 560.

Kuhnau J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet.* 1976; 24: 117-19.

Kuntz S, Wenzel U, Daniel H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *Eur J Nutr.* 1999; 38(3): 133-42

Letenneur L, Proust-Lima, C, Le Gouge A, Dartigues JF, Barberger-Gateau P. Flavonoid intake and cognitive decline over a 10-year period. *Am J Epidemiol*. 2007; 165(12): 1364-71.

Lee WJ, Chen WK, Wang CJ, Lin WL, Tseng TH. Apigenin inhibits HGF-promoted invasive growth and metastasis involving blocking PI3K/Akt pathway and beta 4 integrin function in MDA-MB231 breast cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008; 226(2): 178-91.

Lee-Hilz YY, Boerboom AM, Westphal AH, Berkel WJ, Aarts JM, Rietjens IM. Pro-oxidant activity of flavonoids induces EpRE-mediated gene expression. *Chem Res Toxicol*. 2006;19:1499–505.

Levites Y, Weinreb O, Maor G, Youdim MBH, Mandel S. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate prevents N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced dopaminergic neurodegeneration. *J. Neurochem*. 2001, 78, 1073–1082.

Liang YC, Huang YT, Tsai SH, Lin-Shiau SY, Chen CF, Lin JK. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis*. 1999;20(10):1945-52.

Lindenmeyer F, Li H, Menashi S, Soria C, Lu H. Apigenin acts on the tumor cell invasion process and regulates protease production. *Nutr Cancer*. 2001;39(1):139-47.

Liu LZ, Fang J, Zhou Q, Hu X, Shi X, Jiang BH. Apigenin inhibits expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in human lung cancer cells:

implication of chemoprevention of lung cancer. *Mol Pharmacol* 2005; 68: 635–43.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004;79(5): 727-47.

Martín MA, Serrano AB, Ramos S, Pulido MI et al. Cocoa flavonoids up-regulate antioxidant enzyme activity via the ERK1/2 pathway to protect against oxidative stress-induced apoptosis in HepG2 cells. *J. Nutr. Biochem.* 2010, 21, 196–205.

Martínez C, Yáñez J, Vicente V, Alcaraz M, Benavente-García O, Castillo J, Lorente J, Lozano JA. Effects of several polyhydroxylated flavonoids on the growth of B16F10 melanoma and Melan-a melanocyte cell lines: influence of the sequential oxidation state of the flavonoid skeleton. *Melanoma Res.* 2003;13(1): 3-9.

Marshall JR, McCullough ML, Miller AB, Robien K, Rohan TE, Schatzkin A, Sieri S, Spiegelman D, Virtamo J, Wolk A, Willett WC, Zhang SM, Smith-Warner SA. Risk of colon cancer and coffee, tea, and sugar-sweetened soft drink intake: pooled analysis of prospective cohort studies. *J Natl Cancer Inst* 2010; 102: 771-783

Mathur S, Devaraj S, Grundy S, Jialal I. Cocoa products decrease low density lipoprotein oxidative susceptibility but do not affect biomarkers of inflammation in humans. *J Nutr* 2002; 132: 3663-3667.

McKay DL, Blumberg JB. A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). *Phytother Res.* 2006; 20(7): 519-30.

Meier P, Vousden KH. Lucifer's labyrinth—ten years of path finding in cell death. *Mol Cell*. 2007;28:746-54.

Miyake Y, Yamamoto K, Osawa T. Metabolism of antioxidant in lemon fruit (*Citrus limon* BURM. f.) by human intestinal bacteria. *J. Agric. Food Chem* 1997; 45:3738–3742.

Morabito N, Crisafulli A, Vergara C, Gaudio A, Lasco A, Frisina N, D'Anna R, Corrado F, Pizzoleo MA, Cincotta M, Altavilla D, Ientile R, Squadrito F. Effects of genistein and hormone replacement therapy on bone loss in early postmenopausal women: a randomized double-blind placebo-controlled study. *J Bone Miner Res*. 2002; 17(10): 1904-12.

Morillas JD, Casells A, Oriol I, Pastor A, Perez-Segura P, Echevarría JM. Alianza para la Prevención del Cáncer de Colon en España: un compromiso cívico con la sociedad. *Gastroenterología y Hepatología* 2012. Doi: 10.1016/j.gatrohep.2012.01.002.

Navarro S, Perez-Segura P, Ramón y Cajal S, Salazar R, García-Foncillas J, Musulesn E, García-Carbonero R, Payá A, García Alfonso P. Recomendación para la determinación de biomarcadores en el carcinoma colorrectal. Consenso Nacional de la Sociedad Española de Anatomía Patológica y de la Sociedad Española de Oncología Médica. *Revista española de patología* 2012. Doi 10.1016/j.patol.2012.05.001.

Ogata S, Miyake Y, Yamamoto K, Okumura K, Taguchi H. Apoptosis induced by the flavonoid from lemon fruit (*Citrus limon* BURM. f.) and its metabolites in HL-60 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 2000; 64: 1075-1078.

Ohno M, Sakamoto KQ, Ishizuka M, Fujita S. Crude cacao *Theobroma cacao* extract reduces mutagenicity induced by benzo[a]pyrene through inhibition of CYP1A activity in vitro. *Phytother Res.* 2009;23(8):1134-9.

O'Connell J, Bennett MW, Nally K, Houston A, O'Sullivan GC, Shanahan F. Altered mechanisms of apoptosis in colon cancer: Fas resistance and counterattack in the tumor-immune conflict. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;910:178-92.

O'Prey J, Brown J, Fleming J, Harrison PR. Effects of dietary flavonoids on major signal transduction pathways in human epithelial cells. *Biochem Pharmacol* 2003;66:2075–2088. [PubMed: 14609732]

Ortuño A, Arcas MC, Botía JM, Fuster MD, Del Río JA. Increasing resistance against *Phytophthora citrophthora* in tangüelo Nova fruits by modulating polymethoxyflavones levels. *J Agric Food Chem.* 2002; 50(10): 2836-39.

Ortuño A, Báidez A, Gómez P, Arcas MC, Porrás I, García-Lidón A, Río JAD. Citrus *paradisi* and *Citrus sinensis* flavonoids: Their influence in the defence mechanism against *Penicillium digitatum*. *Food Chem.* 2006; 98(2): 351-58.

Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Takizawa T, Terao J, Kondo K: Catechins and their oligomers linked by C4 --> C8 bonds are major cacao polyphenols and protect low-density lipoprotein from oxidation in vitro. *Exp Biol Med (Maywood)* 2002; 227(1): 51-56.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108 [PMID: 15761078].

Patel D, Shukla S, Gupta S. Apigenin and cancer chemoprevention: progress, potential and promise (review). *Int J Oncol.* 2007; 30(1):233-45.

Perea J, Lomas M, Hidalgo M. Bases moleculares del cáncer colorrectal: ¿Hacia un manejo individualizado? *Rev Esp Enferm Dig* 2011; 103: 29-35.

Ramljak D, Romanczyk LJ, Metheny-Barlow LJ, Thompson N, Knezevic V, Galperin M, Ramesh A, Dickson RB. Pentameric procyanidin from *Theobroma cacao* selectively inhibits growth of human breast cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 2005;4:537-546.

Ramos S. Cancer chemoprevention and chemotherapy: Dietary polyphenols and signalling pathways. *Mol. Nutr. Food Res* 2008; 52: 507–526.

Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, et al. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science.* 1997;275:967-9.

Ren W, Qian Z, Wang H, Zhu L, Zhang L. Flavonoids: Promising anticancer agents. *Medicinal Res Rev.* 2003; 23(4): 519–534.

Rein D, Lolito S, Holt RR, Keen CL, Schmitz HH, Fraga CG. Epicatechin in human plasma: in vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. *J Nutr* 2000; 130: 2109-14.

Rein D, Paglieroni T, Wun T. Cocoa inhibits platelet activation and function. *Am J Clin Nutr* 2000; 72, 30-35.

Rithidech KN, Tungjai M, Whorton EB. Protective effect of apigenin on radiation-induced chromosomal damage in human lymphocytes. *Mutat Res.* 2005a; 585(1-2): 96-104.

Rodríguez-Ramiro I, Ramos S, Bravo L, Goya L. et al. Procyanidin B2 and a cocoa polyphenolic extract inhibit acrylamide-induced apoptosis in human Caco-2 cells by preventing oxidative stress and activation of NK pathway. *J.Nutr. Biochem.* 2011, in press, DOI: 10.1016/j.jnutbio.2010.10.005.

Rodríguez J, Yáñez J, Vicente V, Alcaraz M, Benavente-García O, Castillo J, Lorente J, Lozano JA. Effects of several flavonoids on the growth of B16F10 and SK-MEL-1 melanoma cell lines: relationship between structure and activity. *Melanoma Res.* 2002;12(2): 99-107.

Ross JA, Kasum CM. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr.* 2002; 22: 19-34.

Rossi L, Mazzitelli S, Arciello M, Capo CR, Rotilio G. Benefits from dietary polyphenols for brain ageing and Alzheimer's disease. *Neurochem. Res.* 2008, 33, 2390–2400.

Rubin E, Gorstein F, Rubin R, Schwarting R, Strayer D. *Patología estructural y fundamentos clínico patológicos en Medicina.* 2006. Capítulo 13.

Sánchez-Campillo M, Gabaldón JA, Castillo J, Benavente-García O, Del Baño MJ, Alcaraz M, Vicente V, Álvarez N, Lozano JA. Rosmarinic acid, a photoprotective agent against UV and other ionizing radiations. *Food Chem Toxicol.* 2009; 47(2): 386-92.

Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2005; 45(4): 287-306.

Sequetto PL, Oliveira TT, Maldonado IR, Augusto LE, Mello VJ, Pizziolo VR, Almeida MR, Silva ME, Novaes RD. Naringin accelerates the regression of pre-neoplastic lesions and the colorectal structural reorganization in a murine model of chemical carcinogenesis. *Food Chem Toxicol* 2014; 64: 200–209

Shukla S, Gupta S. Apigenin: A promising molecule for cancer prevention. *NIH Pharm Res.* 2010; 27(6): 962–978. doi:10.1007/s11095-010-0089-7.

Siddique YH, Beg T, Afzal M. Antigenotoxic effect of apigenin against anticancerous drugs. *Toxicol In Vitro.* 2008; 22(3): 625-31.

Siddique YH, Afzal M. Antigenotoxic effect of apigenin against mitomycin C induced genotoxic damage in mice bone marrow cells. *Food Chem Toxicol.* 2009; 47(3): 536-39.

Somerset SM, Johannot L. Dietary flavonoid sources in Australian adults. *Nutr Cancer.* 2008; 60(4): 442-49.

Steinberg FM, Holt RR, Schmitz HH and Keen CL. Cocoa procyanidin chain length does not determine ability to protect LDL from oxidation when monomer units are controlled. *J Nutr Biochem* 2002;13:645-652.

Stevenson DE, Hurst RD. Polyphenolic phytochemicals: antioxidants or much more? *Cell Mol Life Sci.* 2007; 64(22): 2900-16.

Sun CL, Yuan JM, Koh WP, Lee HP, Yu MC. Green tea and black tea consumption in relation to colorectal cancer risk: the Singapore Chinese Health Study. *Carcinogenesis* 2007; 28:2143-2148.

Suzuki Y, Tsubono Y, Nakaya N, Koizumi Y, Suzuki Y, Shibuya D, Tsuji I. Green tea and the risk of colorectal cancer: pooled analysis of two prospective studies in Japan. *J Epidemiol* 2005; 15: 118-124.

Takahashi T, Kobori M, Shinmoto H, Tsushida T. Structure-activity relationships of flavonoids and the induction of granulocytic- or monocytic-differentiation in HL60 human myeloid leukemia cells. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1998; 62: 2199–2204.

Takagaki N, Sowa Y, Oki T, Nakanishi R, Yogosawa S, Sakai T. Apigenin induces cell cycle arrest and p21/WAF1 expression in a p53-independent pathway. *Int J Oncol* 2005;26:185–189. [PubMed:15586239]

Taylor LP, Grotewold E. Flavonoids as developmental regulators. *Curr Opin Plant Biol*. 2005; 8(3): 317-23.

Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Mol Cell Biol*. 2008;9:231-41.

Thiery-Vuillemin A, Nguyen T, Pivot X, Spano JP, Dufresne A, Soria JC. Molecularly targeted agents: Their promise as cancer chemopreventive interventions. *Eur J Cancer* 2005;41:2003–2015.

Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer* 2003;3:768–780.

U.S. Department of Agriculture: USDA database for the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of selected foods, release 2. Maryland: Beltsville Human Nutrition Research Center, 2010;

Usda, U. Database for the Flavonoid Content of Selected Foods. Release 2.1. US Department of Agriculture. 2007.

Van Dross R, Hong X, Essengue S, Fischer S, Pelling J. Modulation of UVB-induced and basal cyclooxygenase-2 (COX-2) expression by apigenin in mouse keratinocytes: role of USF transcription factors. *Mol Carcinog.* 2007; 46(4): 303-14.

Vanamala J, Leonardi T, Patil BS, Taddeo SS, Murphy ME, Pike LM, Chapkin RS, Lupton JR, Turner ND. Suppression of colon carcinogenesis by bioactive compounds in grapefruit. *Carcinogenesis* 2006; 27: 1257– 1265

Visioli F, Bernaert H, Cortie R, Ferri C et al. Chocolate, lifestyle, and health *Crit Rev Food Sci* 2009; 49: 299–312.

Vinson JA, Proch J, Bose P, Muchler S. et al. Chocolate is a powerful ex vivo and in vivo antioxidant, an anti-atherosclerotic agent in an animal model, and a significant contributor to antioxidants in the European and American diets. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 8071–8076.

Wan Y, Vinson J, Etherton T, Proch J, Lazarus S, Kris-Etherton P. Effects of cocoa powder and dark chocolate on LDL oxidative susceptibility and prostaglandin concentrations in humans. *J Am Clin Nutr* 2001; 74: 596-602.

Wang L, Lee IM, Zhang SM, Blumberg JB, Buring JE, Sesso HD. Dietary intake of selected flavonols, flavones, and flavonoid-rich foods and risk of cancer in middle-aged and older women. *Am J Clin Nutr*. 2009; 89(3): 905-12.

Wang W, Heideman L, Chung CS, Pelling JC, Koehler KJ, Birt DF. Cell-cycle arrest at G2/M and growth inhibition by apigenin in human colon carcinoma cell lines. *Mol Carcinog* 2000;28:102–110.

Wang W, VanAlstyne PC, Irons KA, Chen S, Stewart JW, Birt DF. Individual and interactive effects of apigenin analogs on G2/M cell-cycle arrest in human colon carcinoma cell lines. *Nutr Cancer* 2004;48:106–114.

Wang YH, Ge B, Yang XL, Zhai J, Yang LN, et al. Proanthocyanidins from grape seeds modulates the nuclear factor-kappa B signal transduction pathways in rats with TNBS-induced recurrent ulcerative colitis. *Int Immuno-pharmacol* 2011;11: 1620–1627.

Wang ZJ, Ohnaka K, Morita M, Toyomura K, Kono S, Ueki T, Tanaka M, Kakeji Y, Maehara Y, Okamura T, et al. Dietary polyphenols and colorectal cancer risk: The Fukuoka colorectal cancer study *World J Gastroenterol* 2013 May 7; 19(17): 2683-2690

Watson AJM. An overview of apoptosis and the prevention of colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2006;57:107-21.

Wei H, Tye L, Bresnick E, Birt DF. Inhibitory effect of apigenin, a plant flavonoid, on epidermal ornithine decarboxylase and skin tumor promotion in mice. *Cancer Res* 1990; 50: 499–502.

Willett W C. Dieta, nutrición y prevención del cancer. En: Nutrición en salud y enfermedad. 9ª ed. Mc Graw Hill, México, 2002; 2:1441-1452.

Wollgast J, Anklam E. Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and qualification. Food Res. 2000; 33:423-477.

Xu PX, Wang SW, Yu XL, Su YJ, Wang T, Zhou WW, Zhang H, Wang YJ, Liu RT. Rutin improves spatial memory in Alzheimer's disease transgenic mice by reducing A beta oligomer level and attenuating oxidative stress and neuroinflammation. Behav. Brain Res. 2014, 264, 173–180.

Yamamoto H, Gil J, Schwartz S Jr, Perucho M. Frameshift mutations in Fas, Apaf-1, and Bcl-10 in gastro-intestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. Cell Death Differ. 2000;7:238-9.

Yamori Y, Moriguchi EH, Teramoto T, Miura A, Fukui Y, Honda KI, Fukui M, Nara Y, Taira K, Moriguchi Y. Soybean isoflavones reduce postmenopausal bone resorption in female Japanese immigrants in Brazil: a ten-week study. J Am Coll Nutr. 2002; 21(6):560-63.

Yang M, Tanaka T, Hirose Y, Deguchi T, Mori H, Kawada Y. Chemopreventive effects of diosmin and hesperidin on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced urinary-bladder carcinogenesis in male ICR mice. Int J Cancer. 1997; 73(5): 719-24.

Yang CS, Landau JM, Huang MT, Newmark HL. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. Annu Rev Nutr 2001;21:381–406.

Yang G, Zheng W, Xiang YB, Gao J, Li HL, Zhang X, Gao YT, Shu XO. Green tea consumption and colorectal cancer risk: a report from the Shanghai Men's Health Study. *Carcinogenesis* 2011; 32: 1684-1688

Yang G, Shu XO, Li H, Chow WH, Ji BT, Zhang X, Gao YT, Zheng W. Prospective cohort study of green tea consumption and colorectal cancer risk in women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16: 1219-1223

Yano S, Umeda D, Yamashita T, Ninomiya Y, Sumida M, Fujimura Y, Yamada K, Tachibana H. Dietary flavones suppresses IgE and Th2 cytokines in OVA-immunized BALB/c mice. *Eur J Nutr*. 2007;46(5): 257-63.

Yañez J, Vicente V, Alcaraz M, Castillo J, Benavente-García O, Canteras M, Teruel JA. Cytotoxicity and antiproliferative activities of several phenolic compounds against three melanocytes cell lines: Relationship between structure and activity. *Nutr Cancer*. 2004;49 (2):191-9.

Yin F, Giuliano AE, Van Herle AJ. Growth inhibitory effects of flavonoids in human thyroid cancer cell lines. *Thyroid* 1999; 9: 369–376.

Yin F, Giuliano AE, Law RE, Van Herle AJ. Apigenin inhibits growth and induces G2-M arrest by modulating cyclin-CDK regulators and ERK MAP kinase activation in breast carcinoma cells. *Anticancer Res* 2001; 21: 413–20.

Yoon H, Kim TW, Shin SY, Park MJ, Yong Y, Kim DW, Islam T, Lee YH, Jung K, Lim Y. Design, synthesis and inhibitory activities of naringenin derivatives on human colon cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 23 (2013) 232–238.

Zamorano-Ponce E, Fernández J, Vargas G, Rivera P, Carballo MA. Protective activity of cedron (*Aloysia triphylla*) infusion over genetic damage induced by cisplatin evaluated by the comet assay technique. *Toxicol Lett.* 2004;30;152(1):85-90.

Zheng PW. et al. Apigenin induced apoptosis through p53- dependent pathway in human cervical carcinoma cells. *Life Sci* 2005; 76: 1367–1379.

Zhu M, Fahl WE. Functional characterization of transcription regulators that interact with the electrophile response element. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;23;289(1):212–9.