

**Caracterización de polifenoles de cereza
(*Prunus avium*) y su efecto en el crecimiento
tumoral de cáncer de mama (MDA-MB453)
in vivo.**

Andrea Lucia Urrutia Girón

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras
Noviembre, 2018**

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

**Caracterización de polifenoles de cereza
(*Prunus avium*) y su efecto en el crecimiento
tumoral de cáncer de mama (MDA-MB453)
in vivo.**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniera en Agroindustria Alimentaria en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Andrea Lucia Urrutia Girón

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2018

Caracterización de los polifenoles de cereza (*Prunus avium*) y su efecto en el crecimiento tumoral de cáncer de mama (MDA-MB453) *in vivo*

Andrea Lucia Urrutia Girón

Resumen. Las cerezas contienen metabolitos secundarios llamados polifenoles que se han asociado con beneficios para la salud. Los objetivos de este estudio fueron identificar los polifenoles más abundantes de cereza y evaluar su actividad inhibidora en el crecimiento tumoral de cáncer de mama (HER2+) en ratones atímicos desnudos xenoinjertados. Se utilizó un diseño de Bloques Completos al Azar con arreglo factorial de tratamientos (2×4). Se utilizó la separación de fase sólida para obtener ácidos fenólicos (F1), antocianinas (F2), flavonoles (F3), procianadinas (F4) y extracto completo (EC) de cereza, utilizando F2, F4 y EC para el experimento *in vivo*. Se cuantificaron las dosis para los animales con los métodos de Folin-Ciocalteu y diferencial de Ph. Para la identificación de fenoles se utilizó cromatografía y espectrofotometría (HPLC-MS/MS). Los animales sujetos a la investigación recibieron 150 mg/kg/día de las fracciones evaluadas durante 36 días. Se identificaron 38 polifenoles, incluyendo ácidos clorogénicos conjugados con ácido quínico, cianidina-3-rutinosido, cianidina-3-glucósido, catequina, epicatequina, entre los más abundantes. Se evidenció actividad inhibidora por la presencia de polifenoles siendo F2 la fracción que presentó mayor efectividad F2>F4>EC (45, 38 y 37%, respectivamente). No se observó ningún tipo de toxicidad para los animales xenoinjertados como no xenoinjertados; debido a que el crecimiento de sus órganos se distribuyó de manera normal en todos los tratamientos evaluados. Se recomienda seguir el estudio evaluando la capacidad antimetastásica de polifenoles de cereza.

Palabras clave: Enfermedad crónica, fitoquímicos, factor de crecimiento epidérmico.

Abstract. Cherries have among their compounds secondary metabolites called polyphenols that have been associated with health benefits. The objectives of this study were to identify the most abundant polyphenols in cherries and evaluate their inhibitory activity in breast cancer tumor growth (HER2+) in xenografted athimic nude mice. A Completely Randomized Blocks design was used with factorial treatment arrangement (2×4). Solid Phase extraction was used to obtain phenolic acids (F1), anthocyanins (F2), flavonols (F3), proanthocyanidins (F4) and whole extract (WE) of cherry, using F2, F4 and WE for the *in vivo* experiment. Animal doses were quantified by the Folin-Ciocalteu and pH differential methods. Polyphenol identification was conducted by HPLC-MS/MS. Animals subjected to the investigation received 150 mg/kg/day of WE, F2 or F4 during 36 days and tumor growth and body weight measurements were taken every three days. A total of 38 polyphenols were identified, including chlorogenic acids bound to quinic acid, cyanidin-3-rutinoside, cyanidin-3-glucoside, catechin, epicatechin among the most abundant. Inhibitory activity of polyphenols was observed with F2 showing the most efficacy F2>F4>EC (45, 38 and 37%, respectively). No toxicity was observed for animals evaluated (xenografted as non-xenografted); because organs growth was normally distributed in all the treatments. It is recommended to continue antimetastatic evaluation of cherry polyphenols in future studies.

Key words: Chronic disease, epidermal growth factor, phytochemicals.

CONTENIDO

| | |
|---|-----------|
| Portadilla..... | i |
| Página de firmas | ii |
| Resumen | iii |
| Contenido..... | iv |
| Índice de Cuadros, Figuras y Anexos | v |
| | |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 2. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 3 |
| 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 10 |
| 4. CONCLUSIONES..... | 26 |
| 5. RECOMENDACIONES | 27 |
| 6. LITERATURA CITADA..... | 28 |
| 7. ANEXOS | 33 |

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

| Cuadros | Página |
|---|--------|
| 1. Diseño experimental de los tratamientos Completamente al Azar..... | 9 |
| 2. Compuestos abundantes identificados en la fracción uno..... | 14 |
| 3. Antocianinas abundantes identificadas en fracción dos..... | 17 |
| 4. Flavonoles abundantes identificados en la fracción tres..... | 19 |
| 5. Procianadinas abundantes identificadas en la fracción cuatro..... | 21 |
| 6. Peso final de los animales y los órganos al momento de la eutanasia..... | 23 |

| Figuras | Página |
|---|--------|
| 1. Diseño experimental <i>in vivo</i> | 9 |
| 2. Cromatograma de extracto completo, (a) dilución en agua y (b) dilución en Etac | 11 |
| 3. Estructura química Acido quínico..... | 12 |
| 4. Estructura química del ácido benzoico (A) y del ácido cinámico (B)..... | 12 |
| 5. Cromatograma de ácidos fenólicos identificados en cereza..... | 13 |
| 6. Vía biosintética para compuestos de las plantas..... | 14 |
| 7. Estructura química de las antocianinas (F2)..... | 15 |
| 8. Cromatograma de antocianinas identificadas en cereza..... | 16 |
| 9. Estructura química de las antocianinas más comunes..... | 17 |
| 10. Estructura química de los flavonoles..... | 18 |
| 11. Cromatograma de flavonoles identificados en cereza..... | 18 |
| 12. Estructura química de quercetina..... | 19 |
| 13. Estructura química básica de las procianadinas..... | 20 |
| 14. Cromatograma de procianadinas (F4) en cereza..... | 20 |
| 15. Peso corporal de los animales no mostraron diferencia estadísticamente significativa..... | 22 |
| 16. Crecimiento tumoral desde el inicio del tratamiento hasta el día 36..... | 24 |

| Anexos | Página |
|--|--------|
| 1. Alimentación de los ratones con F2, F4 o EC por medio de sonda..... | 33 |
| 2. Crecimiento tumoral del grupo control..... | 34 |
| 3. Crecimiento tumoral de F4..... | 34 |

1. INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la Sociedad Americana del Cáncer para el año 2018, se estiman alrededor de 266,120 nuevos casos de cáncer invasivo en mujeres, cerca de 63,960 nuevos casos de carcinoma *in situ* (CIS), (el CIS no es invasivo y es la forma más temprana de cáncer de seno) y alrededor de 40,920 mujeres morirán a causa de esta enfermedad en Estados Unidos. En general, el cáncer de mama puede ser extirpado quirúrgicamente cuando es detectado suficientemente temprano. Desafortunadamente, este es diagnosticado cuando las células tumorales han alcanzado una etapa avanzada; causando ~ 90% de las muertes (Breastcancer.org 2013).

El cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolado de células. Puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo. El tumor suele invadir el tejido circundante y puede provocar metástasis en puntos distantes del organismo (OMS 2018). Esto es debido a que las células presentan su anormalidad en el ADN que forma los genes que contienen los cromosomas en el núcleo de la célula (SEOM 2014). El cáncer de seno (o cáncer de mama) se origina cuando los genes de las células sufren un trauma y obliga a las mismas células a emitir señales erróneas en las cuales ordena la multiplicación celular.(OMS 2018) El tumor que se forma es maligno (cáncer) si las células pueden crecer penetrando (invadiendo) los tejidos circundantes o propagándose (metástasis) en áreas distantes del cuerpo (ACS 2017).

El cáncer de mama se divide en cuatro diferentes subtipos clínicos de acuerdo con la identificación histológica de cuatro marcadores que son: *Luminal A*, *Luminal B*, *Receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico 2 positivo (HER2 +)* y *Triple Negativo (TN)* (Breastcancer.org 2013). *Luminal A* es el más frecuente correspondiente al 67% de los tumores, este posee una alta expresión de genes relacionados con los receptores hormonales y baja expresión de genes relacionados con la proliferación celular; mientras que el *Luminal B* presenta niveles menores de receptores de estrógeno y altos niveles de proliferación celular (Imigo *et al.* 2011).

El *Receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico 2 positivo (HER2 +)* donde las proteínas HER2 son receptores en las células mamarias, ayudan a controlar la manera en que una célula mamaria sana crece, se divide y se repara a sí misma (Ferlay *et al.* 2015). Sin embargo, en el 25% de los casos de cáncer de mama, el gen *HER2* no funciona correctamente y hace muchas copias de sí mismo (esto se conoce como amplificación del gen *HER2*), y todos estos genes *HER2* extra les indican a las células mamarias que produzcan demasiados receptores HER2 (sobreexpresión de la proteína HER2); por esta razón las células mamarias crecen y se dividen de manera incontrolable (Breastcancer.org 2013).

El Cáncer Triple Negativo es el resultado de análisis que demuestran que las células cancerígenas de la mama resultaron negativas para receptores de estrógeno (ER-), para receptores de progesterona (PR-) y para HER2 (HER2-) (Guzmán 2010).

Actualmente, no es posible saber con exactitud por qué una persona padece cáncer (NIH 2015). Se ha indicado que ciertos factores como herencia de genes, radiación, dieta, hormonas, obesidad, productos químicos, intoxicaciones y los hábitos no saludables pueden también aumentar la probabilidad de padecer cáncer (Chávez 2015; Instituto Nacional del Cáncer 2015). En general, un promedio del 35% de muertes está asociado con factores nutricionales (Blot y Tarone 2015) entre los cuales se puede mencionar la obesidad, que se ha convertido en una epidemia en los Estados Unidos y un problema de salud creciente alrededor del mundo. Esta enfermedad se ha relacionado con un mayor riesgo de cáncer de mama posmenopáusico y un pronóstico precario en mujeres diagnosticadas en etapa inicial (Huang *et al.* 1997).

Las cerezas se han caracterizado por mostrar inhibición de la ciclooxigenasa, actividad antineurodegenerativa, potencial antiinflamatorio y la inhibición de la proliferación celular del cáncer de colon en humano (Chavez *et al.* 2010). Tomando en cuenta su composición fitoquímica, las cerezas son conocidas por su alto nivel de fenoles antioxidantes y en particular, por las antocianinas y procianidinas, ambas categorías de compuestos han sido asociadas con efectos en la salud, aparte de su actividad antioxidante (Blando *et al.* 2004).

Las antocianinas constituyen el grupo más grande de pigmentos naturales solubles en agua provenientes de frutas y verduras (He y Giusti 2010) y existen más de 635 antocianinas identificadas (Wallace 2015). Las antocianinas de cerezas han demostrado una fuerte capacidad antiinflamatoria y antioxidante (Blando *et al.* 2004).

Las procianidinas representan oligómeros o polímeros de unidades flavonoides-3-ol. Experimentos *in vivo* e *in vitro* han demostrado que estas incrementan la síntesis de óxido nítrico, estimular la producción de citocinas antiinflamatorias, e inhibir la producción de cierto tipo de citocinas proinflamatoria (Esra *et al.* 2010).

La finalidad de este estudio es poder ayudar al elevado número de mujeres que tienen un gran riesgo de padecer o ser diagnosticadas con cáncer de mama y poder buscar agentes activos y naturales que ayuden a prevenir o retrasar este tipo de cáncer.

Objetivos del estudio:

- Identificar los compuestos fenólicos presentes en cereza (*Prunus avium*) y separarlos de acuerdo a su solubilidad en diferentes solventes.
- Evaluar la actividad inhibidora de crecimiento tumoral, de los compuestos fenólicos en ratones atímicos desnudos xenoinjertados.
- Determinar la toxicidad de los compuestos fenólicos en ratones atímicos desnudos no xenoinjertados.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del estudio.

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de fitoquímicos del centro de Investigación de Frutas y Vegetales del Departamento de Nutrición y Ciencia de los Alimentos y la parte *In vivo* en el edificio del Programa de Medicina Comparativa(CMP) en la Universidad de Texas A&M, College Station, Texas, Estados Unidos

Materia prima.

El jugo de cereza concentrado utilizado fue provisto por FruitSmart, Inc. (Grandview WA), el cual tenía las especificaciones, (68 °Brix, acidez (1.5-3.2) color visible en el espectrofotómetro a 520 nm y el radio de color a 520/430 nm, 7.0 y 1.5 mínimo, respectivamente).

Extracción de polifenoles mediante separación de fase sólida.

Los polifenoles se dividieron en cuatro fracciones diferentes: F1-Fenoles sin consolidar, F2-Antocianinas, F3-Flavonoles, F4-Procianadinas y el Extracto Completo(EC). Al empezar la extracción de polifenoles se utilizó jugo de cereza concentrado que se preservó en el refrigerador a 4 °C, éste se trasladó a tubos Falcon de 50ml y se realizó una dilución de 30 ml de jugo de cereza concentrado con 30 ml de agua Nanopura.

Los cartuchos C18 (Waters®) se utilizan para separar compuestos por su polaridad debido a que consisten en una fase unida a una base de sílice con fuerte hidrofobicidad; utilizada para absorber analitos incluso de hidrofobicidad débil a partir de soluciones acuosas; comportamiento similar a las columnas de HPLC de fase inversa. Al realizar la extracción se colocaron dos cartuchos C18 de 20 cc en la cámara de vacío, y se abrieron solo los espacios en los que colocó los cartuchos; para activar las columnas. Se realizaron tres lavados de 10 ml con 100% Metanol (MeOH), y después tres lavados de 10 ml con agua nanopura. Cada cartucho tiene la capacidad de carga de 20 ml de jugo de cereza diluido y la presión se ajustó a no más de 200 mg Hg porque las gotas deben pasar lo más lento posible.

Los compuestos fenólicos de interés se quedarón atrapados en el cartucho, y se realizaron lavados con agua nanopura (50 ml) para remover los azucres y compuestos fenólicos que no son de interés. Para la recolección del extracto completo se utilizó MeOH (100%) (50 ml). Seguidamente se evaporó a 60 psi y 45 °C usando el Rotavapor (BÜCHI, Suiza), para remover todo residuo de MeOH y poder utilizarlo para los experimentos *in vivo*. Para la obtención del resto de fracciones el extracto completo se debe ajustar a pH 7. Los cartuchos se activaron de la misma manera, para equilibrarlos se utilizó agua nanopura pH 7.

Se utilizó un máximo (20 ml) de extracto completo en cada cartucho y se dividieron en Cartuchos 1 y 2 de acuerdo a lo que se necesitaba. Se realizaron lavados con agua nanopura (50 ml) pH7 para obtener los fenoles sin consolidar, se recolectaron y se ajustaron a pH 2.

La fracción uno se obtuvo ajustando el cartucho #1 el cual se activó con MeOH (100%) y se equilibró mediante el uso de H₂O pH 2, los compuestos fenólicos ajustados pH 2, se cargaron en el cartucho máximo (20 ml) se ajustó la presión a no más de 200mg Hg, se recolectaron con el uso de MeOH (100%). Se evaporó en el Rotavapor en las mismas condiciones que para el extracto completo y adicionalmente se utilizó la cámara de secado al vacío y se refrigeró a -20 °C para su uso posterior en el HPLC-MS/MS.

El cartucho #2 que contiene la fracción dos se equilibró con agua nanopura (50 ml) pH 2, y para diluir se utilizó acetona (16%) ajustada a pH 2 (30 ml), pero para obtener solo lo más concentrado de las mismas los primeros 10 ml se dejaron pasar y luego se recolectan los siguientes 10 ml. Debido a que se presentaron problemas con residuos de acetona en la fracción dos se realizó un paso más para la purificación de las mismas, para lo cual, se ajustó un nuevo cartucho con MeOH (30 ml) y agua nanopura (30 ml), se cargó el cartucho con máximo (20 ml) de F2, y se utilizó agua nanopura pH 7 (50 ml) para el lavado de la acetona y un secado completo, seguido de esto para diluir se utilizó MeOH (100%), se evaporó en el Rotavapor a 60 psi y 45 °C y se re suspendió con agua pH 3.5 para mantener la concentración de las mismas estable.

En el cartucho #2 se realizó un lavado de toda la acetona residual mediante el uso de agua nanopura pH2 hasta obtener gotas sin color y se realizó la recolección de la fracción tres. Para la cual se utilizó Etil Acetato (100%) (30 ml). Esta fracción se evaporó en el rotavapor bajo 61 psi y 45 °C donde se pueden obtener las antocianinas residuales de la fracción dos. Las cuales se separaron de los flavonoles, y la F3 se lleva a la cámara de secado al vacío 60 °C hasta secar completamente y se refrigeró a -20 °C para su utilización en el HPLC-MS/MS. Seguidamente al obtener la F3, se procedió a obtener la F4 para la cual se utilizó MeOH pH 3.4 (30 ml), se evaporó en el Rotavapor bajo presión 45 °C y se re suspendió con agua pH 3.5.

La fracción uno se debía de separar del resto de antocianinas por lo que luego de que se evaporó, se utilizaron de acuerdo al volumen de fracción uno que se obtuvo, se usó el mismo volumen de etil acetato y se colocó en una bureta donde las antocianinas permanecieron en la fase móvil y la F1 en la fase acuosa, y se recolectaron en un vaso de precipitado este paso se pudo llevar a cabo hasta tres veces.

La fracción uno se colocó nuevamente en el rotavapor y la fracción dos que se obtuvo también se llevó al Rotovapor y la F1 se llevó a la cámara de secado al vacío para poder secar completamente y se conservó en el refrigerador a una temperatura de -20 °C. (Oszmianski *et al.* 1988).

Identificación de compuestos fenólicos más abundantes en el extracto completo y fracciones mediante el uso de HPLC-MS/MS (Cromatografía líquida con espectro de masas).

Para poder realizar el análisis en el HPLC-MS/MS fue necesario realizar un fraccionamiento más debido a que se buscaba extracto y fracciones frescas. Seguidamente se realizó una cuantificación de ácidos fenólicos y flavonoles con el uso del Método Folin-Ciocalteu, para antocianinas con el método diferencial de pH y para procianadinas con el uso del espectrofotómetro. Se realizó un ajuste en las concentraciones para llevarlas todas a la misma concentración y que fueran homogéneas, siendo dicha concentración de 0.6 mg/ml.

Las fracciones F1, F2, F3 y F4 se evaporaron y posteriormente se llevaron a la cámara de secado al vacío para secar por completo, dichas fracciones se re suspendieron con 20% MeOH. En cuanto al EC, se hizo una separación fase etil acetato y fase acuosa. La fase de etil acetato se llevó a la cámara de secado al vacío, se re suspendió en 20% MeOH, se cuantificaron los polifenoles con el Método Folin-Ciocalteu y se inyectó en el HPLC-MS/MS.

Las condiciones para la lectura de las muestras fueron las mismas para todo el estudio. Las condiciones iniciales del equipo y con una inyección de 400 µL por minuto, consistió en un 100% de la fase móvil A, la cual era agua con 0.1% ácido fórmico, y 0% de la fase móvil D que era 0.1% ácido fórmico en metanol. Dadas las condiciones iniciales se procedió a la lectura de las muestras, inyectando estas condiciones durante 3min, seguidamente la fase A se redujo a 90% y la fase D aumento a 10% por 20 min. Después la fase A paso a 70% y la fase D a 30% pasados 40 min, seguidamente ambas alcanzaron 50% de concentración durante 55 min, después la fase A llego a 30% y la fase D a 70% para alcanzar 65 min y volver a las condiciones iniciales. Para dar paso a la lectura de la siguiente muestra. Las presiones en el equipo se lograron debido a una bomba de gas nitrógeno conectada al equipo (Krenek *et al.* 2014).

Cuantificación de Polifenoles por el Método Reactivo Folin-Ciocalteu.

El ensayo Folin-Ciocalteu se utilizó para realizar la medida del contenido en compuestos fenólicos totales en productos vegetales. Este método se fundamenta en el carácter reductor de los polifenoles. El conjunto de los compuestos polifenólicos se oxidan por el reactivo Folin-Ciocalteu (mezcla de ácido fosfotúngstico y fosfomolibdico), dando una coloración azul directamente proporcional al contenido de polifenoles la cual es medible a 725 nm (García *et al.* 2015).

Para utilizar el método y saber la concentración de nuestros polifenoles se realizó una curva estándar en la cual se utilizó el ácido gálico debido a que es una sustancia pura y estable, donde las concentraciones a utilizar fueron de 0.2 mg/ml, 0.15 mg/ml, 0.10 mg/ml, 0.075 mg/ml y 0.050 mg/ml. Los resultados de esta curva estándar se utilizaron para saber la concentración de extracto completo (EC) debido a que no es tan preciso para antocianinas (F2) y procianadinas (F4).

Con base a la cantidad de muestras que se analizaron se tuvo que hacer diferentes diluciones. Para el extracto completo se utilizaron principalmente como factor de dilución 100 y 200, seguidamente se deben de agregar 10 μ L de nuestra muestra diluida/ ácido gálico y 10 μ L del reactivo Folin-Ciocalteu, los cuales se realizaron en duplicado en tubos eppendorf para PCR y luego se añadieron 80 μ L de Carbonato de Sodio (5% w/v), y se colocó en el vórtex seguidamente.

El equipo Mastercycle Eppendorf se programó 10 min a 40 °C y 2 min a 4 °C, al momento de finalizar el ciclo, se tomaron 80 μ L de cada muestra y se transfirió a un plato de 96 pozos. Se identificó en que columnas y filas se colocó cada muestra y en cuales el patrón de ácido gálico, este plato se llevó al espectrofotómetro (FLUOstar Omega Lector de Plato) y se utilizó una absorbancia de 740 nm (Abderrahim *et al.* 2011).

Esta cuantificación se realizó antes de empezar a tratar los animales para poder determinar la dosis que se les suministraría y así también dos semanas y cuatro semanas después de iniciar el tratamiento para verificar si la concentración permanecía constante (100 mg/ml AGE).

Cuantificación de Antocianinas por el método diferencial de pH.

Los pigmentos antocianinas pueden ser sujetos a transformaciones estructurales reversibles cuando hay cambios en el pH siendo completamente diferentes al espectro de absorbancia. La forma de oxonio coloreado es predominante a pH 1 y la forma hemiketa incoloro a pH 4.5. El método diferencial de pH se basa en esta reacción, y permite medidas rápidas y precisas del total de antocianinas, incluso en presencia de polímeros degradados, otros pigmentos y algún otro componente que interfiera (Giusti y Wrolstad 2001).

Para este método se preparó solución de buffer cloruro de potasio (0.025M), pH 1 y buffer de acetato de sodio (0.4M) pH 4.5. Se realizaron diluciones de las muestras siendo principalmente 50 y 100 \times . Después de esto, se preparó 1 ml de muestra con pH 1 y 4.5 para utilizar en la cubeta del espectrofotómetro, se esperaron 15 min para equilibrar la muestra. Para dicha absorbancia se realizó un escáner en espectrofotómetro (FLUOstar Omega Lector de Plato) para identificar el rango de absorbancia en el que las antocianinas presentaban mejores resultados y poder utilizarlo en el espectrofotómetro (Thermo electron corporation, Helios Y).

Después de realizar el escáner, se determinó utilizar la absorbancia de 510 y 700 nm esto también tomando como referencia la antocianina Cyanidin-3rutinoside porque esta es la más abundante y su punto de mayor absorbancia es 510 nm (Giusti y Wrolstad 2001).

Para las antocianinas se utilizaron los resultados de ambas absorbancias en el espectrofotómetro, donde para calcular la absorbancia de la muestra diluida se utilizó la ecuación 1.

$$A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH1}} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH 4.5}} \quad [1]$$

Y para calcular la concentración del pigmento se utilizó la ecuación 2.

$$B = (A \times \text{Peso Molecular} \times \text{Factor de dilución} \times 1000) \quad [2]$$

Para poder determinar la cantidad de Cyanidin-3-rutinoside que se encontraba en la muestra se utilizó la ecuación 3.

$$\text{mgCyanidin-3-rutinoside} = (A \times (287 + 326.2) \times \text{Factor de dilución} \times 1000) / (7000 \times 0.2525) \quad [3]$$

donde la suma de 287+326.2 corresponde al valor de Cyanidin-rutinoside.

El numero 7000 corresponde a la absorción molecular de Cyanidin-3-rutinoside y el numero 0.2525 fue el ajuste que se realizó para obtener los datos de acuerdo al volumen en el espectrofotómetro y la dosis en ml=mg/ml de Cyanidin-3-rutinoside×1000/mgCyanidin-3-rutinoside/L, con una dosis constante de 100mg Cianidina-3-rutinosida Eq/l.

Cuantificación de Procianadinas con el método para determinar polímeros no extraíbles.

Para este procedimiento se utilizaron diferentes factores de dilución de la muestra de procianadinas, utilizando principalmente un factor de 50, 100 y 200X, seguidamente se completó 1 ml con agua nanopura para utilizarlo en la cubeta del espectrofotómetro (Thermo electron corporation, Helios Y). Se utilizaron las absorbancias de 450 y 555 nm, debido a que se tomó como referencia que estas absorbancias son las máximas para compuestos de antocianinas y xanthylum (Zurita *et al.* 2012).

Experimento *in vivo*.

El uso de ratones atímicos deficientes de sistema inmunológico que son utilizados para trasplantar tumores, han provisto importantes valores en modelos *in vivo* para estudiar tumores humanos y para probar agentes anticancerígenos. Ratones atímicos femeninos de

3-5 semanas de vida fueron obtenidos (ENVIGO, Houston, TX), y fueron divididos en tres grupos.

Se esperó alrededor de una semana para que los mismos se aclimataran a sus nuevas condiciones donde tenían temperatura, humedad y corriente de aire controlada, así mismo comida y agua irradiada *at libitum*.

Se acondicionaron las células y se llevaron al lugar donde se utilizó matrigel (BDA, California, Estados Unidos). Para esto se tomó un plato de cultivo que tuviera una confluencia de 80-90%, se re suspendió en tubos de ensayo con 1 ml, se transfirieron 500 μL a otro tubo de ensayo y estos se centrifugaron a 1500 rpm durante 2 minutos, seguidamente las células fueron re suspendidas con 250 μL de matrigel, todas las agujas, jeringas, células y tips se trasladaron en hielo (Mertens *et al.* 2003). Los animales fueron inyectados de manera subcutánea en el flanco de las patas derechas e izquierda con células cancerígenas humanas MD-MB453 (1×10^6 células cancerígenas).

Cuando el tumor alcanzó un tamaño de $\sim 100 \text{ mm}^3$ se inició el tratamiento con extracto completo (EC), antocianinas (F2) y procianadinas (F4); a los ratones se le dieron diferentes dosis de acuerdo a la cuantificación de polifenoles en las mimas. Para esto se utilizó la alimentación por sonda todos los días durante 36 días y cada tres días se tomaron medidas del tamaño del tumor con el uso de un pie de rey eléctrico calibrado y del peso corporal de los animales con una balanza analítica calibrada.

Al momento en que todos los animales alcanzaron 36 días en tratamiento, se procedió a la eutanasia para lo cual se utilizó CO_2 para que estuvieran inconscientes y en seguida se realizó dislocación cervical, para su muerte. Después de esto se recolectaron los tumores, los pulmones, el corazón, el bazo y los riñones que se conservaron en nitrógeno líquido a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

Diseño experimental.

La investigación se realizó usando un diseño de Bloque Completos al Azar con arreglo factorial de tratamientos (2×4), en el cual, el primer factor fue la presencia o ausencia de tumores cancerígenos en los ratones atímicos desnudos (*Deficientes de Sistema Inmunológico*) y el segundo factor cuatro tratamientos (Agua, Antocianinas, Procianadinas y Extracto Completo) (Figura 1). Adicionalmente, cada tratamiento con extracto tuvo un grupo control negativo para evaluar la toxicidad del extracto o fracciones (Cuadro 1).

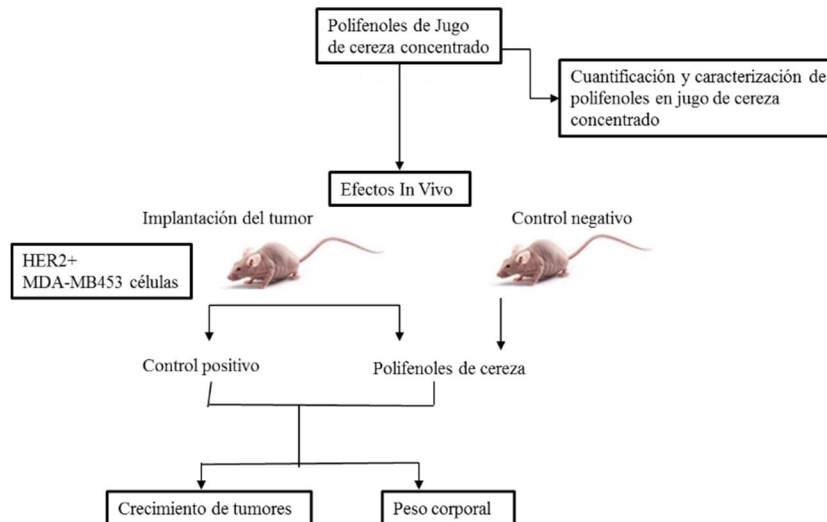


Figura 1. Diseño experimental *in vivo*.

Cuadro 1. Diseño experimental de Bloques Completos al Azar.

| Tratamiento | Presencia de Tumor | Ausencia de Tumor |
|------------------------|--------------------|-------------------|
| Antocianinas (F2) | TRT1 | TRT2 |
| Procianadinas (F4) | TRT3 | TRT4 |
| Extracto Completo (EC) | TRT5 | TRT6 |

*TRT= Tratamiento

Se realizaron seis repeticiones para cada tratamiento y se contó con un control positivo el cual recibió agua (n=6) y un control negativo (n=6) para evaluar toxicidad de los tres tratamientos, el experimento se realizó durante 36 días. El análisis estadístico se realizó usando SAS® versión 9.4 con un diseño de Bloques Completamente al Azar con una separación de medias TUKEY y un nivel de significancia de $p < 0.01$.

El análisis estadístico de normalidad se realizó con ANOVA de una vía y el test Shapiro-Wilk cuando los datos se distribuyeron normalmente y pasaron la prueba de varianza igual con un valor $p > 0.05$; de lo contrario, los datos se analizaron con la prueba de Kruskal-Wallis (SigmaPlot versión 13)- (PhD.Giuliana Noratto) Laboratorio Texas A&M.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de los compuestos fenólicos más abundantes.

Debido a que era necesario conocer los compuestos fenólicos que estaban presentes en las diferentes fracciones que se utilizaron como tratamiento en los animales, se realizó un análisis químico con el uso de HPLC-MS/MS. La espectrometría de masas se basa en la medida directa de la relación de la masa con el número de cargas elementales positivas o negativas de los iones (mz) en la fase gaseosa obtenida de la sustancia a analizar (Serrano *et al.* 2006).

Esta relación se expresa en unidades de masa atómica (u), (1u = la doceava parte de la masa de un átomo de carbono 12) o en daltons (1 Da = a la masa del átomo de hidrógeno) la espectrometría de masas tandem (MS-MS), la cual tiene la ventaja de lograr dos separaciones de los componentes de la muestra, siendo ambas separaciones iónicas; debido a esta especificidad, esta técnica es usada para lograr análisis cuantitativos de analitos en mezclas simples en cuestión de minutos sin necesidad de una separación cromatográfica u otro tratamiento químico que elimine interferentes (Jiménez *et al.* 2009).

Debido a que los polifenoles químicamente son compuestos con características estructurales diferentes, son un grupo de productos naturales muy diverso (Tsao 2010). Los resultados de este estudio también concuerdan con los presentados por Martini y colaboradores (2017) que realizaron la técnica de HPLC-MS/MS para caracterizar más de seis tipos de cerezas (Martini *et al.* 2017).

En este estudio se utilizó solamente el extracto completo (EC) y se encontraron compuestos fenólicos que en la muestra de EC de Martini y colaboradores se encontraron como ácido Cafeolquinico, cido Comairloquinico entre otros los cuales presentan enlaces con hidrógenos en gran cantidad como el de Cianidina-3,5-diglucosida que está formado por 15 hidrógenos receptores y 11 hidrógenos que pueden ser donados a otros compuestos esto otorga la solubilidad que permite que puedan ser arrastrados por el MeOH al momento de pasar por la columna C18 (Pubchem 2009).

Las diversas estructuras químicas de los compuestos fenólicos que van desde las formas simples hasta las polimerizadas determina cambios en su solubilidad en los diferentes solventes (Neha *et al.* 2014). Por esta razón en parte del estudio se utilizaron dos diferentes solventes para la lectura en el HPLC-MS/MS, agua y etil acetato (etac) para identificar el comportamiento de los compuestos más afines al agua y los que presentan mayor afinidad por otros solventes orgánicos. Con esto se determinó que la mayoría de ácidos fenólicos presentaron mayor afinidad con Etac (Figura 2a) porque el cromatograma permite observar claramente mayor cantidad de picos mientras que en el agua es una cantidad reducida de picos para la identificación (Figura 2b).

Se utilizó absorción de luz a 280 nm (Figura 2 a y 2 b) debido a que en este rango se pueden observar la mayoría de compuestos fenólicos que se encuentra entre 270-290 nm (Boulet *et al.* 2017). Por la diversidad de fenólicos con los que cuenta la cereza se realizó una identificación y caracterización para cada una de las fracciones F1, F2, F3 y F4.

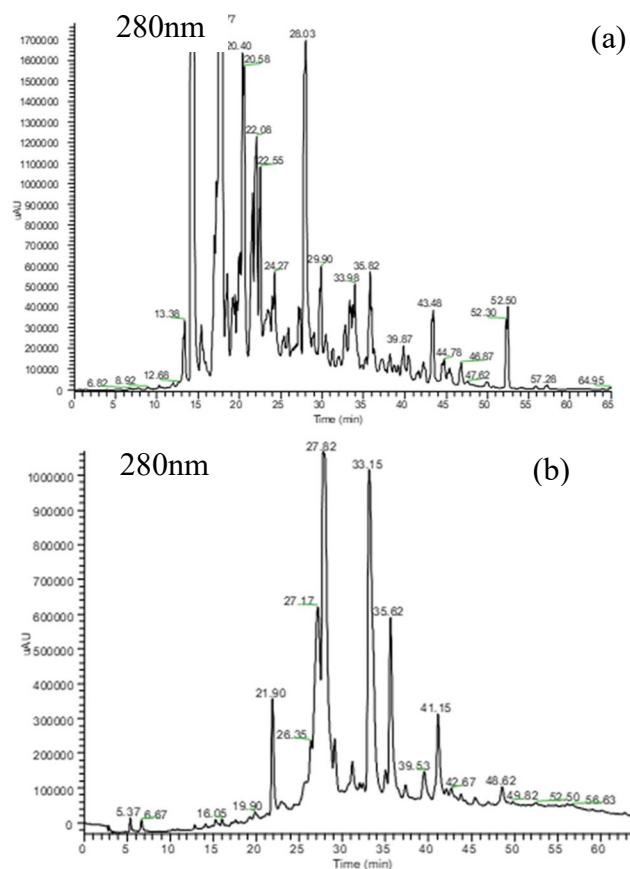


Figura 2. Cromatograma de extracto completo de cereza, (a) dilución en agua y (b) dilución en etac.

Los compuestos fenólicos se encuentran en gran abundancia en el reino vegetal porque son los metabolitos secundarios más abundantes en las plantas. Dichos fenólicos o polifenoles incluyen muchas clases de compuestos que varían desde ácidos fenólicos, antocianinas de colores, flavonoides simples y flavonoides complejos (Neha *et al.* 2014).

Todos los compuestos fenólicos poseen en su estructura un anillo aromático que tiene uno o más grupos hidroxilo, así como la mayoría de polifenoles en las plantas existen como glucósidos con diferentes unidades de azúcar y azúcares asilados en diferentes posiciones de los esqueletos de polifenol (Tsao 2010).

Cuando se procedió a realizar el análisis de la Fracción uno (F1) que se obtuvo con el solvente orgánico MeOH, se encontraron la mayoría de ácidos como cafeoilquínico y coumaroilquínico por su afinidad al solvente debido a que en su estructura presentan el ácido quínico que permite formar ésteres cafeíco y coumaroil (Pubchem 2009). El ácido quínico (Figura 3) presenta en su estructura 5 hidrógenos que pueden ser donados y 6 hidrógenos receptores que otorgan alta solubilidad y afinidad por los solventes orgánicos como el MeOH (Clifford 1999). Estos ácidos fenólicos del ácido quínico son compuestos no flavonoides que se pueden dividir en dos tipos principales, siendo derivados del ácido benzoico y del ácido cinámico (Figura 4) se basan en las cadenas principales C1-C6 y C3-C6 (Tsao 2010). Para la identificación de ácidos fenólicos se utilizó una absorbancia de 280 nm.

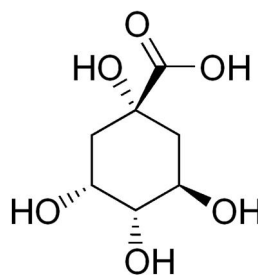


Figura 3. Estructura química Acido quínico.

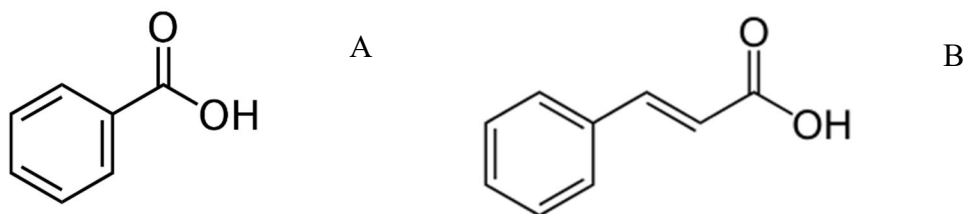


Figura 4. Estructura química del ácido benzoico (A) y del ácido cinámico (B).

Los diferentes picos (Figura 5) muestran las diferentes combinaciones que el ácido quínico puede formar, una investigación realizada por Herradon en el 2012 identificó que el ácido cafeolquínico puede ayudar a la prevención de la diabetes y sus complicaciones esto debido al efecto del ácido clorogénico y otros componentes fenólicos que actúan sobre el metabolismo de la glucosa.

Estos compuestos (Figura 5) también presentan actividad antioxidante que se asocia a efectos citoprotectores (Nunes y Noratto 2018). Los compuestos fenólicos que se identificaron se encuentran en una concentración elevada y se detectó la presencia de compuestos coeluidos, esto significa que algún compuesto interfirió en la separación completa de otros y por lo tanto se presentaron dos o más compuestos en un mismo tiempo de retención.

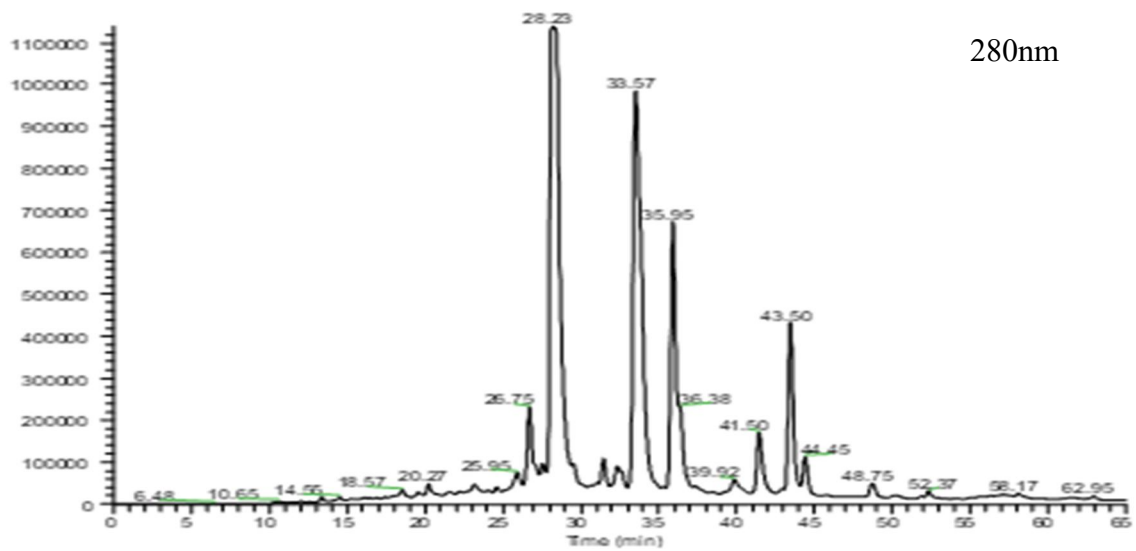


Figura 5. Cromatograma de ácidos fenólicos identificados en cereza.

Además, el ácido cafeolshiquímico (Figura 6) que se encuentre en las muestras permite la extracción de los compuestos de interés para el uso del consumidor o como andamios para el uso de moléculas más complejas (Marasco y Díaz 2007).

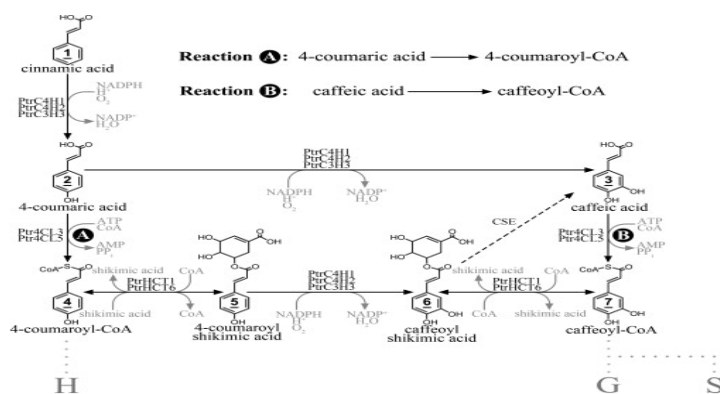


Figura 6. Vía biosintética para compuestos de las plantas.

Fuente: (Chang *et al.* 2015)

Se logró identificar un total de 18 ácidos fenólicos en la fracción uno, y la mayoría de estos compuestos poseen un peso molecular relativamente bajo y con una estructuración simple que es característico de los ácidos fenólicos (Cuadro 2).

Cuadro 2. Compuestos abundantes identificados en la fracción uno del extracto de cereza.

| Compuesto | ¹ TR (min) | ² [M-H] ⁻ (m/z) | ³ MS ² fragmentos de ion (m/z) |
|----------------------------------|-----------------------|---------------------------------------|--|
| Ácido Cafeoilquinico cis | 28.23 | 353 | 191,179,135 |
| Ácido Cafeoilquinico trans | 28.23 | 353 | 191,179,135 |
| Ácido Coumaroilquinico cis | 33.57 | 337 | 163,119,191 |
| Ácido Coumaroilquinico trans | 33.57 | 337 | 163,119,191 |
| Acido fenólico 1 | 33.57 | 367 | 193 |
| 3-Ácido Feruloilquinico trans | 33.57 | 367 | 193 |
| Acido fenólico 2 | 33.57 | 367 | 179,191 |
| 5- Ácido Feruloilquinico cis | 33.57 | 367 | 179,191 |
| Ácido Cafeolquinico-glucosido | 26.75 | 515 | 341,353,179 |
| 3- Ácido Cafeolquinico-glucosido | 26.75 | 515 | 179,341,353 |
| 4-Ácido Cafeolquinico-glucosido | 26.75 | 515 | 179,341,353 |
| 3,5-Ácido diCafeolquinico | 26.75,33.57 | 515 | 353,191 |
| 4,5- Ácido diCafeolquinico | 26.75,33.57 | 515 | 353,179,191 |
| Ácido Cafeoilshimico | 26.75,33.57 | 335 | 179 |
| 3-y-4 Ácido-acetona | | | |
| Cafeoilquinico | 26.75,33.57 | 335 | 161,191 |
| Ácido Cafeoilshimico | 26.75,33.57 | 335 | 179,161 |
| Hexa Cafeoilquinico | 33.57 | 341 | 179,161,263 |
| Ácido-glucosido Caffeico | 33.57 | 341 | 179 |

¹Tiempo de Retención, ²Masa atómica menos un hidrógeno, ³Separación Iónica.

El ácido Cafeoilshiquímico es el principal camino biosintético de compuestos aromáticos, presenta la secuencia de metabolitos primarios en los que se encuentra fosfoenolpiruvato (PEP) y eritrosa-4-fosfato (EAP) hasta convertirse en corismato. Este es el precursor para los tres aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano y para los ácidos p-aminobenzoico y p-hidroxibenzoico, que también son precursores de proteínas y de derivados fenilpropanoides e indólicos (Chang *et al.* 2015).

Las antocianinas pertenecen a un gran y muy distribuido grupo de metabolitos secundarios que se conocen colectivamente como flavonoides, los cuales, son responsables del color rojo, morado e incluso azul en las diferentes frutas y flores entre otros (Tsao 2010). Las antocianinas comparten un esqueleto de carbono comúnmente llamado columna vertebral de flavilio; este consiste en C-6 (anillo A), C-3 (anillo C), C-6 (anillo B) (Figura 7) (Hagerman 2011). Las diferencias entre las subclases se deben a la existencia de dobles enlaces y grupos carbonilo en el anillo C. Las antocianinas están intensamente coloreadas en un pH bajo esto se debe a la presencia de ocho diferentes enlaces dobles que le dan una carga positiva a la molécula, por esta razón se utiliza el método de diferencial de pH para la cuantificación de las mismas (Rivas *et al.* 2014). La solubilidad de las antocianinas es por el grupo 3-hidroxilo que generalmente se encuentra unido a una azúcar para formar una antocianina estable (Laszlo 2015).

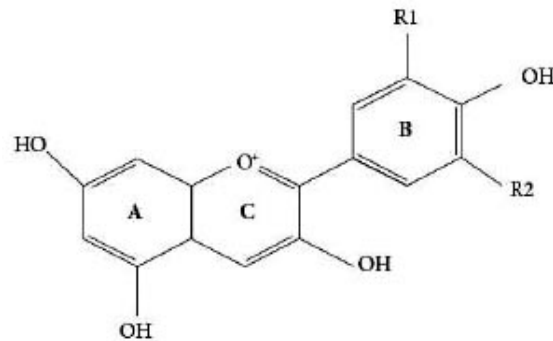


Figura 7. Estructura química de las antocianinas (F2).
Fuente: (Pascual y Sánchez 2008).

Se ha reportado que las antocianinas tienen beneficios para la salud como potentes antioxidantes y pueden incrementar la agudeza visual. Se ha observado también que poseen actividad antineoplásica, vasotónica, vasoprotectora, anti - inflamatoria y hepatoprotectora (Jimenez *et al.* 2009). La identificación de Antocianinas (F2) se realizó a 520 nm (Figura 8) esto porque un estudio de la Universidad de Chengdu en China para la determinación y comparación de flavonoides y antocianinas mostró que Cianidina-3-glucósido que es una de las antocianinas más abundantes, y está presente en muchas frutas, tienen un espectro ideal a 520 nm (Shingin *et al.* 2009).

En la naturaleza, las antocianinas siempre presentan sustituciones glicosídicas en las posiciones 3 y/o 5 con mono, di o trisacáridos que incrementan su solubilidad y permiten diversidad estructural. Dentro de los sacáridos glicosilantes se encuentran la glucosa, galactosa, xilosa, ramnosa, arabinosa, rutinosa, soforosa, sambubiosa y gentobiosa. Otra posible variación en la estructura es la acilación de los residuos de azúcares de la molécula con ácidos orgánicos (Garzón 2008).

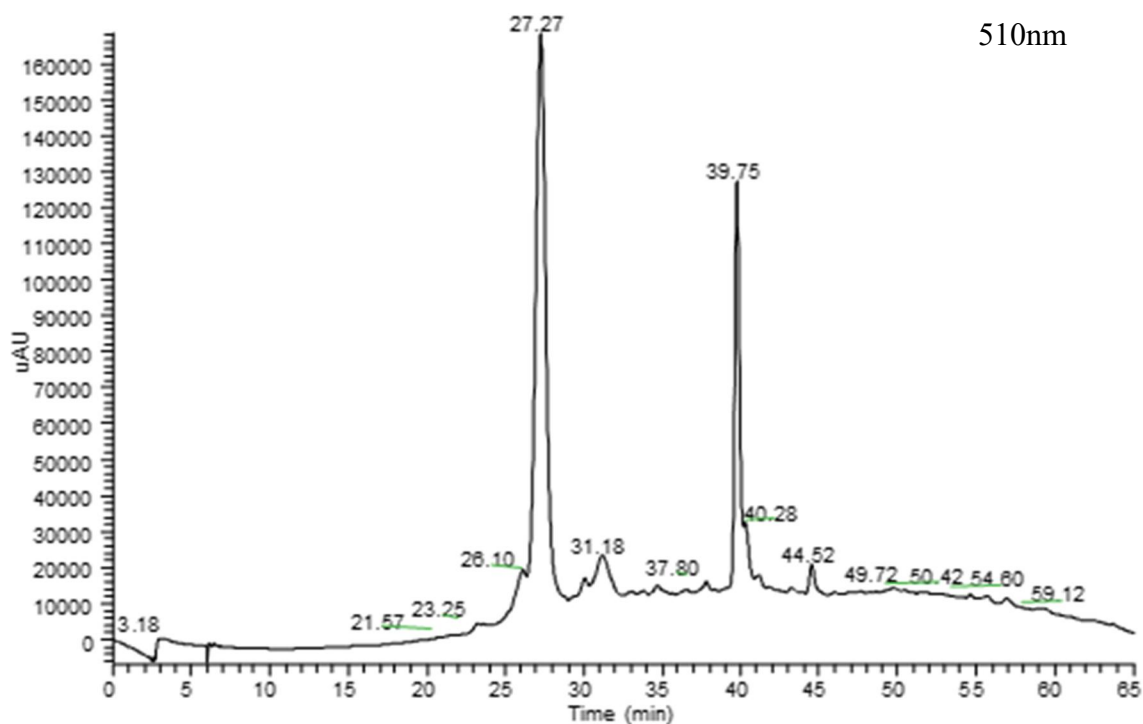


Figura 8. Cromatograma de antocianinas identificadas en la fracción dos del extracto de cereza.

En la fracción dos predominaron las antocianinas que también mostró como más abundantes un estudio del 2017 por Martini y colaboradores, que menciona que entre las antocianinas más importante en las cerezas se encuentra Cianidina-3-rutinosa y Cianidina-3-glucosido. Este mismo estudio identificó los valores de la masa y los fragmentos de iones para comprobar su presencia, siendo para Cianidina-3-rutinosida (595,287 y 449) y para Cianidina-3-glucósido (449 y 287), tomando en cuenta los resultados de nuestro cromatograma (Cuadro 3) se comprobó la presencia de estas antocianinas (Martini *et al.* 2017).

Cuadro 3. Antocianinas abundantes identificadas en fracción dos del extracto de cereza.

| Compuesto | ¹ TR(min) | ² [M-H] ⁻ (m/z) | ³ MS ² fragmentos de ion (m/z) |
|-------------------------------------|----------------------|--|---|
| Cianidina-3-glucosido | 27.27 | 449 | 287 |
| Cianidina-3-rutinosida | 27.27 | 595 | 287,449 |
| Peonidina-3-rutinosida | 31.18 | 609 | 301,463 |
| Peonidina-3-glucosido | 27.27 | 463 | 301 |
| Cianidina-3,5-diglucosido | 31.18 | 611 | 287 |
| Cianidina-3-soforosida | 31.18 | 611 | 287 |
| Malvidin-3-O-glucosido-acetaldehido | 39.75 | 517 | 355 |
| Antocianina 1 | 40.28 | 355 | 181,391,517,663, |
| Antocianina 2 | 44.52 | 148 | 181,391,677 |

¹Tiempo de Retención, ²Masa atómica menos un hidrógeno, ³Separación Iónica.

En la naturaleza es posible encontrar cientos de diferentes antocianinas. En este experimento se logró identificar nueve diferentes debido a patrones de glicosilación. En la actualidad existen alrededor de 25 diferentes aglicones identificados, sin embargo, solo seis antocianinas cianidina, delfinina, malvidina, pelargonidina, peonidina y petunidina (Figura 9) que están raramente encontradas en la naturaleza, representando más del 90% de las antocianinas identificadas (Wallace 2015).

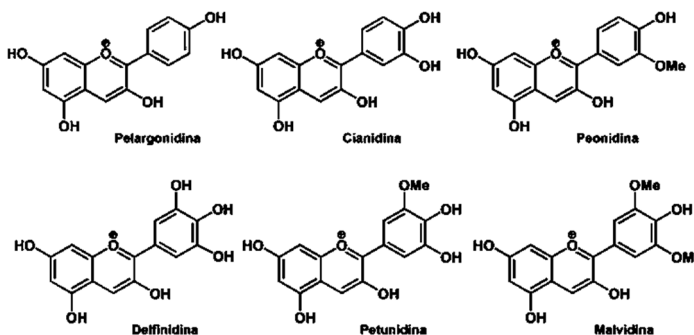


Figura 9. Estructura química de las antocianinas más comunes.

Fuente: (Espino 2014).

Estos resultados permitieron comprobar que la cereza es una fuente importante de antocianinas (Blando *et al.* 2004) lo cual, les confiere el color en tonos rojizos. Pueden considerarse flavonoles, 3-hidroxiflavonas y flavonas los diferentes compuestos que en su estructura química presentan un grupo hidroxilo, y una alquilación y/o glicosilación.

Las flavonas y los flavonoides que se encuentran en mayor frecuencia en las plantas son aquellas con hidroxilación del anillo B en las posiciones 3' y 4', seguidos por aquellos con un grupo hidroxilo en la posición 4', quercetina y kampeferol los cuales son flavonoles típicos de este tipo (Herrmann 2006).

Los flavones ocurren principalmente como 7-O-glucósidos (Figura 10). La formación de glucósidos de flavona y flavonol depende normalmente de la acción de la luz. Por lo general las concentraciones más altas de estos compuestos ocurren en las hojas, y son las flavonas que hacen una contribución esencial de color amarillo que difiere del patrón de hidroxilación habitual por un grupo hidroxilo unido al núcleo en la posición 6 u 8 (Panche *et al.*2016).

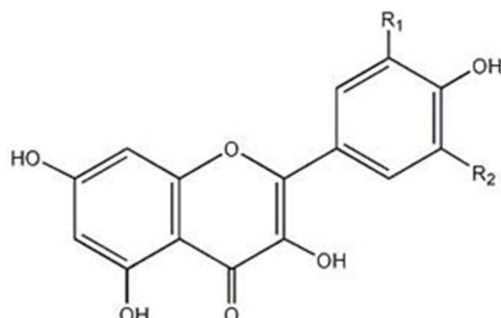


Figura 10. Estructura química de los flavonoles.

Fuente: (Serrano *et al.*2006).

La sustitución por glicosilación, malonilación, hidroxilación, metilación, acilación, prenilación o polimerización conduce a la diversidad en esta familia y tiene un impacto importante sobre la función, solubilidad y degradación de los mismos (Tripoli *et al.* 2007). Los picos observados en el cromatograma (Figura 11) de acuerdo a los valores de peso molecular y los iones que presentan, que se encuentra entre 409 y 643 la mayoría de flavonoles que se encuentran estrechamente relacionados con quercetina.

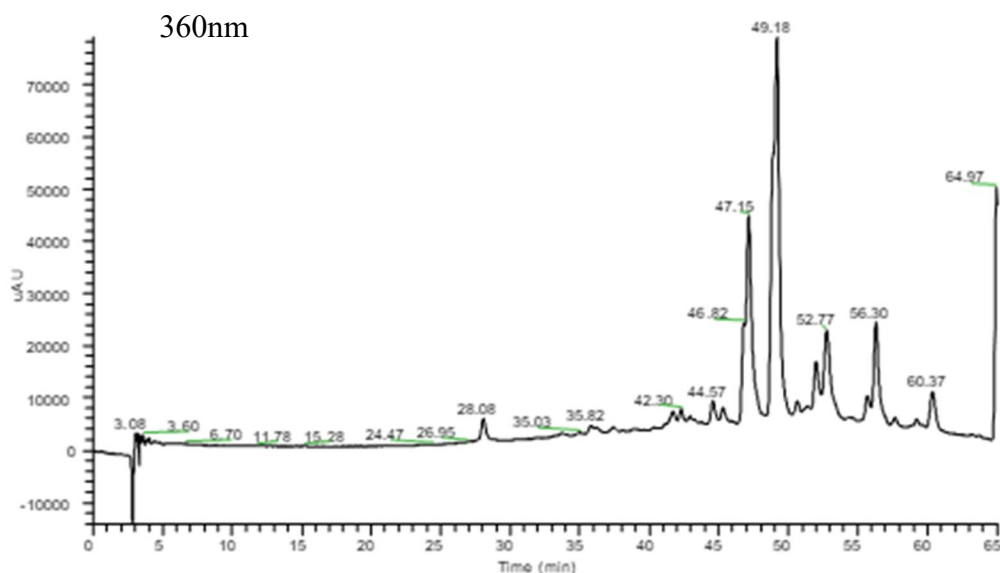


Figura 11. Cromatograma de flavonoles identificados en fracción tres de extracto de cereza.

Quercetina es el más abundante de los flavonoles y consta de tres anillos y cinco grupos hidroxilo (Figura 12), ésta permite la formación de flavonoles críticos considerados en esta categoría la rutina, hesperidina, naringenina y tangeritina (Lakhanpal y Deepak 2007).

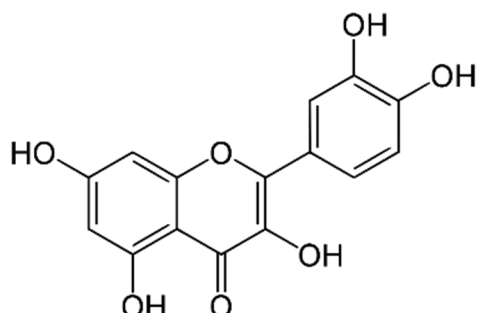


Figura 12. Estructura química de quercetina.
Fuente: (Lakhanpal y Deepak 2007).

Del total de compuestos se logró identificar cinco diferentes flavonoles por su peso molecular y la separación de sus iones en los cuales la mayoría pertenece al grupo de las quercetina (Cuadro 4). Una molécula de quercetina contiene cinco hidroxilos cuya presencia determina el compuesto, la actividad biológica y el posible número de derivados. Los principales grupos de derivados de quercetina son glucósidos y éteres, así también el sulfato y prenilo que se produce con menos frecuencia (Williams 2004).

Cuadro 4. Flavonoles abundantes identificados en la fracción tres del extracto de cereza.

| Compuesto | ¹ TR(min) | ² [M-H] ⁻ (m/z) | ³ MS ² fragmentos de ion (m/z) |
|---------------------------|----------------------|--|---|
| Quercetina-3-0-rutinosida | 49.05 | 609 | 301,271 |
| Quercetina-3-0-glucosido | 49.05 | 463 | 301 |
| Quercetina-3-0-heoxida | 49.05 | 463 | 301 |
| Narinengenin-heoxida | 56.3 | 433 | 271,313 |
| Taxifolina-rutinosa | 49.05 | 611 | 285 |
| Flavonoide 1 | 46.82 | 497 | 449,451 |
| Flavonoide 2 | 47.15 | 514 | 191,352,468 |
| Flavonoide 3 | 54.58 | 677 | 262,723 |

¹Tiempo de Retención, ²Masa atómica menos un hidrógeno, ³Separación Iónica.

Las procianidinas (Figura 13) modulan positivamente gran número de procesos implicados en el desarrollo del síndrome metabólico: estrés oxidativo, ganancia de peso y diferenciación de tejido adiposo, captación de glucosa y resistencia a la insulina, lipemia y desarrollo de aterosclerosis, tensión arterial, estado inflamatorio y estado trombótico (Fernandez *et al.* 2007).

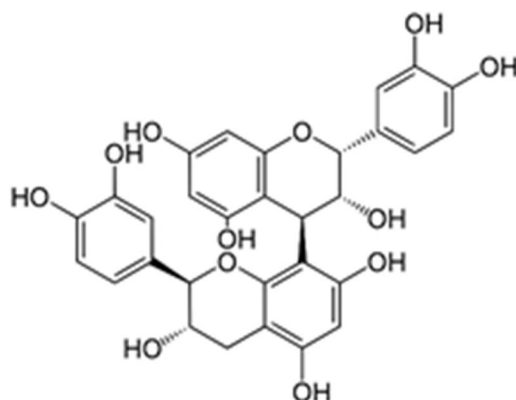


Figura 13. Estructura química básica de las procianadinas.
Fuente: (Serrano M, Lopez M, Espuñez T 2006).

Para la identificación de los diversos polímeros que conforman la muestra de procianadinas, se utilizó un espectro UV de 280 nm. Las procianadinas son polímeros que presentan distintas conjunciones, por lo que la curva de HPLC-MS/MS (Figura 14), es característica de los mismos porque no se separan por completo unos de otros al momento de pasar por los disolventes utilizados para el HPLC-MS/MS para su identificación.

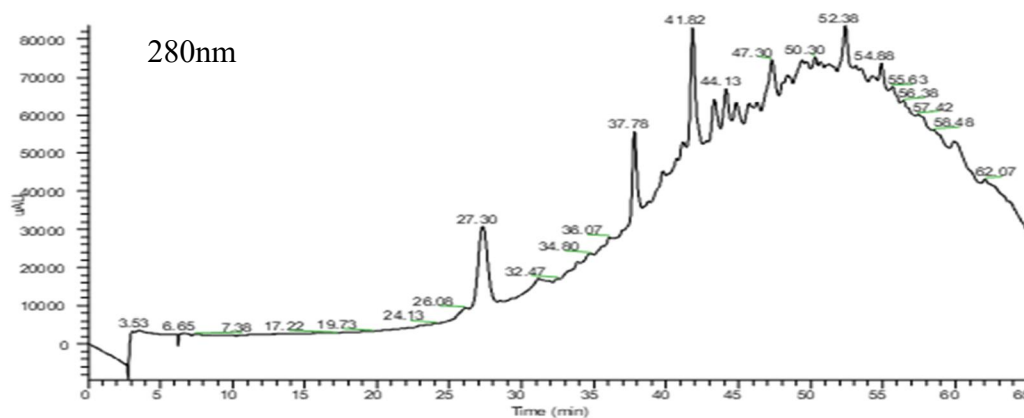


Figura 14. Cromatograma de procianadinas en la fracción cuatro del extracto de cereza.

Las procianidinas consisten principalmente de monómeros de epicatequina, y son los más abundantes, mientras que las que contienen epigalocatequina son subunidades que se designan prodefinidinas (Lingyu *et al.* 2018). En la mayoría de procianadinas que presentan un menor grado de polimerización (dos a cuatro monómeros) se denominan procianadinas oligoméricas, y aquellas con más de cinco monómeros se llaman poliméricas (Lingyu *et al.* 2018).

Debido a que las moléculas de procianadinas son polímeros se logró identificar 14 diferentes polímeros y dentro de estos se encuentra en mayor abundancia los asociados con catequina que es un isómero con configuración trans y epicatequina (Cuadro 5). Cada una de estas dos combinaciones tiene dos estereoisómeros, es decir (+)- catequina(-), (+)-epicatequina (-) y (-) epicatequina (+)-catequina y (-)epicatequina (+)-catequina, estos son los dos isómeros que se encuentran en mayor cantidad en las diferentes plantas (Tsao 2010). Estas catequinas y epicatequinas pueden formar polímeros que regularmente se denominan proantocianadinas porque es la escisión catalizada por ácidos de las cadenas poliméricas que produce antocianadinas (Esra *et al.* 2010).

Cuadro 5. Procianadinas abundantes identificadas en la fracción cuatro del extracto de cereza.

| Compuesto | ¹ TR(min) | ² M-H]- (m/z) | ³ MS ² fragmentos de ion (m/z) |
|-------------------------------|----------------------|-----------------------------|---|
| Catequina | 47.23 | 289 | 245 |
| Epicatequina | 47.23 | 289 | 245 |
| Epicatequina-3-galato | 28.08 | 441 | 161,397 |
| Procianadina tetramero tipo B | 47.23 | 576 | 407,289, |
| Procianadina tetramero tipo B | 48.82 | 577 | 407,289 |
| Peonidina-3-rutinosida | 48.82 | 609 | 301 |
| Cianidina-3-5-diglucosida | 31.18 | 611 | 287 |
| Cianidina-3-sophorosida | 31.18 | 611 | 287 |
| Ácido cafeolquinico cis | 28.08 | 353 | 191,179,135 |
| Ácido cafeolquinico trans | 28.08 | 353 | 191,179,135 |
| Ácido Coumarolquínico cis | 33.33 | 337 | 163,119,191 |
| Ácido Coumarolquínico trans | 33.33 | 337 | 163,119,191 |
| Cianidina-3-rutinosida | 38.67 | 595 | 287,449 |
| Procianadina pentamero tipo B | 40.12 | 720 | 405,407,577,413,289 |

¹Tiempo de Retención, ²Masa atómica menos un hidrógeno, ³Separación Iónica.

Todos los polifenoles que se identificaron en nuestros tratamientos, los cuales se encuentran entre los más utilizados por sus características antioxidantes demostrados en experimentos *in vitro* en *in vivo* (Noratto *et al.* 2009). No solo en cerezas sino también en otras frutas como uva, fresas, arándanos entre otros (Keenoy 2016). Por lo que son de gran importancia, para la quimiopreención en la actualidad debido a que estas se pueden encontrar en la mayoría de frutas y hortalizas que presentan una pigmentación roja (Sánchez y Beltrán 2015).

Experimento *in vivo*.

Para los experimentos *in vivo*, se evaluaron los siguientes tratamientos F2, F4 y EC debido a que estudios previos en el laboratorio de Texas A&M *in vitro* demostraron que fenoles sin consolidar (F1) necesitaban grandes dosis del mismo para mostrar efecto.

Antocianinas (F2) mostró un efecto positivo debido a que disminuyeron las células cancerígenas sin mostrar un efecto de toxicidad sobre las células normales, Flavonoles (F3) mostró efectos positivos en las células cancerígenas, pero al momento de aumentar las dosis presentó efectos de toxicidad para las células normales. Procianadinas (F4) mostró efectos de disminución de las células cancerígenas sin mostrar efectos negativos en las células normales y sin requerir dosis elevadas. Extracto Completo también presentó los efectos esperados de disminuir las células cancerígenas sin dañar las células normales y sin necesitar grandes dosis; este se utilizó debido a que se quería conocer el efecto de todos los polifenoles contra cada una de las fracciones para conocer la efectividad de los mismos.

Los extractos de polifenoles utilizados, antocianinas (F2), procianadinas (F4) y extracto completo (EC) con un rango de (150mg/kg/día), no mostraron ningún efecto adverso en cuanto a la ganancia de peso diaria en los animales (Figura 15), ni tampoco en la apariencia visual de los órganos incluyendo el hígado y los riñones. Los datos representados en la figura 15 son los resultados de la prueba de cuadrados mínimos que muestra diferencia estadísticamente significativa de los pesos de los animales, pero esta diferencia no fue por el efecto de los tratamientos conforme pasaron los días, con un $P=0.5124$.

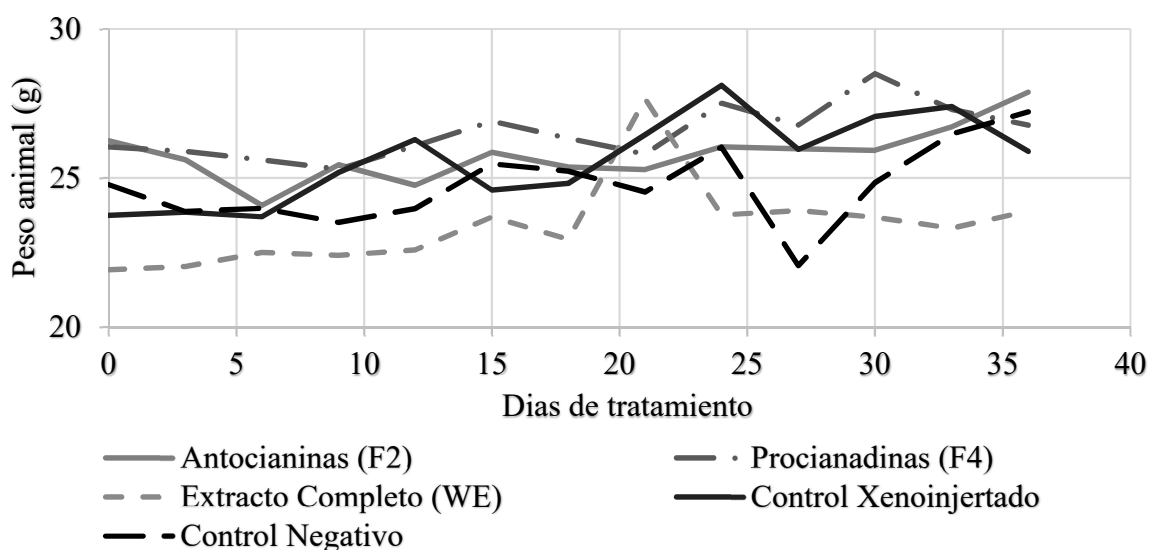


Figura 15. Peso corporal de los animales para el día de la eutanasia.

La variación en el día 27 (Figura 21) en cuanto a los pesos del control negativo y el extracto completo fue debido a problemas que presentó la calibración de la balanza analítica utilizada para la toma de peso de los animales. Así como los animales de extracto completo eran los que presentaban un menor peso debido a que al inicio del experimento no se consideró el peso como una variable sino solo el crecimiento del tumor.

Los resultados de toxicidad no mostraron efectos para el control negativo y permite que este experimento pueda ser llevado a dosis adecuadas para el ser humano, por consiguiente, estos resultados son de suma importancia para investigaciones futuras. Las cerezas son una alternativa natural para la prevención de diferentes tipos de cáncer debido a que en este estudio no mostraron ningún efecto negativo sobre las células normales, contrario a las de cáncer por lo que, los pacientes no presentarán alteraciones en cuanto a las funciones normales del metabolismo.

En la eutanasia, los animales no presentaron anomalía en sus órganos (Cuadro 6), debido a que al momento en que se extrajeron de los ratones no presentaban ningún cambio en tamaño, color o algún tipo de defecto visual que pudiera ser muestra de un efecto secundario provocado por los tratamientos que recibieron durante 36 días. Las variaciones de peso en el corazón, se presentaron debido a que la balanza analítica que se utilizó presentó error por el flujo del aire con el que se contaba y no se podía evitar por el uso de la cabina de seguridad.

Cuadro 6. Peso final de los órganos y animales el día de la eutanasia.

| Parámetros | Control | F2² | F4³ | EC⁴ | Valor P |
|---------------------|----------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------|
| PC ¹ (g) | 27.2 ±1.10 | 25.3±1.70 | 26.4±1.20 | 24.9±2.6 | 0.106 |
| Hígado (g) | 1.10±0.20 | 0.98±0.10 | 1.09±0.20 | 1.2±0.2 | 0.207 |
| Riñón (g) | 0.30±0.02 | 0.30±0.03 | 0.36±0.05 | 0.36±0.08 | 0.649 |
| Bazo (g) | 0.13±0.02 | 0.11±0.01 | 0.11±0.04 | 0.12±0.03 | 0.509 |
| Corazón (g) | 0.17(0.02) | 0.15(0.09) | 0.15(0.04) | 0.12(0.03) | 0.003 |

¹Peso Corporal, ²Antocianinas, ³Procianadinas y ⁴Extracto Completo.

Los datos de peso representados en el cuadro 6 son valores de media ± Desviación estándar cuando se distribuye de manera normal, de lo contrario, como en los datos del corazón, es mediana (rango).

Datos representados en la (Figura 16) son los resultados de la prueba TUKEY, para evaluar la diferencia entre tratamientos y el grupo control, las letras diferentes significan una diferencia significativa de P<0.001 entre el control y los tratamientos.

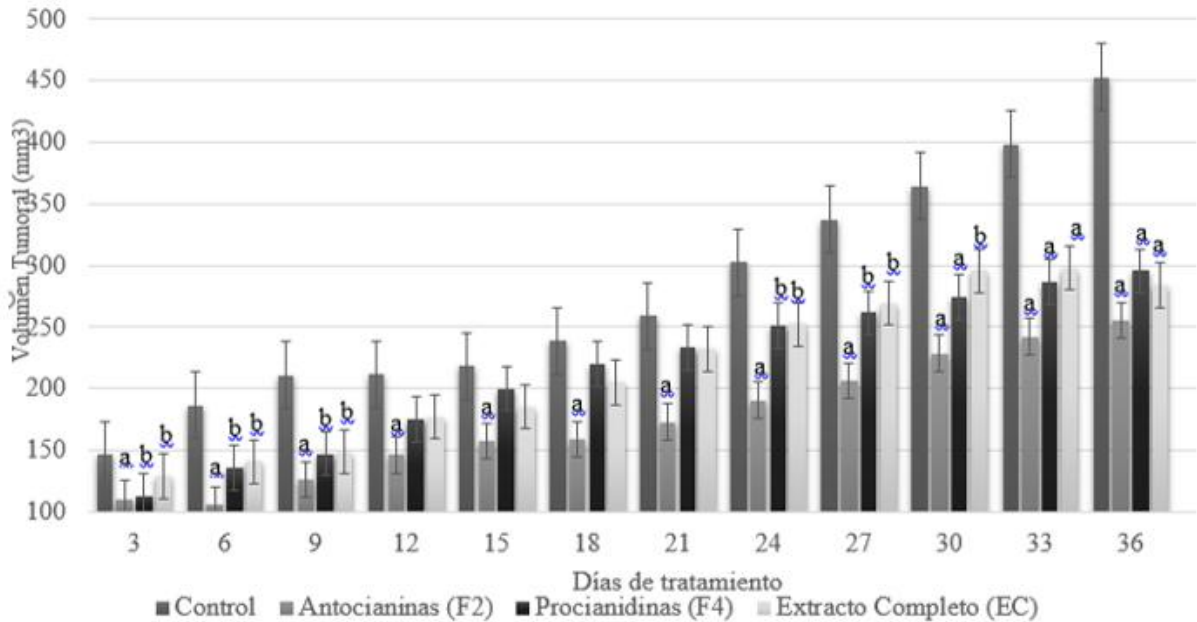


Figura 16. Crecimiento tumoral en los animales desde el inicio hasta el día final del tratamiento.

En base a los resultados obtenidos la potencia para inhibir el crecimiento tumoral se presentó $F2 > F4 > EC$ (55, 38, 37% de acción inhibitoria). Además, de esto los polifenoles de cereza utilizados no presentaron ningún tipo de toxicidad para el control negativo.

Los resultados que se obtuvieron sobre la actividad inhibidora de los polifenoles de la cereza se pueden comparar con el estudio de Noratto *et al.* (2009) realizados *in vivo* con la misma línea celular, pero con polifenoles de melocotón, los cuales muestran que dichos polifenoles tampoco tuvieron algún efecto negativo en cuanto a toxicidad en los animales y que ayudaron a reducir el crecimiento tumoral del cáncer de mama. Adicionalmente mostraron efectos antimetástasicos con pruebas de histología y ADN. Estas consistencias en los resultados demuestran el efecto en la salud que tienen los diferentes polifenoles.

Este experimento también ayuda a promover el consumo de antioxidantes como los polifenoles presentes en frutas y vegetales, en la dieta. Un estudio de la Universidad de Salamanca, España, explica de manera muy general que se ha estimado que los ácidos fenólicos podrían representar aproximadamente 1/3 de los polifenoles ingeridos y los flavonoides los 2/3 restantes. Y que gran cantidad de frutas y vegetales entre las que mencionan la cereza son una fuente importante de flavonoides (Buelga 2007), no solo para cáncer sino también en otras enfermedades de gran importancia.

Se comprobó la presencia de Cianidina-3glucosido y Cianidina-3-rutinoso que son compuestos fenólicos, en el tratamiento con antocianinas evidenciando que estos tienen propiedades que ayudan a reducir el crecimiento tumoral de cáncer incluso triple negativo

que es el más severo y para el cual aún no existen tantas alternativas naturales (Chen *et al.* 2009).

Tomando en cuenta los resultados, se puede determinar que el tratamiento que tuvo un mejor efecto en la reducción del crecimiento tumoral las antocianinas, las cuales en la naturaleza se encuentran en frutos rojos (Bailon *et al.* 2008). Por dichos estudios y la cuantificación e identificación que se realizó a la muestra de antocianinas, se puede comprobar que la cereza por su pigmentación roja posee una gran cantidad de estas antocianinas. Se podría asumir que las antocianinas más abundantes comparadas con los otros tipos de polifenoles que están en la fruta y que por su parte, concuerda con lo expuesto por otro estudio que identifica que la concentración de antocianinas es la mayor comparada con otros frutos de pigmentación roja con concentración de 25 mg por cada 100 g (Saberu *et al.* 2013).

Un gran número de investigaciones (Garzón 2008; Ortiz *et al.* 2011; Sánchez y Beltrán 2015), hablan de las antocianinas como poderosos antioxidantes para combatir radicales libres en el organismo, así también sobre cómo durante su paso por el tracto digestivo al torrente sanguíneo de los mamíferos permanecen intactas. Ejercen efectos terapéuticos dentro de los cuales se incluyen la reducción de las enfermedades coronarias, efectos anticancerígenos, antitumorales, antiinflamatorios y antidiabéticos. Lo anterior se pudo comprobar gracias al estudio que se realizó *in vivo* donde se toman en cuenta todos los mecanismos que lleva a cabo el cuerpo humano.

4. CONCLUSIONES

- Un total de 38 compuestos fenólicos fueron identificados y separados en cuatro diferentes fracciones siendo 18 ácidos fenólicos, 9 antocianinas, 5 flavonoles y 6 procianadinas.
- Los polifenoles presentes en cereza podrían ayudar en el tratamiento de cáncer HER2+, *in vivo*, el tratamiento con antocianinas presentó una inhibición del 53% respecto al control.
- Los polifenoles de cereza no presentaron ningún tipo de toxicidad para los ratones atímicos desnudos porque no presentaron anomalías en su crecimiento y funcionamiento regular.

5. RECOMENDACIONES

- Utilizar los polifenoles de otra variedad de cereza y en otra línea celular cancerígena para comprobar sus efectos a la salud.
- Realizar la inyección de células de cáncer en el seno de los ratones, para evaluar el efecto de los polifenoles de cereza, además de la acción antimetástasica.
- Realizar estudios de expresión de genes e histología en los órganos recolectados para poder identificar la capacidad antimetástasica de los polifenoles presentes en cereza.

6. LITERATURA CITADA

Abderrahim F, Estrella S, Susín C, Arribas SM, González MC, Condezo-Hoyos L. 2011. The antioxidant activity and thermal stability of lemon verbena (*Aloysia triphylla*) infusion. *J Med Food*. 14(5):517–527. eng. doi:10.1089.

ACS (American Cancer Society). 2017. ¿Qué es el cáncer? Estados Unidos: American Cancer Society; [Consultado 2018 feb 20]. <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/acerca/que-es-el-cancer-de-seno.html>.

Bailon T, Buelga C, Alonso J, Dueñas M. 2008. Anthocyanins composition in figures. 21st ed. Estados Unidos. *Journal of Food Composition and Analysis*. p. 107-115 . ISBN: 10.1016.

Blando F, Gerardi C, Nicoletti I. 2004. Sour Cherry (*Prunus cerasus* L.) anthocyanins as ingredients for functional foods. *J. of BioMed Research International*. doi:11.1155.

Blot WJ, Tarone RE. 2015. Doll and Peto's quantitative estimates of cancer risks: holding generally true for 35 years. *J Natl Cancer Inst*. [Consultado 2018 abr 17]. doi:13.1093.

Boulet J, Ducasse M, Cheynier V. 2017. Ultraviolet spectroscopy study of phenolic substances and other major compounds in red wines: relationship between astringency and the concentration of phenolic substances. 2da ed. Australia. *Australian Journal of grape and wine research*. 200 p. ISBN: 12.1111.ajgw.12265.

Breastcancer. 2013. Tratamiento para el cáncer de mama triple negativo. Estados Unidos. Breastcancer. [consultado 2018 mar 02]. Breastcancer.org.

Buelga C. 2007. Implicaciones en la salud de los polifenoles de la dieta. España. Universidad de Salamanca. 5(1): 20-21. http://revista.nutricion.org/hemeroteca/revista_marzo_02/VCongreso_publicaciones/Conferencias/Santos.pdf.

Chang C, Weng X, Quanzi W, Hsi-Chuan. 2015. 4-Coumaroyl and caffeoyl shikimic acids inhibit 4-coumaric acid: coenzyme a ligases and modulate metabolic flux for 3-hydroxylation in monolignol biosynthesis of *populus trichocarpa*. 1ra ed. Science Direct. Estados Unidos. *Plant metabolism and synthetic biology*. 8 vol. ISBN: 10.1016.

Chavez KJ, Garimella SV, Lipkowitz S. 2010. Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast Dis.* 32(1-2):35–48. doi:20.3233.

Chávez KN. 2015. Actividad antiinflamatoria de los coproductos de cacao (*Theobroma cacao*) en células humanas cancerígenas (HT-29). [Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano-Honduras. 32 p.

Chen P, Chu S, Chiou H, Chiang C. 2009. Cyanidin 3-glucoside and peonidin 3-glucoside inhibit tumor cell growth and induce apoptosis *in vitro* and suppress tumor growth *in vivo*. 2da ed. Estados Unidos. *Journal Nutrition and cancer.* p. 232-243. 43 vol. ISBN: 17.1207.

Clifford M. 1999. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. 3ra ed. Estados Unidos. *Journal of the Food and Agriculture banner.* *Journal of the Food and Agriculture banner.* 400 p. 79 vol. ISBN: 31.1002.

Espino P. 2014 Las antocianinas compuestos bioactivos. Colombia. Universidad Nacional de Colombia: Departamento de Química.

Esra-Capanoglua M, Dilek B, Ric de Vosb C. 2010. Procyanidins in fruit from sour cherry (*Prunus cerasus*) differ strongly in chain length from those in laurel cherry (*Prunus lauracerasus*) and cornelian cherry (*Cornus mas*). *Journal of Berry Research(JBR).* 1(3): 137-146.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 136(5):59-86. doi:10.1002/ijc.29210.

Fernandez J, Pinent M, Bladé C, Arola L. 2007. Alimentos ricos en procianidinas, alimentación funcional para prevenir la aparición de síndrome metabólico. *Rev Esp Obes.* [consultado 2018 may 23]. 5(2): 98-108.

García Martínez EM, Fernández Segovia I, Fuentes López A. 2015. Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. España. Universidad politecnica de Valencia. [consultado 2018 abr 21]. <https://riunet.upv.es/bitstream/10251/52056/1/Garcia%20Mart%c3%adnez%20et%20al.pdf>.

Garzón G. 2008. Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos. Colombia. Universidad Nacional de Colombia: Departamento de Química.

Giusti M, Wrolstad R. 2001. Total monomeric anthocyanin by the pH-differential method. Estados Unidos. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry.*

Guzmán E. 2010. Cáncer de mama triple negativo, estado actual. *Revista de Especialidades Médico Quirúrgicas.* [consultado 2018 may 16]. 10(4):57-66. <http://www.medigraphic.com/pdfs/quirurgicas/rmq-2010/rmq104h.pdf>.

Hagerman E. 2011. Tannin Handbook. 4ta ed. Estados Unidos. Hargeman Laboratory, Chemistry. 150 p. 10 vol. ISBN: 978020391225.

He J, Giusti M. 2010. Anthocyanins: natural colorants with health promoting properties. *Annu Rev Food Sci Technol*. Estados Unidos. *Journal of Food Science and Technology*. 1: 163-187.

Herradon N. 2012. Caffeoylquinic acid in fruits. Estados Unidos. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*.

Herrmann K. 2006. Flavonols and flavones in food plants: a review. *International Journal of Food Science and Technology*. 11(5):433-448.

Huang K, Gonzalo R, Manzo D, Cobarrubias C. 1997. La obesidad como factor de riesgo en el desarrollo de cancer. Perú. *Peru Med Expl: Universidad Agraria La Molina*. 12 p.

Imigo F, Mansilla E, Delama I, Poblete S, Fonfach Z. 2011. Clasificación molecular del cáncer de mama. *Cuad cir*. [consultado 2018 feb 27]. 25(1):67-74. <http://mingaonline.uach.cl/pdf/cuadcir/v25n1/art10.pdf>.

NIH (Instituto Nacional del Cáncer). 2015. Factores de riesgo de cáncer. Estados Unidos. [consultado 2018 ene 23]. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/riesgo>.

Jimenez C, Serrano C, Giusti M. 2009. Caracterización de las antocianinas de los frutos de *Berberis boliviana* Lechle. [consultado 2018 mar 07]. *Red de Revistas Científicas de America Latina, el Caribe, España y Portugal*. 76-86. ISBN: 1810-634X.

Keenoy M. 2016. El consumo de arándanos y frutas ricas en compuestos fenólicos antioxidantes como fuente de sustancias activas en la prevención primaria del cáncer. 5ta ed. España. Universidad de Cataluña. ISBN: 10609/55301.

Krenek K., Barnes R, Talcott S. 2014. Phytochemical composition and effects of commercial enzymes on the hydrolysis of gallic acid glycosides in mango. *J Agric Food Chem*. [consultado 2018 may 11]. 62(39):15-21. doi: 23.1021/jf5031554.

Lakhanpal R, Deepak. 2007. Quercetin: a versatile flavonoide. *Inter Jou of Med Upda*. 2(2): 36. doi: 10.4314/ijmu.v2i2.39851.

Laszlo K. 2015. Anthocyanins. [consultado 2018 mar 11]. *J Agric Food Chem*. 1(1):12. eng. <http://semmelweis.hu/farmakognozia/files/2015/04/Anthocyanins15.pdf>.

Lingyu Y, Dehai X, Xiong X, Lai R, Song J. 2018. Proanthocyanidins against oxidative stress: from molecular mechanisms to clinical applications. *Biomed Res Int*. 10(1):11. doi: 10.1155/2018/8584136

- Marasco E, Díaz C. 2007. Biosynthesis of plant natural products and characterization of plant biosynthetic pathways in recombinant microorganisms. 2da ed. Estados Unidos. Springer Nature: Springer Netherlands. 1 vol. ISBN: 978-1-4020-6030-4.
- Martini S, Wang X, Che L, Koo M. 2017. Phenolic compounds profile and antioxidant properties of six sweet cherry (*Prunus avium*) cultivars. *J Food Res.* 97(1):15-25. doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.030
- Mertens-Talcott S, Noratto G, Chiang W. 2013. Betulinic acid decreases ER-negative breast cancer cell growth in vitro and *in vivo*: role of Sp transcription factors and microRNA-27a:ZBTB1. *Mol Carcinog.* 52(8): 591-601. doi: 10.1002/mc.21893
- Neha B, Obheroi H, Sandhu S, Bhagarv V. 2014. Influence of different solvents in extraction of phenolic compounds from vegetable residues and their evaluation as natural sources of antioxidants. *J. Food. Sci.* ISBN: 27.1007.
- Noratto G, Porter W, Byrne D, Cisneros-Zevallos L. 2009. Identifying peach and plum polyphenols with chemopreventive potential against estrogen-independent breast cancer cells. *J Agric Food Chem.* 57(12):5219–5226. eng. doi:21.1021/jf900259m.
- Nunes N, Noratto G. 2018. Dark sweet cherry (*Prunus avium*) polyphenolics as breast cancer chemopreventive natural compounds. Texas A&M. Estados Unidos.
- OMS (Organización Mundial de la Salud) 2018. El cáncer. [consultado 2018 mar 17]. Estados Unidos. <http://www.who.int/topics/cancer/es/>.
- Ortiz M, Vargas M, Chew R, Meza J. 2011. Propiedades funcionales de las antocianinas. *Revista de ciencias biológicas y de la salud.* 7 p. ISBN: 35010.
- Oszmianski J, Ramos T, Bourzeix M. 1988. Fractionation of Phenolic Compounds in Red Wine. *Am J Enol Vitic.* 39(3):259–262. [consultado 2018 abr 12]. <http://www.ajevonline.org/content/39/3/259.full.pdf>.
- Panche A, Diwan B, Chandra R. 2016. Flavonoids: an overview. *J Nutri Sci.* 5 p. 47 vol. doi: 10.1017/jns.2016.41
- Pubchem. 2009. Cyanidin 3,5-diglucoside. Estados Unidos. National Center for Biotechnology Information. [consultado 2018 feb 21]. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/44256718>.
- Rivas A, Orday K, González M, Star M. 2014. Antocianinas y actividad anti radicales libres de *Rubus adenotrichus* Schltdl (zarzamora). *Rev mex cienc.* 42(4):1-6. 4ta ed. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Saberu S, Omid M, Djomeh Z, Ahmadi H. 2013. Estimation of sweet cherry antioxidant activity and anthocyanin content during ripening by artificial neural network–assisted image processing technique. *J Food Sci.* 48(4): 735-741. doi.org/10.1111/jfs.12021

Sánchez A, Beltrán M 2015. Pigmentos en frutas y hortalizas rojas: Antocianinas. TSIA. 2(1):1-9. Universidad de las Américas, editor. Programa de doctorado de la Universidad de las Américas.

Serrano M, Lopez M, Espuñez T. 2006. Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. [consultado 2018 mar 27]. Redalyc. 37(44):58-68. UAM Xochimilco. <http://www.redalyc.org/html/579/57937408/>

Shingin L, Shun Y, Bin T, Xue L. 2009. Determination and comparison of flavonoids and anthocyanins in Chinese sugarcane tips, stems, roots and leaves. J Sep Sci. 33(9):1216-1223. doi: 10.1002/jssc.200900567

SEOM (Sociedad Española de Oncología Médica). 2014. El cáncer de mama [Internet]. España: SEOM. 2014-2018.

Tripoli E, Guardia M, Giammanco S, Majo D. 2007. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. 104(2): 466-479. J Food Chem. ISBN: 2006.11.0054.

Tsao R. 2010. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. J. Nutri.2(12): 1231-1246.

Wallace T. 2015. Anthocyanins. 6(5):620-620. J Food Chem. doi: 10.3945/an.115.009233.

Williams CA. 2006. Anthocyanins and other flavonoids. Nat Prod Rep.21(4):539-573.

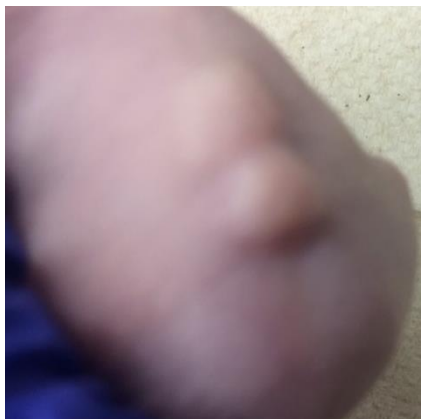
Zurita J, Díaz-Rubio ME, Saura-Calixto F. 2012. Improved procedure to determine non-extractable polymeric proanthocyanidins in plant foods. 63(8):936–939. Int J Food Sci Nutr eng. doi:10.3109/09637486.2012.681634.

7. ANEXOS

Anexo 1. Alimentación de los ratones con F2, F4 o EC por medio de sonda.



Anexo 2. Crecimiento tumoral del grupo control.



Anexo 3. Crecimiento tumoral de F4.

