



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los alimentos

Propiedades antioxidantes y anticancerígenas de la alcachofa
(*Cynara scolymus*) sobre Caco-2

Antioxidant and anticancer properties of the artichoke (*Cynara
scolymus*) on Caco-2

Autor/es

María Delgado Ovejero

Directora

María Jesús Rodríguez -Yoldi

Facultad de Veterinaria

2018-2019

Índice

1. Resumen	1
2. Introducción.....	3
2.1 Cáncer.....	3
2.1.1 Cáncer de colon.....	3
2.2 Terapias complementarias y alternativas	4
2.2.1 Vegetales utilizados en medicina alternativa.....	5
2.2.1.1 <i>Seleginella tamariscina</i>	5
2.2.1.2 Corteza de té	5
2.2.1.3 <i>Solanum muricatm</i>	6
2.2.1.4 <i>Phyllanthus orbicularis</i>	6
2.2.1.5 <i>Curcuma caesia</i>	6
2.2.1.6 <i>Taxus brevifolia</i>	6
2.2.1.7 Aceite de coco	6
2.2.1.8 <i>Cynara scolymus</i>	7
2.3 Polifenoles	8
3. Justificación y objetivos	10
4. Metodología.....	12
4.1 Extractos de <i>Cynara scolymus L.</i>	12
4.2 Línea celular Caco-2	12
4.2.1 Cultivo de la línea celular Caco-2/TC7.....	12
4.2.1.1. Materiales y métodos	13
4.2.1.2 Método.....	14
4.3 Determinación de las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias	15
4.3.1 Determinación de la capacidad antioxidante mediante el protocolo ABTS	15
4.4 Determinación de las propiedades anticancerígenas	17
4.4.1 Estudio de la viabilidad celular mediante SRB	17
4.4.2 Análisis del tipo de muerte celular.....	17
4.4.2.1 Estudio de la producción de apoptosis y/o necrosis.....	18
4.4.2.1.1 Determinación de la caspasa 3.....	19
4.4.2.2 Evaluación del ciclo celular.....	19
4.4.2.3 Medida de cambios en el potencial mitocondrial.....	20
4.4.2.4 Evaluación del nivel de especies reactivas de oxígeno (ROS)	20
4.5 Análisis estadístico de los resultados	21

5. Resultados y discusión	22
5.1 Determinación de las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias	22
5.1.1 Determinación de la capacidad antioxidante mediante el protocolo ABTS	22
4.3.2 Estudios de desnaturalización de la Albumina Sérica Bovina (ASB).....	23
5.2 Determinación de las propiedades anticancerígenas	24
5.2.1 Estudio de la viabilidad celular mediante SRB	24
5.2.2 Análisis del tipo de muerte celular.....	26
5.2.2.1 Estudio de la producción de apoptosis y/o necrosis.....	27
5.2.2.1.1 Determinación de la caspasa 3.....	28
5.2.2.2 Evaluación del ciclo celular	29
5.2.2.3 Medida de los cambios en el potencial mitocondrial	30
5.2.2.4 Evaluación del nivel de especies reactivas de oxígeno (ROS)	30
5. Conclusiones.....	32
7. Aportaciones en materia de aprendizaje.....	34
8. Bibliografía.....	35

1. Resumen

La investigación sobre el desarrollo y el tratamiento del cáncer está muy presente en la actualidad al tratarse de una de las enfermedades con mayor incidencia y tasa de mortalidad a nivel mundial, siendo el de colon el tercer tipo más común.

Los tratamientos convencionales del cáncer, como la quimioterapia o la radioterapia, resultan eficaces, pero generan diversos efectos secundarios en el paciente. Por ello, se están investigando nuevas terapias alternativas y complementarias con sustancias naturales que sean menos agresivas, para así reducir o eliminar los efectos secundarios. Entre estas nuevas terapias destacan residuos de la industria alimentaria con potencial aplicación terapéutica por sus múltiples propiedades beneficiosas para el organismo. Por tanto, el objetivo de este Trabajo de Fin de Grado consistió en evaluar las propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas de dos fracciones de extractos de las hojas externas de la alcachofa (*Cynara scolymus*) sobre células del carcinoma de colon humano (Caco-2/TC7). Para evaluar su actividad antiinflamatoria se realizaron estudios de la desnaturalización de la albúmina sérica bovina; su capacidad antioxidante se determinó mediante el ensayo ABTS; y las propiedades anticancerígenas se evaluaron mediante la técnica SRB, citometría de flujo y medida de la producción de especies reactivas de oxígeno.

Aunque ninguna de las fracciones posee propiedades antioxidantes ni antiinflamatorias, la Fracción 1 destacó por su potencial anticancerígeno. Si bien la Fracción 2 carecía de selectividad puesto que ocasionó la muerte de enterocitos sanos, la Fracción 1 causó la muerte no apoptótica de las células Caco-2 sin dañar las células no tumorales. En cuanto a su mecanismo de acción, se observó un efecto prooxidante relacionado con daños en la membrana mitocondrial de las células cancerígenas. Estos resultados permitieron concluir que los extractos de hojas externas de alcachofa podrían ser aplicados en quimioterapia.

Abstract

Given the high rates of incidence and mortality related to cancer, researching on the development and treatment of this disease is a hot topic nowadays, with colon cancer being the third most common type.

Conventional cancer treatments such as chemotherapy or radiation therapy, despite effective, induce deleterious side effects in the patient. Therefore, new complementary and alternative therapies with natural compounds are under investigation in order to reduce or eliminate those side effects due to their lesser harmful nature. In this line, by-products of food industry might be of interest in therapy because of their beneficial properties to human health. Therefore, the objective of this final year project consisted in evaluating the antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties of two fractions of extracts from the outer leaves of artichoke on human colorectal adenocarcinoma cells (Caco-2/TC7). Denaturation of bovine serum albumin was performed to evaluate anti-inflammatory activity; antioxidant capacity was determined by the ABTS assay; and anticancer activity was evaluated with the SRB method, flow cytometry assays and measurement of reactive oxygen species levels.

Although none of the fractions showed antioxidant nor anti-inflammatory properties, Fraction 1 displayed strong anticancer activity. Whereas Fraction 2 lacked selectivity since it triggered healthy enterocytes cell death, Fraction1 induced non-apoptotic cell death on tumor cells without changes in non-tumor cell viability. Regarding to its mechanism of action, a prooxidant effect was observed related to damage to the mitochondrial membrane of cancer cells. Therefore, these data suggest that the extracts of the external leaves of artichoke might be used with chemotherapeutic purposes.

2. Introducción

2.1 Cáncer

El cáncer supone alrededor de un 13% de los fallecimientos a nivel mundial, siendo una de las principales causas de muerte. El cáncer de pulmón, el cáncer de mama y el cáncer de colon son los tres tipos de cáncer más comunes, seguidos del cáncer de próstata y cáncer de estómago (OMS, 2018).

El cáncer se define como el desarrollo y crecimiento descontrolado de células anormales en cualquier parte del cuerpo, que da lugar a un tumor. Cuando dichas células cancerígenas son capaces de invadir otros tejidos u órganos, se trata de un tumor maligno con metástasis. El desarrollo de esta enfermedad está vinculado a la activación de los oncogenes y/o la inactivación de los genes supresores de tumores, lo que conlleva una serie de modificaciones genéticas en la célula durante su periodo de crecimiento (Sarkar *et al.*, 2013).

Los principales factores de riesgo del cáncer son el consumo de tabaco y alcohol, la inactividad física y la alimentación inadecuada. Por tanto, cabe destacar, que entre el 30 y el 50% de los casos de cáncer se podrían evitar, aplicando estrategias preventivas de base científica que redujeran dichos factores de riesgo (OMS, 2018).

2.1.1 Cáncer de colon

La mayoría de los cánceres del colon se originan a partir de pólipos adenomatosos, que crecen en el revestimiento interno del colon y, pueden extenderse hacia la pared de este, causando la entrada de células cancerosas en los vasos sanguíneos o linfáticos. De esta manera, la enfermedad se puede propagar a distintas partes del cuerpo y dar lugar en determinadas ocasiones a metástasis (ACS, 2018).

El cáncer de colon causa 700.000 muertes al año, lo que le convierte en el tercer tipo de cáncer más común en el mundo. Además, supone el cáncer con mayor incidencia en España, con 41.441 casos nuevos cada año. En cuanto a diferencia de género, el riesgo de padecer cáncer colorrectal a lo largo de la vida es ligeramente superior en varones (4,49%) que en mujeres (4,15%). A pesar de todo ello, la tasa de mortalidad a causa de esta enfermedad ha descendido en las últimas décadas debido principalmente a los nuevos métodos de diagnóstico, que permiten detectar los tumores en fases muy

tempranas de desarrollo, en las que el tratamiento suele responder más favorablemente. (ACS, 2018; AECC, 2018; Mármol *et al.*,2017).

Los factores que desencadenan el cáncer de colon pueden clasificarse en dos tipos: modificables y no modificables. Los factores no modificables son mutaciones hereditarias que, por tanto, no pueden ser evitadas. Sin embargo, los factores modificables, que representan la gran mayoría de los casos, son consecuencia del comportamiento del individuo entre los cuales destacan: el sedentarismo, la obesidad y una dieta desequilibrada, deficiente en frutas y verduras (Mármol *et al.*,2017).

Existen dos clases principales de tratamientos para combatir el cáncer de colón, la utilización de uno u otro depende del tipo y del estadio de desarrollo. Por un lado, las denominadas terapias locales (cirugía, radioterapia y ablación), son aquellas que tratan al tumor sin afectar al resto del organismo, siendo de gran utilidad cuando el tumor se encuentra en una fase temprana. Por otro lado, las terapias sistémicas, comúnmente denominadas quimioterapia, consisten en el uso de fármacos administrados por vía oral o intravenosa cuyo fin es producir la muerte de las células tumorales, aunque tienen efectos secundarios sobre los tejidos sanos (NIH, 2017). Otro tipo de tratamiento oncológico, cada vez más extendido entre los pacientes, es el uso de la medicina alternativa y complementaria (Dissiz & Yilmaz, 2016).

2.2 Terapias complementarias y alternativas

La medicina complementaria es utilizada por el 65% y 85% de la población mundial en los países desarrollados como fuente de atención primaria de salud (OMS, 2018). Además, según un estudio realizado por Molassiotis *et al.*, (2005), el 34% de los enfermos de cáncer españoles utilizan terapias complementarias y alternativas. La Organización Mundial de la Salud (OMS) apoya a los Estados Miembros en el desarrollo de sus propias políticas nacionales para la integración de este tipo de terapias (OMS, 2018).

La medicina complementaria hace referencia a terapias que se utilizan junto con tratamientos estándar, mientras que medicina alternativa se considera cualquier tratamiento que sustituye a dichos tratamientos estándar. La acupuntura, los productos botánicos o herbarios, las terapias psicosomáticas y masaje, las terapias farmacológicas y las terapias nutricionales son las técnicas complementarias y alternativas más utilizadas (NIH, 2017).

Los principales factores que declinan a los pacientes a utilizar técnicas de medicina complementaria o alternativa son las mejoras en el bienestar físico y psicosocial, así como a un aumento de la esperanza de superar la enfermedad. Es importante destacar que muchos enfermos también deciden empezar con estas terapias debido a la insatisfacción por algunos métodos de la medicina convencional o por la desesperación (Molassiotis *et al.*, 2005).

La principal ventaja de la medicina complementaria o alternativa es la reducción o ausencia de efectos secundarios en el organismo debido principalmente a la utilización de sustancias de origen vegetal, dado que estos compuestos son bien tolerados por formar parte de la dieta. En este sentido, se ha demostrado que una elevada variedad de sustancias naturales son capaces de inducir la muerte de células tumorales sin dañar los tejidos sanos. En relación a la fuente de dichas sustancias, pueden ser obtenidas tanto de partes comestibles de plantas como no comestibles, siendo de especial interés aquellas partes desechadas por la industria alimentaria (Taraphdar *et al.*, 2001).

2.2.1 Vegetales utilizados en medicina alternativa

Actualmente, alrededor del 25% de las recetas médicas contienen uno o más ingredientes activos derivados de plantas (Pan *et al.*, 2013) y de los 175 medicamentos existentes contra el cáncer en Estados Unidos, el 75 % son de origen natural (Newman & Cragg, 2007). A continuación, se citan algunos ejemplos destacados.

2.2.1.1 *Seleginella tamariscina*

Seleginella tamariscina (Beauv.), con el nombre popular “Koeun Back”, es una planta medicinal tradicional utilizada para pacientes con cáncer avanzado en el Oriente. Se ha demostrado que modifica la expresión génica que da lugar a dicha enfermedad. (Taraphdar *et al.*, 2001).

2.2.1.2 Corteza de té

Los indios nativos de la región amazónica utilizan corteza de té para el tratamiento de una variedad de trastornos de salud, como el cáncer, la artritis y otras enfermedades infecciosas. Se demostró que los extractos de esta planta contienen citostáticos y actividad antiinflamatoria (Taraphdar *et al.*, 2001).

2.2.1.3 *Solanum muricatm*

Los extractos de *Solanum muricatum* son otro ejemplo de medicina alternativa, debido a su capacidad apoptótica en las células cancerígenas de próstata, estómago, hígado, mama, ovario, colon y pulmón (Taraphdar *et al.*, 2001).

2.2.1.4 *Phyllanthus orbicularis*

Phyllanthus orbicularis, una planta del género *Phyllanthus*, es utilizada en medicina alternativa por su actividad antiviral contra el virus de la Hepatitis B. Además, el extracto acuoso de esta planta puede inducir apoptosis en células cancerígenas de ovario en hámsters (Taraphdar *et al.*, 2001).

2.2.1.5 *Curcuma caesia*

Curcuma caesia es una hierba medicinal perenne perteneciente a la familia Zinigeraceae. El aceite obtenido de la hoja de este vegetal se utiliza para el tratamiento de enfermedades articulares como artritis y reumatismos, y tiene propiedades antimicrobianas contra algunas bacterias y hongos patógenos, como *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Aspergillus fumigatus*. Además, destaca por su elevada actividad antioxidante por su alto contenido fenólico y flavonoide (Borah *et al.*, 2019)

2.2.1.6 *Taxus brevifolia*

En 1964, el Instituto Nacional de Cáncer (NCI), comprobó que los extractos de la corteza de *Taxus brevifolia* producían un efecto tóxico en los cultivos de células de leucemia, aunque el compuesto responsable de su citotoxicidad fue determinado en 1967 por Mansuck C.Wani y Monroe E. Wall, y lo denominaron Taxol. A partir del Taxol se obtuvieron dos medicamentos, el Paclitaxel y el Docetaxel, ambos utilizados en la actualidad en quimioterapia, para el tratamiento de tumores pulmonares, mamarios, ováricos, prostáticos o estomacales entre otros (Martínez *et al.*, 2016).

2.2.1.7 *Aceite de coco*

El aceite de coco podría utilizarse como una alternativa no farmacológica a la muerte neuronal, debido a su influencia positiva a nivel cognitivo en los pacientes con Alzheimer. Este hecho podría deberse a la proporción significativa de triglicéridos de cadena media en el aceite de coco, los cuáles suponen una fuente directa de energía celular (Hu Yang *et al.*, 2015).

2.2.1.8 *Cynara scolymus*

Cynara scolymus L., comúnmente conocida como alcachofa, es una planta herbácea perenne de la cuenca mediterránea, perteneciente a la familia Asteraceae (Bianco, 2005). La alcachofa se consume en crudo, hervida, cocida al vapor o frita y es utilizada en multitud de sopas y guisos. Este vegetal se considera saludable y nutritivo, debido a su capacidad antioxidante y hepatoprotectora (Gebhardt and Fausel, 1997).

Tabla 1. Composición nutricional de *Cynara scolymus* L (g por cada 100 g de parte comestible) (USDA, 2013).

Nutriente	g/100 g parte comestible	Nutriente	g/100 g parte comestible
Agua (g)	84,94	Hierro (mg)	1,28
Energía (Kcal)	47	Fósforo (mg)	90
Grasas (g)	0,15	Potasio (mg)	370
Proteínas (g)	3,27	Sodio (mg)	94
Carbohidratos (g)	10,51	Ácido ascórbico (mg)	11,7
Cenizas (g)	1,13	Tiamina (mg)	0,072
Azúcares (g)	0,99	Niacina (mg)	1,046
Colesterol (mg)	0	Vitamina E (mg)	0,19
Fibra (g)	5,4	Riboflavina (mg)	0,066
Calcio (mg)	44	Ácido pantoténico (mg)	0,338
Magnesio (mg)	60	Vitamina B-6 (mg)	0,116

En la Tabla 1 se muestra la composición de *Cynara scolymus* L, que como se puede observar, contiene un bajo porcentaje de grasa, un alto contenido en hidratos de carbono y una importante proporción de fibra y proteínas, así como una elevada humedad. Dentro de su composición en carbohidratos, el más abundante es la inulina, un oligopolímero de fructosa con propiedades prebióticas y bifidobacterianas (Lattanzio *et al.*, 2009). Además, contiene altos niveles de minerales, como potasio, sodio, magnesio, fósforo y calcio, así como de vitamina C, flavonas y polifenoles, siendo estos últimos los principales contribuyentes a su actividad antioxidante (Ahmad, 2014).

Los polifenoles de *Cynara scolymus* L se encuentran principalmente en las hojas, en forma glucosídica de flavonoides, como la apigenina y luteolina. La parte comestible

también contiene diversos polifenoles, como el ácido hidroxicinámico y el ácido mono y di cafeoilquínico (Mileo *et al.*, 2001).

2.3 Polifenoles

Los polifenoles, caracterizados por la presencia de un grupo fenol por molécula, son un grupo heterogéneo de metabolitos secundarios de las plantas, que realizan distintas funciones fisiológicas, entre las que destaca su capacidad antioxidante. Se encuentran en la gran mayoría de verduras y frutas, así como en el aceite de oliva y el vino. Su contenido varía en función del genotipo, especie, condiciones ambientales, grado de madurez, composición del suelo, ubicación geográfica y las condiciones de almacenamiento. Los seres humanos pueden llegar a consumir hasta un gramo de polifenoles por día mediante una dieta equilibrada y saludable (Taraphdar *et al.*, 2001; Valencia *et al.*, 2017).

Los polifenoles se clasifican en flavonoides y no flavonoides. Los flavonoides se dividen a su vez en flavonoles, flavonas, flavon 3-ols, isoflavonas, flavoanonas, dihidroflavonoles, ancianidinas y chalconas. Los no flavonoides, por su parte, son los ácidos hidroxibenzoicos y, hidroxicinámicos (Gonçalves *et al.*, 2013).

Los polifenoles tienen diversos efectos beneficiosos en la prevención y el tratamiento de determinadas enfermedades, como la dislipidemia, la resistencia a la insulina, la hipertensión, la intolerancia a la glucosa, la inflamación sistémica y el estrés oxidativo, además de retrasar la aparición de aterosclerosis. Todo ello debido fundamentalmente a su capacidad antioxidante, disminuyendo y eliminando la formación de radicales libres, así como a su capacidad antiinflamatoria y antimicrobiana (Upadhyay & Dixit, 2015).

Por otra parte, los polifenoles son considerados compuestos bioactivos con propiedades anticancerígenas. Mileo y Di venere (2016) demostraron que dosis altas de extractos de la parte comestible de la alcachofa, reducían e inhibían la viabilidad celular de células cancerígenas de mama, cuyo efecto citotóxico estaba mediado por la inducción de apoptosis. Esto es debido a la capacidad de los polifenoles para comportarse como prooxidantes e inducir la rotura del ADN y consecuentemente, la apoptosis en células neoplásicas. Es decir, los polifenoles generan determinadas cantidades de especies reactivas de oxígeno (ROS) que dan lugar a un mayor nivel de estrés oxidativo en las células malignas lo que provoca la detención de su crecimiento, sin afectar a las células no tumorales (Mileo *et al.*, 2001).

Por tanto, se puede concluir que los polifenoles poseen una acción dual en referente a los niveles redox de las células, ya que pueden actuar como antioxidantes o prooxidantes dependiendo de diversos factores como la concentración de los polifenoles o los niveles redox de la propia célula. Esto permite que los polifenoles sean responsables del efecto preventivo antes mencionado, al actuar como antioxidantes, así como de la capacidad de inducir muerte en las células tumorales mediante la generación de ROS (Jukić *et al.*, 2015)

Además, los polifenoles podrían resultar de gran interés por su capacidad de inducir apoptosis en células madre cancerígenas, que, en muchos casos, son las causantes de recaídas de un tumor o de resistencia a determinadas terapias (Mileo *et al.*, 2001).

3. Justificación y objetivos

La utilización de extractos vegetales en medicina alternativa y complementaria para curar y prevenir determinadas enfermedades siempre ha estado presente en casi todas las culturas, por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias e incluso anticancerígenas. Actualmente, algunos extractos derivados de plantas se encuentran bajo estudio dado que actúan frente a células tumorales potencialmente relevantes en medicina. Sin embargo, las terapias naturales no se someten a los mismos controles de calidad y hay una menor supervisión que en el caso de los tratamientos convencionales. Por ello, son necesarios estudios que profundicen en los efectos terapéuticos de las medicinas alternativa y complementaria.

Las terapias convencionales para combatir el cáncer como la radioterapia y la quimioterapia eliminan las células cancerígenas mediante la utilización y modulación de los niveles de ROS. Sin embargo, estos tratamientos conllevan determinados efectos secundarios perjudiciales para la salud de los enfermos, como náuseas, vómitos, pérdida temporal del cabello, cansancio y mayor probabilidad de padecer infecciones. En este sentido, diversos estudios apoyan la posibilidad de aplicar nuevas estrategias terapéuticas igualmente eficaces que las convencionales, pero con la ventaja de ser menos agresivas para los pacientes. De esta manera, se están llevando a cabo numerosos proyectos que estudian las propiedades de los polifenoles, los cuales parecen poseer un carácter anticancerígeno muy prometedor.

Los polifenoles, además de poseer propiedades anticancerígenas, tienen una elevada capacidad antioxidante, que los hace realmente interesantes en el ámbito científico para el estudio de la prevención de determinadas enfermedades. *Cynara scolymus L.* ha sido utilizada en gran cantidad de estudios por su elevado contenido en flavonoides, lo que podría ser beneficioso para el futuro de la industria farmacéutica. Con el fin de profundizar en dichos estudios, y dado que en la actualidad su potencial de aplicación en el tratamiento del cáncer de colon no ha sido investigado, en el presente Trabajo Fin de Grado se analizó el potencial terapéutico de las hojas externas de este vegetal, que no son aptas para el consumo. La importancia de estos extractos no comestibles que descarta la industria agroalimentaria radica en que son una fuente de compuestos bioactivos muy importante, lo cual es debido a tres aspectos fundamentales: contienen las

mismas moléculas con potencial terapéutica que las partes comestibles; su uso con fines farmacéuticos, al contrario que el de las partes comestibles, no comporta problemas éticos debido a la epidemia de hambruna; y por último, son una materia prima muy barata cuyo uso permite la creación de nuevos puestos de trabajo.

Por tanto, el objetivo principal de este Trabajo de Fin de Grado es estudiar las propiedades antioxidantes y anticancerígenas de extractos de *Cynara scolymus L.*, sobre células de carcinoma de colon humano (Caco-2). Consecuentemente, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Analizar el posible efecto antiinflamatorio y antioxidante de los extractos de las hojas externas de las hojas de *Cynara scolymus* mediante dos ensayos *in vitro*, desnaturalización de la albúmina y ABTS.
- Evaluar la acción citotóxica de los extractos de las hojas externas de *Cynara scolymus* sobre células del cáncer de colon (células Caco 2 indiferenciadas) y sobre un modelo *in vitro* de la barrera intestinal (células Caco 2 diferenciadas), utilizando la tinción de sulforrodamina B (SRB) para determinar la selectividad de estos.
- Estudiar el tipo de muerte celular (apoptosis o necrosis) inducida por los extractos de las hojas externas de las hojas *Cynara scolymus* sobre células del cáncer de colon (células Caco 2 indiferenciadas) mediante citometría de flujo, así como los cambios en la activación de caspasas y en el potencial mitocondrial.
- Medir cambios en los niveles de ROS en células del cáncer de colon (células caco 2 indiferenciadas) tras ser incubadas con los extractos de las hojas externas de las hojas *Cynara scolymus* para determinar su posible mecanismo de acción.

Este trabajo de investigación está vinculado a un Proyecto Europeo (Redvalue-Sudoe) que busca el aprovechamiento de residuos forestales y/o procedentes de las industrias agroalimentarias con fines terapéuticos. Este proyecto está integrado por Universidades, Centros Tecnológicos y Empresas Agroalimentarias de Francia, Portugal y España, entre las que se encuentra la Universidad de Zaragoza.

4. Metodología

4.1 Extractos de *Cynara scolymus L.*

Los extractos de *Cynara scolymus L.* empleados en este trabajo fueron suministrados por la Universidad Pública de Navarra. El extracto total de *Cynara scolymus L.* se purificó mediante extracción en fase sólida y de esta manera se obtuvieron dos fracciones, F1 y F2. F1 está compuesta principalmente por ácidos hidroxicinámicos (especialmente por ácido clorogénico), mientras que F2 contiene elevada proporción de flavonoides (fundamentalmente luteolina y sus derivados).

La disolución madre 1 correspondiente a la Fracción 1 de *Cynara scolymus L.* y la disolución madre 2 correspondiente a la Fracción 2 de *Cynara scolymus L.*, se prepararon añadiendo 1 mg de dichas fracciones en 1 mL de medio de cultivo, respectivamente, obteniendo en ambas una concentración de 1000 µg/mL.

4.2 Línea celular Caco-2

Las células empleadas en este proyecto pertenecen a la línea celular Caco-2, establecida en 1974 y proveniente de las células epiteliales de adenocarcinoma colorrectal humano (Fogh & Trempe, 1975). Esta línea celular es la única que permite desarrollar una diferenciación morfológica y funcional a enterocitos normales de manera espontánea en el momento en que alcanza la confluencia, aproximadamente siete días después de la siembra (Caro *et al.*, 1995). Para la realización de este trabajo se ha empleado concretamente el clon TC7 de la línea celular Caco-2, procedente de pasajes tempranos (entre 30 y 50) para proporcionar una mayor estabilidad. Además, se ha trabajado tanto con células indiferenciadas, como diferenciadas.

4.2.1 Cultivo de la línea celular Caco-2/TC7

El cultivo celular se define como la obtención de células, tejidos y órganos de animales y plantas y su posterior mantenimiento *in vitro* en un medio idóneo y controlado, que permite conservar al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas, así como su supervivencia y/o proliferación. El cultivo celular debe situarse en un medio de cultivo adecuado, compuesto por aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas, glucosa y suero. Además de estos nutrientes, el medio de cultivo también debe proporcionar la osmolaridad y el pH adecuado (Arora, 2013).

4.2.1.1. Materiales y métodos

Los estudios de los cultivos celulares se realizan en una cabina de flujo laminar recirculante vertical de clase II (Telstar AV-100, Telstar, Madrid, España) con el objetivo de proporcionar la seguridad y protección adecuada al operario que manipula dichos cultivos celulares. Previamente a su utilización diaria, la campana se esteriliza con luz ultravioleta durante 30 minutos, y posteriormente, se limpia con etanol al 70%. Además, el flujo de aire de la cabina se conecta diez minutos antes para mantener las condiciones de esterilidad durante la el trabajo de las líneas celulares de Caco-2/TC7. Así mismo, todo el material de trabajo debe estar debidamente esterilizado.

Además, se utiliza un baño termostático (Digiterm 100, Selecta, Cham, Suiza) al inicio de cada experimento nuevo, con la finalidad de atemperar los medios a 37°C cuando se retiran de la nevera y evitar así el daño térmico sobre las células.

Por otro lado, se dispone de un microscopio de luz invertida (Olympus CK2, Microscope International, New York, E.E.U.U), para visualizar y llevar a cabo el recuento de las células en suspensión previo a una nueva siembra; así como de una centrífuga (Centrifuge 5810R, Eppendorf, Madrid, España) con rotor para tubos cónicos, para centrifugar el cultivo celular inicial y el cultivo celular tratado con tripsina, y así, permitir en este último, la recogida del precipitado de células.

La cámara de Neubauer se utiliza para llevar a cabo el recuento de células en el medio de cultivo, con el objetivo de calcular los volúmenes necesarios de células en suspensión para realizar la siembra de células en nuevas cajas. Esta cámara consiste en un portaobjetos con dos zonas que contienen una cuadrícula cada una. El colorante azul Trypan (SIGMA ® T8154, España), tiñe únicamente las células muertas ya que sólo puede acceder a estas cuando su membrana está rota. Sin embargo, las células vivas se observan como círculos blancos porque el colorante no se puede introducir en ellas. Posteriormente, el medio con el colorante se introduce en cada uno de estos dos espacios. A continuación, se coloca el portaobjetos, se observa en el microscopio y se realiza el recuento de células. De esta manera, conociendo el volumen añadido, se puede calcular la concentración de las células del medio:

Concentración de las células → $\text{células}/\mu\text{L} = (\text{células contadas}) [(\text{superficie contada} (\text{mm}^2) * \text{Profundidad de la cámara (mm)}) * \text{dilución}]$

Las células Caco-2/TC7 se mantienen en cultivo en una estufa de incubación (Haeraus BB16, Hanau, Alemania) a una temperatura de 37°C y una atmósfera humidificada con un 90% de aire y un 10% de CO₂, mientras que los medios de cultivo se conservan en una nevera entre 0 - 4°C.

El medio de cultivo empleado es el Medio Esencial Mínimo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco Invitrogen, Madrid, España). El medio de cultivo de mantenimiento está compuesto por 25 mM de glucosa y suplementado con un 20% de suero fetal bovino (SFB), un 1 % de penicilina (1000 UI/mL) – Estreptomicina (10 mg/mL), 1 % de aminoácidos esenciales 10 mM, 2 % de L-glutamina 200 mM y 1 % de Anfotericina. Sin embargo, el medio de tratamiento es el mismo, pero no contiene el suplemento de SFB, ya que al ser una mezcla compleja de proteínas es posible que las moléculas de los extractos interactúen con ellas con mucha afinidad y no lleguen a entrar en las células, lo cual daría falsos negativos.

4.2.1.2 Método

El primer paso para comenzar el cultivo celular es descongelar lentamente el vial de células y conservado en nitrógeno, introduciéndolo en agua caliente a 37°C. Este vial contiene $1-3 \times 10^6$ células, en un volumen de 1,5 mL de medio de cultivo con un 30% de SFB y un 10% de glicerol. Posteriormente, cuando las células estén descongeladas, se diluyen en 5 ml de medio de cultivo y se centrifugan a 3000 rpm/5 minutos. Por último, se elimina el sobrenadante y las células se resuspenden en 5 ml de medio de cultivo para ser introducidas en una caja de 25 cm². Una vez realizado estas operaciones, se introducen a la estufa de 37°C.

El cambio de medio se realiza a las 72 horas después de la siembra, para asegurar que las células queden adheridas a la pared de la caja. Para ello, se sacan las cajas en las que se ha realizado el cultivo y se llevan a la campana de flujo laminar. Allí, se aspira el medio con una pipeta pasteur conectada a una bomba de vacío, teniendo cuidado de no retirar las células. Posteriormente, con una pipeta estéril, se introducen 5 mL de medio de cultivo y se lleva a incubar a la estufa de 37°C, dejando el tapón flojo para permitir la entrada de gas.

Para el mantenimiento de la línea celular Caco-2, se lleva a cabo la tripsinización. Esta operación se realiza antes de la confluencia, cuando las células ocupan el 60-70% de la superficie y cada 6-7 días. Para ello, se sacan las cajas en las que se ha realizado el

cultivo y se llevan a la campana de flujo laminar. Allí, se retira el medio de cultivo por aspiración y se añaden 5 mL de solución de tampón fosfato salino (PBS) diluida (100 mL PBS 10X, 400 ml agua destilada). Posteriormente, se aspira el PBS y se agregan 2 mL de la solución de tripsina (50 ml agua destilada, 5,5 ml PBS 10X, 7,7 mL tripsina 10X, 7,7 ml EDTA 10 mM) y se incuba a 37°C durante 10 minutos, manteniendo la tapa de la caja cerrada. Una vez concluido el tiempo, se retira la caja de la estufa y se desprenden las células de la superficie de la caja con ligeros toques. Se homogeniza con la pipeta y se toman las células en suspensión para colocarlas en un tubo cónico estéril con 10 ml de medio de cultivo. En este tubo se homogeneiza 4 -5 veces y se centrifuga a 3900 rpm/5 min. Posteriormente, se lleva a la campana, donde se aspira el sobrenadante del tubo que contiene las células, se agregan 10 ml de medio nuevo a dicho tubo (atemperado previamente a 37°C) y se homogeneiza con la pipeta (Álvarez, 2017).

La determinación de la densidad celular se lleva a cabo en la cámara de Neubauer. Se toman 0,5 ml de la mezcla de células con el medio de cultivo y se coloca en un Eppendorff. De este tubo se toman 20 µl y se llevan a otro Eppendorff, al que se agregan 100 µl de colorante azul Trypan, obteniendo una dilución de células 1:6. Posteriormente, se homogeneiza con la pipeta evitando formar burbujas. Se toma la muestra para colocarla en la cámara de Neubauer y se cuentan las células presentes en las dos cuadrículas pequeñas del centro para obtener la media entre los dos valores mediante el microscopio de luz invertida. A continuación, se calculan los mililitros necesarios para realizar la siembra según lo descrito en el apartado 4.2.1.1.. La siembra puede realizarse en cajas de 25 cm² o en placas de 96 pocillos (Sarsted), dependiendo del tipo de ensayo a realizar. Mientras que las cajas de 25 cm² deben contener 300.000 células, en las placas de 96 pocillos, se siembran 4.000 células/pocillo (cada pocillo contiene un volumen de 100 µl), un total de 400.000 células aproximadamente (Álvarez, 2017).

4.3 Determinación de las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias

4.3.1 Determinación de la capacidad antioxidante mediante el protocolo ABTS

El protocolo ABTS es un método práctico, rápido, de elevada sensibilidad y muy estable que sirve para determinar la capacidad que tiene un compuesto de captar radicales libres. La reacción se basa en la reducción del compuesto incoloro, 2,2-azinobis (3 -ethylbenzothiazoline-6 sulfonic acid) (ABTS), en presencia de persulfato de potasio, dando lugar al radical catiónico ABTS que es de color verde-azul. Sin

embargo, si se añade un compuesto antioxidante, este proceso se revierte y la intensidad de color verde disminuye. Es decir, cuanto mayor actividad antioxidante tenga la muestra, menor absorbancia se va a obtener (Pereira, 2016).

Para comenzar, se prepara la solución de ABTS y se deja reposar durante 12-16 horas a temperatura ambiente y protegida de la luz. Una vez transcurrido este tiempo, se realiza una primera medida de absorbancia para determinar el porcentaje de radical con el que se trabaja. Posteriormente, en una placa de 96 pocillos se añaden los reactivos siguiendo este orden:

Tabla 2. Reactivos del protocolo ATBS (Moon, 2009)

Reactivo	[Antioxidante]	Blanco	Control (100%)	Blanco (100%)
Solvente orgánico (µl)	0	225	25	250
Antioxidante (µl)	25	25	0	0
ABTS (µl)	225	0	225	0

Después se incuba la placa durante 3 minutos a temperatura ambiente y, por último, se mide la absorbancia a 405 nm con previa agitación (Moon & Shibamoto, 2009).

4.3.2 Estudios de desnaturalización de la Albumina Sérica Bovina (ASB)

El potencial antiinflamatorio de los extractos de *Cynara scolymus L.* se analizó mediante su capacidad para revertir la desnaturalización de la proteína modelo albúmina sérica. Esta proteína se somete a temperaturas que provocan su desnaturalización (70°C), imitando lo que ocurre cuando hay una etapa de inflamación prolongada en el cuerpo. Si el compuesto es capaz de revertir este proceso, se puede considerar antiinflamatorio.

Para comenzar, se prepara la solución madre de ASB al 0,2 % p/v en tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) buffer (pH 6,8), y posteriormente, las disoluciones de muestra a distintas concentraciones (32,5-500 µg/mL). A continuación, se prepara la mezcla de la reacción, aplicando 200 µL de la solución de ASB, 1400 µL de PBS y 1000 µL de la muestra de ensayo. En el control negativo, en vez de añadir muestra, se toman 1000 µL de agua destilada. Después, las mezclas se incuban durante 5 minutos a 37°C, y una vez transcurrido este tiempo, se calientan a 70°C durante 5 minutos. Una vez transcurridos los 5 minutos, se deja enfriar a temperatura ambiente

durante 15 minutos. Por último, se pasan 100 µL de las distintas mezclas de reacción a diferentes pocillos de una placa de 96 pocillos, respectivamente y se mide la absorbancia de las muestras a 660 nm. El porcentaje de desnaturalización se calcula siguiendo esta fórmula: % Inhibición de desnaturalización = $(Ab_{Scontrol} - Ab_{Smuestra}) / Ab_{Scontrol} * 100$ (Osman *et al.*, 2016).

4.4 Determinación de las propiedades anticancerígenas

4.4.1 Estudio de la viabilidad celular mediante SRB

Este método, rápido y sencillo, permite estimar la viabilidad celular de manera indirecta, debido a que el colorante sulforrodamina B (SRB) (Sigma-Aldrich S1402) tiñe las proteínas totales, de modo que, a mayor coloración, mayor es la masa celular (Jiménez *et al.*, 2016).

El medio inicial contenido en el cultivo celular de la placa de 96 pocillos, se aspira y se reemplaza la mitad superior de la placa por el medio (sin suero bovino fetal) (100 µl en cada pocillo) que contiene la Fracción 1 de *Cynara scolymus L.* y la mitad inferior por el medio (sin suero bovino fetal) (100 µl en cada pocillo) que contiene la Fracción 2, respectivamente, en concentraciones de 0 a 1000 µg/mL. Posteriormente, se incuba durante 72 horas a 37°C. Una vez transcurrido este tiempo, se retira la placa con el cultivo celular de la estufa y se lleva a la campana para aspirar el medio de cultivo. Posteriormente, se añaden 100 µl de ácido tricloroacético (TCA) (Sigma T6399, España) al 10% en cada pocillo y se incuba 1 hora a 4°C. Después, se retira el TCA por aspiración y se lava cada pocillo 5 veces con agua. Una vez realizado el paso anterior, se añaden 100 µl de SRB al 0,4 % y se incuba de 10 a 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se aspira el SRB y se lava 5 veces con ácido acético (SIGMA 695092, España) al 1% con un volumen de 50 µl por pocillo. Después, se añade 100 µl de TRIS base (SIGMA T1503, España) 10 mM pH 10,5 y se agita durante 5 minutos para solubilizar el colorante. Por último, se lee la absorbancia a 492 nm en el espectrofotómetro (SPECTROstar^{Nano}, BMGlabtech, Alemania) (Jiménez *et al.*, 2016)

4.4.2 Análisis del tipo de muerte celular

Los estudios del tipo de muerte celular se llevan a cabo mediante citometría de flujo, técnica de análisis celular que permite medir determinadas características físicas y químicas de las células mediante la fluorescencia emitida por las tinciones, el uso de

sondas fluorescentes y/o de anticuerpos sobre las mismas (Martinez *et al.*, 2016). Estos estudios se realizan en el Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA).

Las muestras deben ser preparadas previamente antes de trasladarlas al citómetro de flujo. El primer paso es sembrar en dos cajas de 25 cm² (una de control, y otra de tratamiento) las células, e incubarlas a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, se sacan las cajas de la estufa, se aspira el medio y se introduce el medio de tratamiento. Únicamente en la caja de tratamiento se añade 200 µL de la disolución madre, para obtener una concentración de *Cynara scolymus L.* al 40 µM (concentración obtenida con el IC₅₀). Posteriormente, se incuban las cajas a 37°C durante 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo, se sacan las cajas de la estufa y se introduce el medio en un tubo Falcón. Por último, se lleva a cabo el proceso de tripsinización en las cajas, y las células obtenidas se juntan con las del medio de cultivo introducidas en el tubo Falcon. De esta manera, las muestras ya están preparadas para llevar a cabo la citometría de flujo (Álvarez, 2017).

4.4.2.1 Estudio de la producción de apoptosis y/o necrosis.

La muerte celular se produce, principalmente, por dos vías diferentes, necrosis o apoptosis, lo cual puede determinarse por citometría de flujo. La necrosis es consecuencia de una lesión celular masiva, mientras que la apoptosis es un proceso de muerte celular programado por la propia célula (Adolfo, 2002). Mediante la doble tinción anexina V-FITC y yoduro de propidio y citometría de flujo, es posible determinar el número de células vivas, necróticas y apoptóticas de un cultivo celular; estas últimas, además, pueden clasificarse en células que han entrado en apoptosis temprana o en apoptosis tardía (Álvarez, 2017).

Previamente, las muestras se preparan para ser trasladadas al citómetro de flujo del CIBA. Posteriormente, las células se lavan dos veces con PBS y se resuspenden en anexina V tampón de unión (10mM Hapes/NaOH, pH 7,4, 140mM NaCl, 2,5mM CaCl₂), 5 µL de anexina V-FITC y 5 µL de PI por cada 100 µL de suspensión celular. Por un lado, la anexina se une, en presencia de Ca²⁺, a la fosfatidilserina, un fosfolípido que se sitúa en la cara interna de las membranas celulares, pero cuando se produce apoptosis, se coloca en el exterior de dichas membranas. Y, por otro lado, PI se une al ADN de aquellas células que han sufrido daños irreparables en su membrana, es decir,

aquellas células con necrosis o que se encuentran en una etapa tardía del proceso apoptótico. Posteriormente, se incuba el conjunto a temperatura ambiente (22°C) y en oscuridad, durante 15 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, se agregan 400 µL de tampón de unión a anexina V 1x y al cabo de una hora, se mide la intensidad de la señal de fluorescencia con un BD FACSAria (BD Biosciences, Nueva York, E.E.U.U.) y se analizó con BD FASCDiva (BD Biosciences, Nueva York, E.E.U.U) (Jiménez et al., 2016).

4.4.2.1.1 Determinación de la caspasa 3

Las caspasas son proteasas que presentan una molécula de cisteína, la cual regula la ruptura de otras proteínas. Las caspasas presentan una función importante en la transducción y ejecución de la señal apoptótica, dividiéndose así en iniciadoras o ejecutoras. Las primeras se activan por autoproteólisis, mientras que las segundas son activadas mediante la acción de las primeras. Entre las caspasas ejecutoras, se encuentra la caspasa 3, encargada de ejecutar la apoptosis y la consecuente muerte de la célula (Domínguez, 2015).

Previamente, las muestras se preparan para ser trasladadas al citómetro de flujo en el CIBA. Posteriormente, las células se recuperan con formaldehído al 0,01% durante 5 minutos. A continuación, se resuspenden en una solución de digitonina 0,5% v/v en PBS y se incuban durante 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente (22°C). Una vez transcurrido el tiempo, las células se lavan con PBS con digitonina al 0,1%, se agrega el anticuerpo anti-Caspasa 3 (Novus, Clone C92-605, *Excitación*: 494nm, *Emisión*: 520nm) y la mezcla se incuba una hora a temperatura ambiente. Por último, se vuelve a centrifugar durante 5 minutos a 3000rpm, se lavan las células con PBS dos veces y se resuspenden en PBS también. Finalmente, las muestras se analizan en el citómetro de flujo (Álvarez, 2017).

4.4.2.2 Evaluación del ciclo celular

El momento del ciclo celular en el que se produce la parada en la división de las células, favorece el conocimiento de la manera en la que están actuando sobre las células tumorales las fracciones de *Cynara scolymus L* empleadas.

Previamente, las muestras se preparan de la misma manera que en el caso anterior, para ser trasladadas al citómetro de flujo del CIBA. Después, las células se fijan con etanol helado al 70% y se almacenan a 4°C durante 24 horas. Posteriormente, se centrifugan a

3000 rpm durante 5 minutos y se rehidratan con PBS. A continuación, las células se tiñen con ioduro de propidio (PI) (50 $\mu\text{l}/\text{mL}$) un colorante que contiene ARNasa A (100 $\mu\text{l}/\text{mL}$) y se une al DNA de las células muertas, las cuales han perdido la integridad de la membrana. Por último, las células teñidas con PI se analizan para determinar el contenido de ADN mediante un FACSARRAY BD, que posee un láser de iones argón, lo cual permite medir la fluorescencia roja emitida por la cantidad de PI unida al ADN celular a una longitud de 650 nm. La distribución del ciclo celular se determina en una escala lineal (Jiménez et al., 2016).

4.4.2.3 Medida de cambios en el potencial mitocondrial

Las mitocondrias intervienen en una gran cantidad de reacciones bioquímicas necesarias para proporcionar energía en forma de ATP a la célula y, además, tienen una función importante en la muerte y el envejecimiento celular (Kuzmicic *et al.*, 2011). Las mitocondrias en vertebrados participan en la apoptosis, liberando proteínas de la membrana, como el citocromo c, que conlleva como resultado la pérdida de la integridad de la membrana mitocondrial, y consecuentemente, la fisión del orgánulo (Martinou & Youle, 2011). Por tanto, los cambios en el potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) indican daños y lesiones en las mitocondrias (Martínez *et al.*, 2016).

Previamente, las muestras se preparan de la misma manera que en la evaluación del ciclo celular para ser trasladadas al citómetro de flujo del CIBA. Posteriormente, las células se lavan con PBS y se centrifugan los tubos a 3000 rpm durante 5 minutos. El pallet es resuspendido en PBS a una concentración de $1 \cdot 10^6$ células/mL y se añaden a cada muestra 5 μL de una solución de 10 μM de la sonda catiónica 1,1',3,3,3' hexamethylindodicarbo-cyanine iodide (DiIC1), que se acumula en las mitocondrias activas debido a su carga negativa. Las muestras se incuban 15 minutos a 37°C 5% CO_2 y se añaden 400 μL de PBS a cada una antes de medir la fluorescencia con el citómetro de flujo ($\lambda_{\text{ex}} = 633 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 658 \text{ nm}$) (Sánchez de Diego *et al.*, 2017).

4.4.2.4 Evaluación del nivel de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Las nuevas estrategias terapéuticas contra el cáncer buscan modificar el equilibrio de nivel de ROS, ya que, aunque a dosis bajas pueden estimular la proliferación celular de algunos tipos de células cancerígenas; a dosis más altas, provocan la detención del ciclo celular, y consecuentemente, la muerte de las células tumorales. Por ello, se debe

determinar el nivel de ROS que producen los compuestos a estudiar (Liou & Storz, 2010).

El primer paso del proceso es sembrar las células Caco-2 en placas de 96 pocillos e incubarlas durante 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo, se introducen 100 μ L de medio de cultivo sin SFB y con las muestras de extracto de *Cynara scolymus L.* en una concentración del IC₅₀, y se incuba durante 24 horas a 37°C. Posteriormente, se retira el medio, se lavan las células dos veces con PBS, se añade 100 μ L de diacetato-diclorofluorescencia (DCFH-DA) en PBS suplementado con 20 mM H₂O₂ y se deja incubar 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrido el tiempo, se lava dos veces con PBS. Por último, se analiza la formación de ROS por la fluorescencia del reactivo en un espectrofotómetro ultravioleta lector de microplacas (FLUOstar Omega, BMGlabtech, Alemania), el cual se excita a 485 nm y emite a 535 nm. La producción de ROS se expresa como unidades arbitrarias de fluorescencia, en porcentaje con respecto al control y se normaliza con el porcentaje de viabilidad celular obtenido de forma independiente según lo descrito en el apartado 4.4.1.

4.5 Análisis estadístico de los resultados

Los resultados de los experimentos realizados en este Trabajo de Fin de Grado se obtuvieron mediante tres repeticiones realizadas de manera independiente y en las mismas condiciones.

Los resultados obtenidos en los distintos experimentos fueron representados y sometidos a un análisis estadístico utilizando el programa Microsoft Excel (Microsoft, California, E.E.U.U). Este programa también se utilizó para calcular los promedios y las desviaciones estándar.

5. Resultados y discusión

5.1 Determinación de las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias

5.1.1 Determinación de la capacidad antioxidante mediante el protocolo ABTS

Este método permite evaluar *in vitro* la capacidad antioxidante de un compuesto a partir de una curva patrón realizada con un compuesto antioxidante estándar, en este caso, ácido ascórbico. Para obtener la curva patrón, se ensayó la actividad antioxidante de un rango de concentraciones de ácido ascórbico y se midió la absorbancia a 506 nm. (Figura 1).

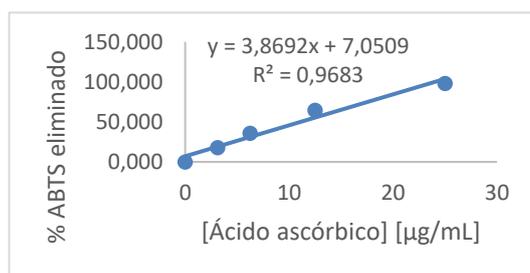


Figura 1. Representación gráfica del porcentaje de absorbancia a distintas concentraciones de ácido ascórbico (1,7-25 µg/mL).

Tras obtener las rectas patrón, se determina el porcentaje ABTS eliminado por cada una de las concentraciones ensayadas (1000-31,25 µg/mL) de las dos fracciones de *Cynara scolymus L.* (Tabla 3).

Tabla 3. Valor medio de la capacidad antioxidante de la Fracción 1 y Fracción 2 de *Cynara scolymus L.* a distintas concentraciones (1000-31,25 µg/mL) mediante el método ABTS.

[Fracción] (µg/mL)	%ABTS eliminado F1	%ABTS eliminado F2
1000	8,256±5,57	9,73±4,27
500	-6,07±3,35	4,29±2,49
250	-14,37±8,17	-7,80±6,45
125	-16,64±9,37	-7,93±7,02
62,5	-17,07±9,95	-11,05±6,07
31,25	-19,13±11,08	-12,18±5,19

Analizando los datos recogidos en la Tabla 3, se puede observar que ambas fracciones muestran resultados negativos de capacidad antioxidante. Sin embargo, estos datos no deben ser interpretados como “actividad antioxidante negativa”, sino simplemente como ausencia de efecto antioxidante, descartando así la aplicación de ambas fracciones con fines antioxidantes.

4.3.2 Estudios de desnaturalización de la Albumina Sérica Bovina (ASB)

Este ensayo permite determinar *in vitro* la inhibición de la desnaturalización de la ASB que ejercen los compuestos estudiados, y así, conocer su actividad antiinflamatoria, tal y como se ha comentado en el apartado de *Metodología*. Para ello, se ensayaron distintas concentraciones de ambas fracciones (500-32,5 µg/mL) (Tabla 4).

Tabla 4. Valor medio del porcentaje de inhibición de la desnaturalización de ASB de la Fracción 1 y Fracción 2 de *Cynara scolymus L.* a distintas concentraciones (500-32,5 µg/mL).

[Fracción] (µg/mL)	% de inhibición de desnaturalización F1	% de inhibición de desnaturalización F2
0	0	0
500	11,79±2,53	14,29±1,00
250	8,47±3,73	9,29±6,06
125	6,80±6,08	5,63±9,71
62,5	6,22±3,56	8,69±30,07
32,5	3,09±4,36	5,55±7,85

Analizando los datos obtenidos en la Tabla 4, y teniendo en cuenta que el control representa el 0% de inhibición de la desnaturalización de ASB y por tanto el 100% de desnaturalización proteica, se puede observar que el porcentaje de inhibición en todas las concentraciones y en ambas fracciones de alcachofa es muy bajo, es decir, sus propiedades antiinflamatorias son escasas.

Por tanto, según los resultados obtenidos en el presente apartado, se concluyó que las Fracciones 1 y 2 no poseían propiedades antiinflamatorias ni antioxidantes destacables, lo cual podría limitar su utilización industrial y terapéutica. A continuación, se procedió a investigar sus propiedades anticancerígenas con el objetivo de proseguir con la búsqueda de una aplicación de las hojas externas no comestibles de la alcachofa.

5.2 Determinación de las propiedades anticancerígenas

5.2.1 Estudio de la viabilidad celular mediante SRB

Este ensayo permite determinar la citotoxicidad de las dos fracciones de *Cynara scolymus L.*, calculando el valor IC_{50} , que se define como el mínimo valor de concentración de un fármaco u otro tipo de sustancia necesario para reducir en un 50% cualquier proceso biológico (Carbonel *et al.*, 2016). En este caso, el valor del IC_{50} corresponde a la cantidad de extracto de *Cynara scolymus L.* necesaria para disminuir a la mitad la población celular. La principal utilidad reside en que permite comparar la efectividad de diferentes sustancias. Los compuestos con mayor potencial terapéutico son aquellos con un valor de IC_{50} bajo, puesto que la cantidad de compuesto necesaria para inducir efectos citotóxicos en células tumorales será mínima. De esta manera, los efectos secundarios nocivos sobre los tejidos sanos se presuponen reducidos debido a su menor acumulación en los mismos.

Además de evaluar la citotoxicidad de las dos fracciones de *Cynara scolymus L.* sobre células cancerígenas (células Caco-2 indiferenciadas) (Figura 2 y Tabla 5), en este estudio también se determinó la seguridad de dichas fracciones sobre células Caco-2 diferenciadas (Tabla 6), es decir, aquellas que ya han alcanzado la confluencia, dado que según se ha desarrollado en el apartado de *Metodología*, las células Caco-2 diferenciadas, se utilizan como modelo de la barrera intestinal. Tanto las células diferenciadas como las indiferenciadas son incubadas durante 72 horas con un rango creciente de concentraciones de los diferentes extractos de alcachofa.

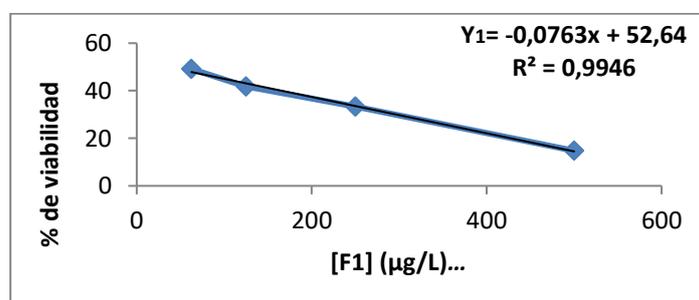


Figura 2. Representación gráfica de la viabilidad celular de células Caco-2/TC7 indiferenciadas tras 72h de incubación con distintas concentraciones de la Fracción 1 (1000-62,5 µg/mL) de *Cynara scolymus L.* obtenida mediante SRB.

Como se puede observar en la Figura 2, la Fracción 1 de la alcachofa presenta un efecto dependiente de la concentración sobre la viabilidad celular, lo que resultaría interesante a la hora de utilizar esta fracción con fines terapéuticos. La relación lineal que existe entre ambos parámetros permite obtener una adecuada recta de regresión con un valor de R^2 superior a 9. La ecuación obtenida a partir de la extrapolación a una recta se utiliza para determinar el valor de IC_{50} , siendo $y=50$ y x el valor a determinar. Mediante tres repeticiones independientes del ensayo se obtienen diferentes valores de IC_{50} con los que finalmente se obtiene un valor promedio de **38,06 $\mu\text{g/mL} \pm 4,72$** . Este valor, es relativamente bajo si se compara con los resultados obtenidos de IC_{50} de extractos vegetales de otros trabajos del mismo grupo de investigación. Por ejemplo, el valor de IC_{50} en células Caco-2 indiferenciadas de las bayas de *Rosa canina L.* (Jimenez et al., 2016), cuyo efecto anticancerígeno ha sido ampliamente estudiado, se encuentra en torno a 250 $\mu\text{g/mL}$. Por tanto, el valor de IC_{50} obtenido en la fracción 1 de *Cynara scolymus L.* podría ser de gran utilidad en quimioterapia debido a que no sería necesario utilizar altas concentraciones para que ejerciesen su efecto, por lo que los posibles efectos secundarios serían mínimos.

Tabla 5. Porcentajes de viabilidad celular de células Caco-2/TC7 indiferenciadas tras 72h de incubación con distintas concentraciones (250-62,5 $\mu\text{g/mL}$) de la Fracción 2 de *Cynara scolymus L.* obtenidos mediante SRB.

[$\mu\text{g/mL}$]	% de viabilidad
0	100 \pm 0,00
250	16,14 \pm 0,13
125	14,45 \pm 0,78
62,5	15,45 \pm 0,82

Al utilizar el mismo rango de concentraciones para la Fracción 2, se observa un efecto citotóxico mucho mayor que impide obtener un valor de IC_{50} , de modo que fue necesario trabajar con unas concentraciones más bajas para poder observar una relación lineal entre concentración y viabilidad celular. Sin embargo, como se puede observar en la Tabla 5, a pesar de reducir la concentración en la Fracción 2, se produce una excesiva muerte celular con

todas las concentraciones ensayadas, sin tener ninguna dependencia aparente con la viabilidad celular a diferencia de lo que ocurría con la Fracción 1.

En la segunda parte del ensayo, se analizó el efecto de las fracciones de *Cynara scolymus L.* sobre las células diferenciadas (modelo de enterocitos sanos), con el objeto de determinar si actúan selectivamente frente a células cancerígenas, siendo así inocuas para las células sanas.

Como se puede observar en la Tabla 6, la Fracción 1 de *Cynara scolymus L.*, incluso en la concentración más elevada (1000 mg/mL) no ejerce ningún efecto citotóxico destacable sobre las células diferenciadas. Por tanto, dicha fracción podría resultar interesante para fines terapéuticos debido a su elevada seguridad. Sin embargo, en la Fracción 2, se produce una considerable disminución de la viabilidad de las células diferenciadas, lo que conllevó, junto con la excesiva tasa de mortalidad observada sobre células indiferenciadas (Tabla 5), a ser descartada en los ensayos posteriores por ser considerada poco segura.

Tabla 6. Representación de la viabilidad celular de células Caco-2/TC7 diferenciadas tras 72h de incubación con distintas concentraciones de la Fracción 1 y de la Fracción 2 de *Cynara scolymus L.* ($\mu\text{g/mL}$) obtenida mediante SRB.

[Fracción] ($\mu\text{g/mL}$)	% de viabilidad F1	% de viabilidad F2
0	100 \pm 0,00	100 \pm 0,00
1000	96,72 \pm 0,05	9,14 \pm 0,39
500	93,42 \pm 4,78	16,38 \pm 1,87
250	95,12 \pm 6,90	23,41 \pm 4,00
125	93,54 \pm 0,40	20,57 \pm 0,81
62,5	93,89 \pm 1,49	30,02 \pm 2,37

5.2.2 Análisis del tipo de muerte celular

Los ensayos para determinar el tipo de muerte celular producida sobre las células tumorales (Caco-2 indiferenciadas) únicamente se realizaron con la Fracción 1 de alcachofa y se trabajó con su IC₅₀ (38 mg/mL).

5.2.2.1 Estudio de la producción de apoptosis y/o necrosis

Como se ha comentado en el apartado *Metodología*, este ensayo permite determinar el tipo de muerte celular que se produjo en las células Caco 2 como consecuencia de su incubación con la Fracción 1. Por medio de este es posible distinguir entre las siguientes poblaciones celulares: células sanas, que no proyectan ninguna fluorescencia (Q3); células apoptóticas tempranas, que presentan fluorescencia debido a la unión de la anexina V-FITC con la PS de las membranas (Q4); células apoptóticas tardías, que además de unirse a anexina V-FITC incorporan PI puesto que su membrana está dañada (Q2); y las células necróticas, aquellas que emiten fluorescencia por la incorporación exclusiva de PI (Q1).

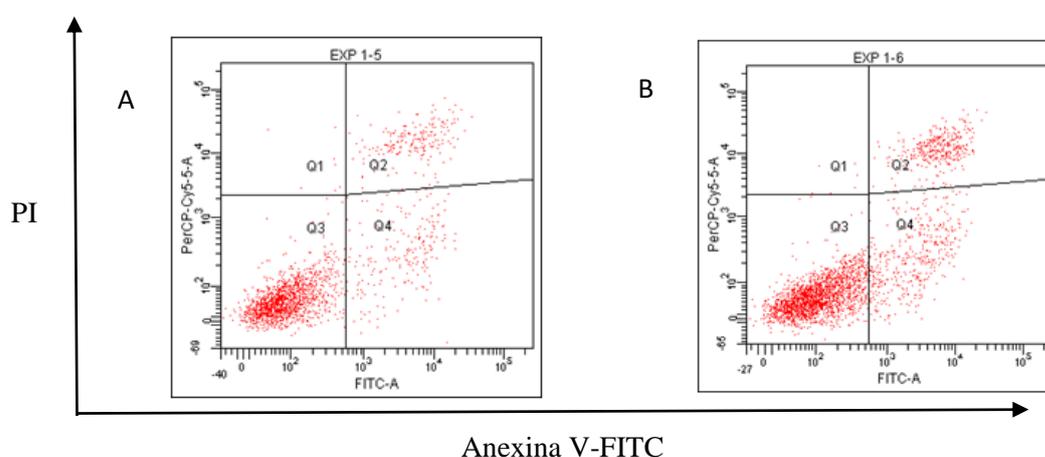


Figura 3. Estudio del tipo de muerte celular por citometría de flujo mediante tinción doble con anexina V y PI sobre células Caco-2/TC7 indiferenciadas incubadas durante 24 horas con DMSO (control negativo, Figura 3.A) o la Fracción 1 a su IC₅₀ (Figura 3.B)

Tabla 7. Valor promedio de los porcentajes de las distintas poblaciones celulares tras 24 horas de incubación en las condiciones detalladas en la Figura 3.

	Nº células	Vivas (%)	Apoptosis temprana (%)	Apoptosis tardía (%)	Necrosis (%)
Control negativo	5898	81,2±2,83	10,15±0,21	8,3±2,96	0,3±0,14
Fracción 1	6452	79,00±6,36	12,32±1,21	8,5±5,09	0,15±0,07

Según se aprecia en la Figura 3 y en los datos recogidos en la Tabla 7, la incubación con la Fracción 1 no causa un incremento significativo en los niveles de células apoptóticas tanto tempranas como tardías lo que es indicativo de que

el tipo de muerte producida por el extracto de alcachofa no es apoptosis. En los tratamientos quimioterápicos se busca normalmente la inducción de apoptosis dado que este tipo de muerte no conlleva una inflamación en los tejidos circundantes como ocurre en la necrosis, que implica por consiguiente más efectos secundarios para el paciente. Sin embargo, cabe destacar, que la Fracción 1 tampoco induce necrosis, lo que resulta interesante como quimioterápico. Por tanto, mediante estos resultados es posible concluir que, si bien la Fracción 1 produce la muerte de las células Caco-2, esta se induce por una vía diferente tanto a apoptosis como a necrosis que no ha podido ser detectada con el presente ensayo.

5.2.2.1.1 Determinación de la caspasa 3

La caspasa 3 o ejecutora es necesaria para la inducción de apoptosis. Según los resultados obtenidos, la Fracción 1 parece inducir la muerte celular por una vía alternativa a la apoptosis tradicional, de modo que se analizaron los niveles de activación de la caspasa 3 para corroborar los resultados anteriores.

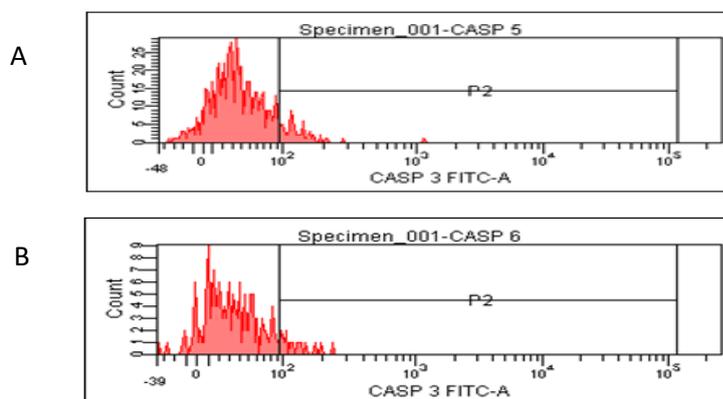


Figura 4. Estudio de los niveles de caspasa 3 en células Caco-2/TC7 indiferenciadas incubadas durante 24 horas con DMSO (control negativo) (Figura 4.A) o con la Fracción 1 de *Cynara scolymus L.* a la concentración de IC₅₀ (Figura 4.B).

Tabla 8. Valor promedio de los niveles de caspasa activada tras 24 horas de incubación en las condiciones descritas en la Figura 4.

	% células que expresan caspasa 3 activa
Control negativo	11,15±2,19
Fracción 1	10,05±1,20

Como se puede observar en la Figura 4 y en los datos recogidos en la Tabla 8, el porcentaje de caspasa 3 activa en las células Caco 2/TC7 apenas varía entre el control y las incubadas con la Fracción 1 de *Cynara scolymus L.* Estos datos, por tanto, confirman que la Fracción 1 de *Cynara scolymus L.* produce la muerte en las células Caco-2/TC7, mediante una vía alternativa a la apoptosis.

5.2.2.2 Evaluación del ciclo celular

El ciclo celular se define como los procesos que dan lugar al crecimiento de la célula y la división en dos células hijas. El ciclo celular común se divide en dos fases principales: la interfase, que incluye tres fases (G_1 , G_2 y G_3); y la mitosis, que se divide a su vez en profase, prometafase, metafase, anafase, telofase y citocinesis. Dentro de la interfase, en la fase G_1 se produce la acumulación de ATP necesario para el crecimiento y aumento del tamaño celular, en la fase S se da lugar la replicación del DNA celular, y por último, en la fase G_2 , la célula se prepara para la mitosis (Lomanto, 2003).

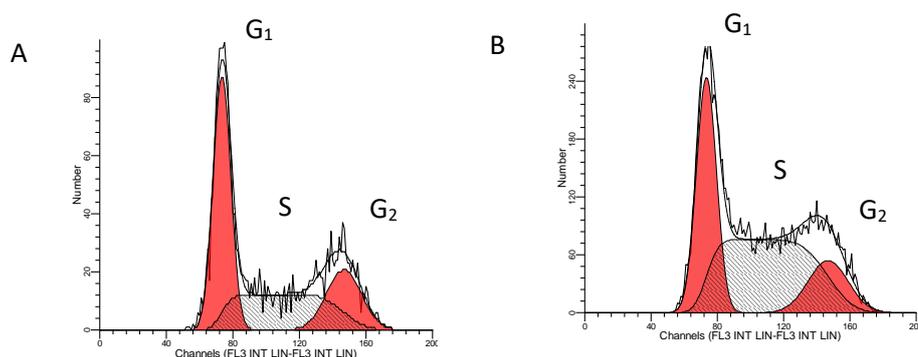


Figura 5. Análisis del ciclo celular de células Caco-2/TC7 indiferenciadas tras 24 horas de incubación realizado mediante citometría de flujo con DMSO (control negativo, Figura 5.A.) o con la Fracción 1 de *Cynara scolymus L.* en una concentración correspondiente a su IC_{50} (Figura 5.B).

Tabla 9. Valor promedio de los porcentajes de cada una de las fases del ciclo celular tras 24 horas de incubación. Control e incubación con la Fracción 1 de *Cynara scolymus L.* en una concentración ($\mu\text{g/mL}$) correspondiente al IC_{50} .

	Control negativo	Fracción 1
Fase G_1	43,41±0,67	32,92±0,66
Fase S	35,07±0,31	53,95±2,01
Fase G_2	21,52±0,35	13,14±1,35

Según los datos recogidos en la Figura 5 y Tabla 9, se puede concluir que el tratamiento de las células Caco 2 indiferenciadas con la Fracción 1 de *Cynara scolymus L.* provoca una parada celular en la fase S del ciclo, ya que aumenta su porcentaje con respecto al control, mientras que los porcentajes de la fase G₁ y G₂ disminuyen. La acumulación en fase S se relaciona con una incapacidad de las células de reparar daños en su DNA, lo que de nuevo implica que la muerte de las células Caco-2 se está produciendo por una vía alternativa a la apoptosis, ya que este tipo de muerte se caracteriza por una parada en las fases G₁ y G₂ del ciclo celular (Mattia *et al.*, 2018).

5.2.2.3 Medida de los cambios en el potencial mitocondrial

Este ensayo permite determinar si la Fracción 1 de *Cynara scolymus L.* provoca daños en la membrana mitocondrial (Ψ_m) de las células Caco-2/TC7, lo que está relacionado con la muerte de las células debido al papel fundamental de este orgánulo en el metabolismo celular.

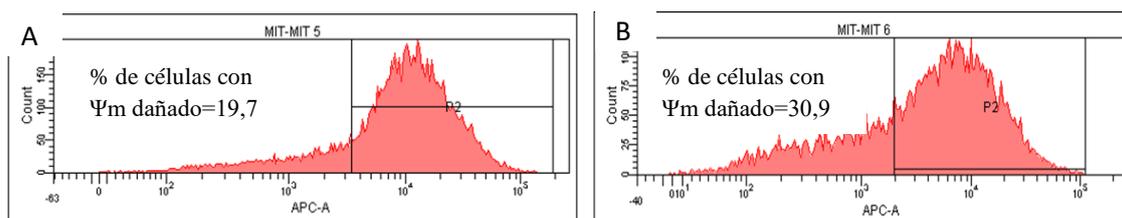


Figura 6. Estudio del potencial mitocondrial sobre células Caco-2/TC7 indiferenciadas incubadas durante 24 horas. Control (Figura 6.A) y con la Fracción 1 de *Cynara scolymus L.* a la concentración de IC₅₀ (Figura 6.B).

Analizando los histogramas presentes en la Figura 6, se puede observar que hay un aumento considerable del número de células con la membrana mitocondrial dañada, correspondiente a la zona excluida de P2. Por tanto, los resultados obtenidos permiten concluir que la Fracción 1 de alcachofa causa daños en la mitocondria, lo cual podría estar relacionado con su mecanismo de acción.

5.2.2.4 Evaluación del nivel de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Este ensayo permite determinar si los compuestos estudiados afectan al equilibrio de ROS, pudiendo actuar como antioxidantes o como prooxidantes. Como se ha mencionado en la introducción, los polifenoles suelen comportarse en la mayoría de las ocasiones como antioxidantes, pero muchos estudios han demostrado también su capacidad de inducir la muerte en las células tumorales alterando los niveles de ROS, actuando como prooxidantes (Mileo *et al.*, 2001). Las células cancerígenas presentan un

equilibrio muy delicado en sus niveles de ROS, debido a que tanto un aumento como un descenso de la producción de dichos niveles, afecta de manera negativa causando su muerte en ambos casos (Kumari *et al.*, 2018). Por ello, nuevas terapias se centran en la ruptura del equilibrio redox, lo que da lugar al gran interés creciente en el uso de polifenoles como agentes quimioterápicos.

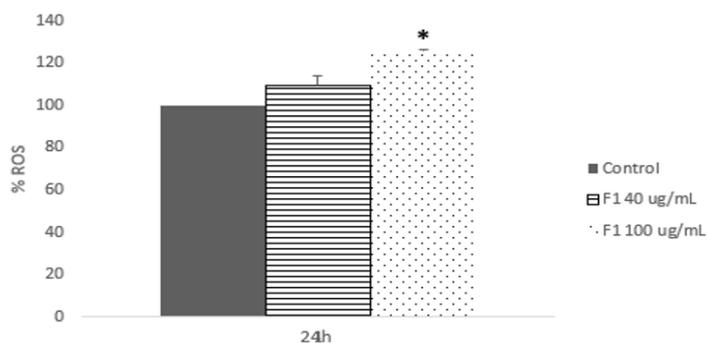


Figura 7. Análisis de la producción de ROS sobre células Caco-2/TC7 tras ser incubadas 24h con la Fracción 1 a dos concentraciones (IC50 y 100 µg/mL). La producción de ROS se expresó como cambios en la fluorescencia, que posteriormente fue normalizada con la viabilidad del cultivo. * $p < 0,05$ respecto al control negativo.

Como se puede observar en la Figura 7, el efecto de la producción de ROS es dependiente de la concentración, debido a que a mayor proporción de la Fracción 1, mayor es el incremento observado en el porcentaje de ROS. Además, se observa que los niveles de ROS obtenidos son superiores a los de las células control. Por tanto, la Fracción 1 tiene un efecto prooxidante, pudiendo estar relacionado con su acción citotóxica. Estos resultados se correlacionan con los obtenidos en la Figura 6, debido a que un aumento en los niveles de ROS está relacionado con la aparición de daños en la membrana mitocondrial, causando así un descenso en su potencial.

5. Conclusiones

1. Tanto la Fracción 1 como la Fracción 2 de extractos de alcachofa no poseen propiedades antioxidantes ni antiinflamatorias destacables.
2. Ambas fracciones disminuyen la viabilidad de las células de carcinoma de colon humano Caco-2/TC7, pero únicamente la Fracción 1 lo hace de manera dependiente de la concentración.
3. La Fracción 1 no daña los enterocitos normales, actuando selectivamente sobre las células cancerígenas. Sin embargo, la Fracción 2 no es selectiva frente a las células cancerígenas, debido a que disminuye la viabilidad de las células no tumorales.
4. La Fracción 1 causa la muerte por una vía independiente a la apoptosis y que además es independiente de la activación de las caspasas, como se puede observar por los ensayos realizados por citometría de flujo.
5. El tratamiento de las células Caco-2/TC7 con la Fracción 1 provoca la alteración del ciclo celular al producir una parada en la fase S, lo que indica que se está produciendo la muerte de las células cancerígenas.
6. La Fracción 1 altera el potencial de la membrana mitocondrial en células Caco-2/TC7.
7. La Fracción 1 posee actividad prooxidante y este aumento de nivel de ROS podría estar relacionado con su actividad citotóxica, al dañar las membranas de las mitocondrias de las células cancerígenas.

Teniendo en cuenta estas conclusiones, será necesario realizar futuros estudios para profundizar los mecanismos por los que los extractos de alcachofa de la Fracción 1 son capaces de producir la alteración del potencial mitocondrial y el desequilibrio redox, actuando de forma selectiva frente a las células del cáncer de colon humano Caco2/TC7 y provocando así su muerte.

Conclusions

1. Neither Fraction 1 nor Fraction 2 of artichoke extracts show significant antioxidant or anti-inflammatory properties.
2. Both Fraction 1 and Fraction 2 decrease the viability of the human colon adenocarcinoma Caco-2/TC7 cells, but just Fraction 1 displays a concentration-dependent effect.
3. Fraction 1 does not damage normal enterocytes, thus acting selectively on cancer cells. However, Fraction 2 is not selective against cancer cells, since it decreases non-tumor cells viability.
4. Treatment with Fraction 1 alters Caco-2/TC7 cell cycle *via* an arrest in the S phase, which is a common feature of cell death.
5. Fraction 1 triggers non-apoptotic caspase independent death on human colon adenocarcinoma Caco-2/TC7 cell line, according to flow cytometry data.
6. Fraction 1 disrupts mitochondrial membrane potential of Caco-2/TC7 cells.
7. Fraction 1 displays prooxidant activity and the observed increase in ROS level might be related to this cytotoxic activity, by damaging mitochondrial membrane of cancer cells.

In light of these conclusions, further studies are needed to deepen into the mechanisms of action by which the extracts of artichoke of Fraction 1 are able to disrupt the mitochondrial potential and disturb the redox balance, and as a consequence show high selectivity against the Caco-2/TC7 colon cancer cells and thus causing his death.

7. Aportaciones en materia de aprendizaje

La realización de este Trabajo de Fin de Grado en el departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza me ha permitido introducirme en la investigación sobre el cáncer y los mecanismos de acción de esta enfermedad, lo cual era un tema realmente diferente a la formación académica recibida durante todo el Grado de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Por ello, tenía un gran interés por ampliar mis conocimientos aprendidos sobre productos alimenticios con algo que fuese realmente novedoso para mí y de mi agrado.

Además, la consecución de este trabajo me ha proporcionado una serie de habilidades y destrezas entre las que se encuentran:

- Buscar y seleccionar información fiable en artículos científicos, tanto en inglés como en español, sobre temas relacionados con las propiedades antioxidantes y anticancerígenas de diferentes productos, así como analizar y resumir dicha información.
- Aprender nuevas técnicas relacionados con las propiedades antioxidantes y anticancerígenas de compuestos, adquiriendo así una mayor experiencia en el laboratorio.
- Obtener, representar e interpretar resultados, extrayendo conclusiones de ellos.
- Capacidad de decisión y de trabajar de manera autónoma.
- Desarrollar capacidad de organización y planificación.

Además, cabe destacar que la realización de este Trabajo de Fin de Grado ha sido una experiencia realmente enriquecedora, positiva y gratificante, el cual me ha adentrado en un ámbito científico del que me gustaría seguir ampliando mis conocimientos en un futuro.

Para finalizar, me gustaría agradecer a mi directora del trabajo, María Jesús Rodríguez Yoldi, por su amabilidad, conocimientos y su confianza puesta en mí. Mi más sincero agradecimiento también a Inés Mármol Peguero por su inmensa ayuda, paciencia y por todo lo que me ha enseñado en este mundo de investigación tan interesante pero tan nuevo para mí, como es el cáncer. Por último, agradecer a mis padres, a mi novio y a mis amigas, por ser un gran apoyo durante la realización de este Trabajo de Fin de Grado.

8. Bibliografía

ACS 2018. American Cancer Society. Acerca del cáncer colorrectal (<https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-colon-o-recto/acerca.html>).

AECC, 2018. Informe incidencia y mortalidad de cáncer colorrectal en España en la población entre 50 y 69 años. Observatorio del Cáncer de la AECC.

Adolfo, E., 2002. Mecanismos de muerte celular: apoptosis y necrosis. Revista Argentina de Anestesiología 60, 391-401.

Ahmad, S., 2014. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial potential of artichoke. The Open Nutraceuticals Journal 7, 15-20.

Álvarez, R., 2017. Estudio de las propiedades anticancerígenas de complejos metálicos de oro. Trabajo de fin de grado. Universidad de Zaragoza, España.

Arora, M., 2013. Medios de cultivo celular: una revisión. Validated Antibody Database. 3.

Bianco, V.V., 2005. Present situation and future potential of artichoke in the Mediterranean basin. Acta Horticulturae 681, 39-58.

Borah, A., Paw, M., Gogoi, R., Loying, R., Sarma, N., Munda, S., Pandey, S.P., Lal, M., 2019. Chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory, anti-microbial and *in-vitro* cytotoxic efficacy of essential oil of *Curcuma caesia* Roxb. leaves: An endangered medicinal plant of North East India. Industrial crops and products 129, 448-454.

Carbonel, K.N., Suárez, S., Arnao, A.I., 2016. Características fisicoquímicas y capacidad antioxidante *in vitro* del extracto de *Gentianella nitida*. Anales de la facultad de medicina 77, 333-337.

Caro, I., Boulenc, X., Rousset, M., Meunier, V., Bourrié, M., Julian, B., Joyeux, H., Roques, C., Berger, Y., Zweibaum, A., Fabre, G., 1995. Characterization of a newly isolated Caco-2 clone (TC-7), as a model of transport processes and biotransformation of drugs. International Journal of Pharmaceutics, 116, 147-158.

Dissiz, G., Yilmaz, M., 2016. Complementary and alternative therapies and health literacy in cancer patients. Complementary Therapies in Clinical Practice 23, 34-39.

- Dominguez, L., 2016. Characterization of the interactions between Caspasa-9 and phosphatases PP1A and PP2A in apoptosis: applications as therapeutic target in cancer. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca, España.
- Fogh, J., Trempe, G., 1975. New human tumor cell lines. In *Human Tumor Cells in vitro*. Plenum Publishing Corporation, 115-141.
- Gebhardt, R., Fausel, M., 1997. Antioxidant and hepatoprotective effects of artichoke extracts and constituents in cultured rat hepatocytes. *International workshop on in vitro toxicology* 11, 669-672.
- Gonçalves, J., Silva, C.L., Castilho, P.C., J. S. Câmara, 2013. An attractive, sensitive and high-throughput strategy based on microextraction by packed sorbent followed by UHPLC-PDA analysis for quantification of hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids in wines. *Microchem. J.* 106, 129–138.
- Hu Yang, I., De la Rubia, J.E., Selvi, P., Sancho, S., Julián, M., Manresa, N., Montoya, I., 2015. Aceite de coco: tratamiento alternativo no farmacológico frente a la enfermedad de Alzheimer. *Nutrición Hospitalaria* 32, 2822-2827.
- Jimenez, S., Gascón, S., Luquin, A., Laguna, M., Ancin, C., Rodríguez, M.J., 2016. *Rosa canina* extracts have antiproliferative and antioxidant effects on Caco-2 human colon cancer. *Journal of Plos One*, 11.
- Jukić, H., Habeš, S., Aldžić, A., Durgo, K., Kosalec, I., 2015. Antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds of the extracts of *Echinacea purpurea* (L.). *Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina*, 44, 43-52.
- Kumari, S., Badana, A.K, G, M.M, Malla, R., 2018. Reactive oxygen species: A key constituent in cancer survival. *Sage Journals* 13.
- Kuzmicic, J., Del Campo, A., López, C., Morales, P.E., Pennanen, CH., Bravo, R., Hechenleitner, J., Zapeda, R., Castro, P.F., Verdejo, H.E., Parra, V., Ching, M., Lavandero, S., 2011. Dinámica mitocondrial: un potencial nuevo blanco terapéutico para la insuficiencia cardíaca. *Revista Española de Cardiología* 64, 916-923.
- Lattanzio, V., Kroon, P.A., Linsalata, V., Cardinali, A., 2009. Global artichoke: A functional food and source of nutraceutical ingredients. *Journal of functional foods* 2, 131-144.

- Liou, G.Y., Storz, P., 2010. Reactive oxygen species in cancer. National institutes of health 44, 479-496.
- Lomanto, L.D., Ortiz, O.L, Bretón, C.O., Gómez, A.I., Mesa, V.M., 2003. El ciclo celular. MedUNAB 6, 21-29.
- Mármol, I., Sánchez, C., Pradilla, A., Cerrada, E., Rodríguez, M.J., 2017. Colorectal carcinoma: A general overview and future perspectives in colorectal cancer. International Journal of Molecular Sciences, 18.
- Martínez, A.C., Uscanga, A.C., Rodríguez, C.R., 2016. Actividad citotóxica *in vitro* frente a células tumorales. En Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M.A., & Verde-Star, M.J. OmniaScience, 269-312.
- Martinou, J.C, Youle, R.J., 2011. Mitochondria in Apoptosis: Bcl- 2 family Members and Mitochondrial Dynamics. National institutes of health 21, 92-101.
- Mattia, G., Puglisi, R., Ascione, B., Malorni, W., Caré, A., Matarrese, P., 2018. Cell death-based treatments of melanoma: conventional treatments and new therapeutic strategies. Cell Death & Disease 9, 112.
- Mauricio, A., Restrepo, L.M., Ruiz, A.M., 2016. Caracterización de diferentes cepas de células Caco-2 para su uso en ensayos de permeabilidad *in vitro*. Revista Cubana de Farmacia, 50.
- Mileo, A.M., Di Venere, D., Miccadei, S., 2016. Antitumour effects of artichoke polyphenols: cell death and ROS-mediated epigenetic growth arrest, 3.
- Molassiotis, A., Fernandez-Ortega, P., Pud, D., Ozden, G., Scott, A., Panteli, V., Margulies, A., Browall, M., Magri, M., Selvekerova, S., Madsen, E., Milovics, L., Bruyns, I., Gudmundsdottir, G., Hummerston, S., Ahmad, A.M., Platin, N., Kearney, N., Patriaki, E., 2005. Use of complementary and alternative medicine in cancer patients: a European survey. Annals of oncology, 16, 655-663.
- Moon, J.K., Shibamoto T., 2009. Antioxidant assays for plant and food components. Journal of Agricultural and Food Chemistry 57, 1655-66.
- Newman, D.J., Cragg, G.M., 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. Journal of Natural Products 70, 461-477.

NIH, 2017. Instituto Nacional del Cáncer. Temas sobre terapias integrales, alternativas y complementarias. Versión para profesionales de la salud (<https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/mca/pro/temas-mca-pdq>).

OMS 2018. Organización Mundial de la Salud. Cáncer (<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>).

Osman, N.I., Sidik, N.J., Awal, A., Adam, N.A., Rezali, N.I., 2016. *In vitro* xanthine oxidase and albumin denaturation inhibition assay of *Barringtonia racemosa* L. and total phenolic content analysis for potential anti-inflammatory use in gouty arthritis. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology* 5, 343-349.

Pan, S.Y., Zhou, S.F., Gao, S.H., Yu, Z.L., Zhang, S.F., Tang, M.K., Sun, J.N., Ma, D.L., Han, Y.H., Fong, W.F., Ko, K.M., 2013. New perspectives on How to Discover Drugs from Herbal Medicines: CAM's Outstanding Contribution to Modern Therapeutics. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 25.

Pereira, M.P., 2016. Determinación de la capacidad antioxidante de productos alimenticios derivados de plantas. Trabajo de Fin de Grado. Universidad de Jaén, España.

Quero, L.J., 2016. Estudio de las propiedades anticancerígenas de complejos metálicos de oro con ligandos ditiocarbamato. Trabajo de fin de grado. Universidad de Zaragoza, España.

Sánchez de Diego, C., Mármol, I., Perez, R., Gascón, S., 2017. The anticancer effect related to disturbances in redox balance on Caco-2 cells caused by an alkynyl gold(I) complex. *Journal of inorganic biochemistry* 166, 108-121.

Sarkar, S., Horn, G., Moulton, K., Oza, A., Byler, S., Kokolus, S., Longacre, M., 2013. Cancer development, progression, and Therapy: An Epigenetic Overview. *International Journal of Molecular Sciences* 10, 21087-21113.

Taraphdar, A.K., Roy, M., Bhattacharya, R.K., 2001. Natural products as inducers of apoptosis: Implication for cancer therapy and prevention. *Current Science* 11, 1387-1396.

Upadhyay, S., Dixit, M., 2015. Role of polyphenols and other phytochemicals on molecular signaling. *Oxidative Medicine and cellular Longevity*, 15.

USDA, 2013. United States department of Agriculture: national database for standard reference.

Valencia, E., Figueroa, I.I., Sosa, E., Bartolomé, M.C., Martínez, H.E., García, M.E., 2017. Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas. Revista de la Facultad de Ciencias Químicas 16, 1390-1869.