



UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y
TECNOLÓGICAS

POSGRADO EN BIOCENCIAS

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIPROLIFERATIVA DE CÁSCARA Y SEMILLA DE
UVA (*Vitis vinífera* L.) SOBRE LÍNEAS CELULARES
HeLa Y MDA-MB-231

TESIS

Para obtener el grado de:

MAESTRO EN BIOCENCIAS

Presenta:

MARCO ANTONIO HERNÁNDEZ LEPE

Hermosillo, Sonora, México

Julio de 2014

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DE CÁSCARA Y
SEMILLA DE UVA (*Vitis vinifera* L.) SOBRE LÍNEAS CELULARES HeLa Y MDA
MB-231**

TESIS

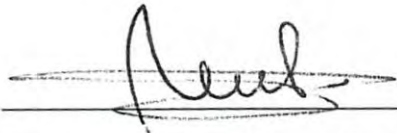
Que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de:
MAESTRO EN BIOCENCIAS

Presenta:

MARCO ANTONIO HERNÁNDEZ LEPE

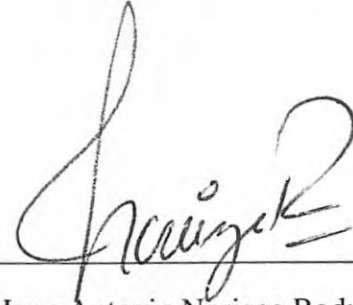
APROBACIÓN

Los miembros del Comité designado para revisar el trabajo de Tesis intitulada Evaluación de la actividad antiproliferativa de la cáscara y semilla de uva (*Vitis vinifera* L.) sobre líneas celulares HeLa y MDA-MB-231, presentada por Marco Antonio Hernández Lepe, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Biociencias con especialidad en Biociencias Moleculares.



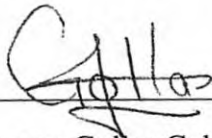
Dra. María Guadalupe Burboa Zazueta

Asesor



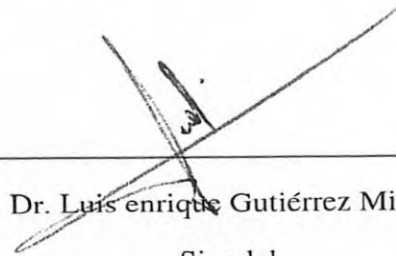
Dr. Juan Antonio Noriega Rodríguez

Co-Asesor



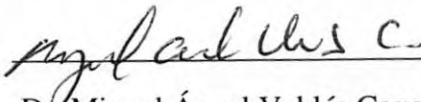
Dra. Teresa Gollas Galván

Sinodal



Dr. Luis Enrique Gutiérrez Millán

Sinodal



Dr. Miguel Ángel Valdés Covarrubias

Sinodal

DEDICATORIAS

A mi familia, en especial a mis padres, Marco Antonio Hernández Quintero y Ana Bertha Lepe Arámbula, y a mis hermanos, José Pascual Hernández Lepe y Ana Laura Hernández Lepe.

A mi mejor amigo, Jesús Antonio Domínguez Vanegas, que por voluntad de Dios se fue a su lado, pero siempre compartiré mis alegrías y logros con él en mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a Dios por darme vida y salud hasta esta etapa de mi vida, y espero que sean muchos más logros los que me permita vivir.

A la Universidad de Sonora, por ser mi casa durante el tiempo en que realicé mis estudios, específicamente al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas por darme la oportunidad de realizar este trabajo dentro de sus instalaciones y proveerme los recursos necesarios para llevar a cabo todas mis actividades.

A CONACyT por apoyarme con una beca durante mis estudios de maestría, ya que sin ella hubiera sido muy difícil realizar mi proyecto de investigación.

A la empresa Rubio Pharma, que gracias a su donación de líneas celulares se pudo sacar adelante el proyecto.

A la Dra. María Guadalupe Burboa Zazueta y al Dr. Juan Antonio Noriega Rodríguez, por darme la oportunidad de realizar mi tesis bajo su dirección, brindándome los conocimientos, el apoyo y la confianza necesarios para hacer mi trabajo de una forma eficiente.

A mis sinodales de tesis, Dr. Luis Enrique Gutiérrez Millán, Dr. Miguel Ángel Valdés Covarrubias y Dra. Teresa Gollas Galván, por todos los aportes que hicieron a mi proyecto, mostrando siempre interés, disponibilidad, paciencia y brindarme su conocimiento para realizar un trabajo de calidad.

A todos mis familiares, pero en especial a mis padres, Marco Antonio y Ana Bertha, así como a mis hermanos, José Pascual y Ana Laura, quienes en todo momento de mi vida han estado incondicionalmente cerca de mí, brindándome cariño, conocimiento y apoyándome en cada instante, gracias a ustedes he logrado cumplir los principales objetivos de mi proyecto de vida.

A mis compañeros durante el tiempo que realicé mi maestría, Alfonso, Ramón, Hiessu, Mario, Gaby, Perla, Angélica, Diana y Sarai, quienes compartieron conmigo su tiempo y algunas vivencias que siempre recordaré.

A todos mis amigos, que estando cerca o lejos siempre me han apoyado y sé que puedo contar con ellos, especialmente a Graciela, Lucina, Luis y su familia, además de toda mi familia ajedrecística de la Universidad de Sonora.

A mi compañera incondicional durante el último año, Alenniss, que siempre me ha apoyado y ha creído en mí, gracias por todo.

RESUMEN

En México se desechan alrededor de 57,000 toneladas al año de bagazo de uva (*Vitis vinifera* L.) como subproducto de la industria vitivinícola sin uso sustentable. Por otro lado, diversos estudios han encontrado que el bagazo de uva, ya sea cáscara o semilla, contienen compuestos fenólicos, los cuales han mostrado tener efectos antioxidantes, antiinflamatorios y anticancerígenos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antiproliferativa de los extractos metanólicos de cáscara y semilla de uva contra células HeLa y MDA-MB-231. El contenido de fenoles totales fue mayor en la cascara (5.04 ± 1.19 mg/g) que en la semilla (1.15 ± 0.39 mg/g). El contenido de flavonoides totales fue de alrededor del 60% de los fenoles totales presentes en cáscara y de 75% en semilla. Ambos extractos metanólicos mostraron una actividad antiproliferativa significativa ($P < 0.05$) sobre las líneas celulares HeLa y MDA-MB-231 directamente proporcional a la concentración del extracto aplicado. Se determinaron las IC_{50} , siendo el extracto de cáscara de uva contra células HeLa quien presentó menor concentración inhibitoria ($296.54 \mu\text{g/mL}$) Los resultados de este trabajo demuestran que es posible recuperar compuestos importantes como nutraceuticos de fuentes naturales disponibles en el bagazo de uva.

ABSTRACT

Mexico discards about 57,000 ton of grape marc (*Vitis vinifera* L.) as a byproduct of the winery industry without a sustainable use. By the other hand, diverse studies have found that grape marc, either skin or seed, contains phenolic compounds, which have shown antioxidant, antiinflammatory and anticarcinogenic effects. The purpose of this work was to evaluate the antiproliferative activity of methanolic extracts from grape skin and seed, against HeLa and MDA-MDB-231 cells. Total phenol in the skin (5.04 ± 1.19 mg/g) was higher than seed (1.15 ± 0.39 mg/g). While flavonoid represents about 60% of total phenols in skin and 75% in seed. Both methanolic extracts show significant antiproliferative activity ($P < 0.05$) against cell lines HeLa and MDA-MB-231 directly proportional to the concentration of applied extract. The IC_{50} were determined, being the grape skin extract against HeLa cells the minor inhibitory concentration ($296.54 \mu\text{g/mL}$). Results of this work demonstrated that it is possible recover important compounds as nutraceuticals from natural resources available from grape marc.

ÍNDICE GENERAL

	PÁGINA
APROBACIÓN	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	x
INTRODUCCIÓN	1
I. ANTECEDENTES	4
I.1. Cáncer	4
I.1.1. Epidemiología del cáncer	5
I.1.2. Productos naturales contra el cáncer	7
I.2. Uva (<i>Vitis vinifera</i> L.)	8
I.2.1. Bagazo de uva	8
I.2.2. Cultivo de uva en México	8
I.2.3. Cultivo de uva en Baja California	9
I.2.4. Compuestos fenólicos de la uva	10
I.2.5. Actividad antiproliferativa de la uva (<i>Vitis vinifera</i> L.)	12
II. HIPÓTESIS	15
III. OBJETIVOS	16
III.1. Objetivo general	16
III.2. Objetivos específicos	16

IV. MATERIALES Y MÉTODOS	17
IV.1. Materia prima	17
IV.2. Reactivos	17
IV.3. Líneas celulares	17
IV.4. Obtención de los extractos metanólicos	18
IV.5. Determinación de fenoles totales	18
IV.6. Determinación de flavonoides totales	20
IV.7. Identificación de los compuestos fenólicos mediante HPLC	22
IV.8. Evaluación de la actividad antiproliferativa	22
IV.9. Análisis estadístico	24
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
V.1 Rendimiento de la extracción metanólica	25
V.2. Determinación de fenoles y flavonoides totales	26
V.3. Identificación de los compuestos fenólicos mediante HPLC	27
V.4. Evaluación de la actividad antiproliferativa	29
VI. CONCLUSIONES	32
VII. RECOMENDACIONES	33
VIII. LITERATURA CITADA	34

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Modelo esquemático de carcinogénesis	5
2	Mortalidad por neoplasias de 1998 hasta 2007 en México	6
3	Superficie plantada de uva según su uso en Baja California en el año 2010	10
4	Estructura de compuestos fenólicos presentes en uva	11
5	Procedimiento para la obtención del extracto metanólico	19
6	Procedimiento para la obtención de fenoles totales	21
7	Procedimiento para la obtención de flavonoides totales	21
8	Procedimiento para la evaluación de la actividad antiproliferativa	23
9	Cromatograma del extracto de cáscara de uva en comparación con la mezcla de estándares	28
10	Cromatograma del extracto de semilla de uva en comparación con la mezcla de estándares	28
11	Proliferación de células MDA-MB-231 en presencia de diferentes concentraciones de los extractos	29
12	Proliferación de células HeLa en presencia de diferentes concentraciones de los extractos	29
13	Proliferación de células ARPE-19 en presencia de diferentes concentraciones de los extractos	31

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
1	Superficie plantada de uva (Ha) por municipio según su uso en Baja California en el año 2010	9
2	Compuestos identificados en extractos de diferentes variedades de uva	13
3	Rendimiento de la liofilización de la cáscara y semilla de uva	25
4	Rendimiento de la extracción metanólica	25
5	Contenido de fenoles y flavonoides totales	26
6	Actividad antiproliferativa (IC ₅₀) de los extractos metanólicos de cáscara y semilla de uva (µg/mL)	30

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, las plantas representan el recurso natural más utilizado para la búsqueda de compuestos bioactivos (Khan y Mukhtar, 2008) y se encuentran en estudio una gran diversidad de familias de ellas, entre las que se encuentran *Umbelliferae*, *Euphorbaceae*, *Papaveraceae* y *Liliaceae* (Pérez *et al.*, 2005; Bagiu *et al.*, 2012).

Se ha estimado que el 80% de la población mundial utiliza la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud y que gran parte de estos tratamientos implica el uso de extractos o sus principios activos (Thakur *et al.*, 2012). La medicina herbolaria es todavía de las más importantes debido a que presentan menores efectos secundarios que los medicamentos sintéticos (Domingo *et al.*, 2003).

Numerosos estudios indican la importancia de la ingesta de dietas ricas en productos vegetales en la prevención de numerosas patologías, entre ellas el cáncer (Veluri *et al.*, 2006; Faria *et al.*, 2006), las enfermedades cardiovasculares (Benito *et al.*, 2002) y las enfermedades neurodegenerativas (Bagchi *et al.*, 2002; Devi *et al.*, 2006). Esto ha llevado a que, en las últimas décadas, se hayan realizado grandes esfuerzos para descubrir las moléculas responsables de estas propiedades saludables de los vegetales, identificando numerosos compuestos, sin embargo, entre estos agentes destaca el grupo de los compuestos fenólicos (Sarker *et al.*, 2006).

La uva es una de las frutas más cultivadas alrededor del mundo, y es considerada fuente de una alta cantidad de compuestos fenólicos (Monagas *et al.*, 2003). Estos compuestos fenólicos juegan un papel muy importante en las propiedades sensoriales y nutricionales de las uvas y los vinos. Así mismo se han evaluado las propiedades biológicas tanto de extractos de uva como de compuestos derivados de ella, encontrándose que poseen actividad citotóxica, antígenotóxica y antiangiogénica, debido principalmente a su actividad antioxidante (Hartle *et al.*, 2005; Monagas *et al.*, 2003; Pezzuto, 2008, Xia *et al.*, 2010).

Las agroindustrias producen una gran cantidad de subproductos por año, generalmente considerados como residuos pero que pueden llegar a ser fuente de compuestos con actividad biológica. La industria vitivinícola, como parte del proceso de elaboración de vino tinto, produce bagazo, un subproducto considerado de deshecho.

Tales desechos han sido empleados como materia orgánica compostable, así como para la formulación de alimentos de animales, pero con resultados no tan efectivos (Flavel *et al.*, 2005; Peña *et al.*, 2007). Sin embargo, un uso potencial puede ser la obtención de compuestos bioactivos para su uso en tratamiento clínico de enfermedades como el cáncer, que es la segunda causa de muerte a nivel mundial, cobrando más vidas que el VIH/SIDA, la malaria y la tuberculosis combinadas; además de que la incidencia del cáncer aumenta constantemente constituyendo un desafío enorme para las instituciones de salud, en donde las demandas para su atención médica se están incrementando considerablemente, con importantes repercusiones económicas (Shibuya *et al.*, 2002). Debido a que la incidencia de cáncer varía dramáticamente en cada país, se ha hecho mucho hincapié en la comprensión de los factores ambientales que afectan el riesgo de cáncer, incluyendo la dieta (Del Maso *et al.*, 2011).

La quimioterapia del cáncer ha sido socavada por el hecho de que los fármacos usados actualmente son relativamente tóxicos o hasta ciertos puntos ineficaces debido a un incremento de la resistencia. Los mecanismos moleculares de dicha resistencia a la droga pueden implicar una variedad de factores tales como mutación de los genes blancos y la disminución de las concentraciones de los fármacos en las células debido a la elevada toxicidad (Isnard–Bagnis *et al.*, 2005), por todo lo anterior, existe una urgente necesidad de explorar alternativas con menores efectos secundarios para disminuir el riesgo de esta enfermedad.

Debido entonces a que el cáncer a nivel mundial está en aumento y los tratamientos hoy en día son ineficaces, hay una constante búsqueda de alternativas naturales que brinden mayor calidad de vida y promuevan la buena salud, por lo que se vuelve necesaria la realización de estudios biológicos que permitan una mayor caracterización de los extractos

vegetales para la aplicación en el campo de la salud. La industria vitivinícola genera gran cantidad de residuos y existe escasa información acerca de la utilización del bagazo de uva, es necesaria la realización de estudios enfocados en demostrar que este subproducto puede ser utilizado como materia prima bioactiva, efectiva y segura para la producción de fármacos que pueden tener alta selectividad contra las células cancerosas. Con base a lo expuesto anteriormente, el presente trabajo se enfocó al potencial que representa el bagazo de la uva como desecho industrial y se determinó la presencia de compuestos fenólicos en extractos metanólicos de cáscara y semilla de la uva, evaluando su actividad antiproliferativa.

I. ANTECEDENTES

I.1. Cáncer

La proliferación celular es un proceso altamente controlado, permitiendo que las células se multipliquen, aumentando su contenido de moléculas y organelos, duplicando sus cromosomas para posteriormente dividirse en dos células genéticamente iguales. Generalmente, las células se dividen con una periodicidad óptima para el correcto mantenimiento y funcionamiento del organismo (Alberts, 1996). El cáncer es el resultado de dos procesos sucesivos: el aumento descontrolado de la proliferación de un grupo de células que da lugar a un tumor o neoplasia, y la posterior adquisición por estas células de capacidad invasiva, que les permite diseminarse desde su sitio natural en el organismo, colonizar y proliferar en otros tejidos u órganos (proceso conocido como metástasis) (Cavenee y White, 1995).

El cáncer es un conjunto de enfermedades ya que existen más de 100 tipos diferentes y se clasifican de acuerdo al tejido y según el tipo celular a partir del cual se origina. Los tipos de cáncer procedentes de células epiteliales se denominan carcinomas, los que proceden del tejido conjuntivo o de células musculares se denominan sarcomas, por último los que no encajan en ninguna de éstas dos se encuentran las diversas formas de leucemia (Muñoz, 1997).

El cáncer implica cambios en el metabolismo celular que influyen en la función mitocondrial, y la supresión de la apoptosis está relacionada con una inhibición de la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (Galluzzi *et al.*, 2006). Una de las características distintivas de las células cancerosas es su incrementada resistencia a la inducción de apoptosis, mecanismo clave en el control del crecimiento y regulación de la homeostasis de los tejidos.

El proceso de carcinogénesis comprende tres fases principales. La primera fase del modelo de carcinogénesis se llama iniciación. En esta etapa interviene un agente iniciador, el cual tiene la capacidad de inducir cambios físicos o estructurales en los genes. Esto ocurre en el lapso en que las células se dividen, de tal manera que las células hijas fijan el daño y quedan iniciadas. Estas células iniciadas crecen con una velocidad ligeramente superior a las normales, y pueden pasar inadvertidas durante un período muy largo. En la segunda fase, denominada promoción, un agente promotor interviene sobre estas células e induce la proliferación celular. Por lo regular se requieren meses o años. La tercera etapa es llamada transformación o conversión, ya que una célula preneoplásica se convierte en una que expresa el fenotipo maligno. La última etapa es la progresión, o adquisición de nuevas alteraciones genéticas que provocan un aumento de la malignidad, con capacidad invasiva y metastásica (Figura 1).

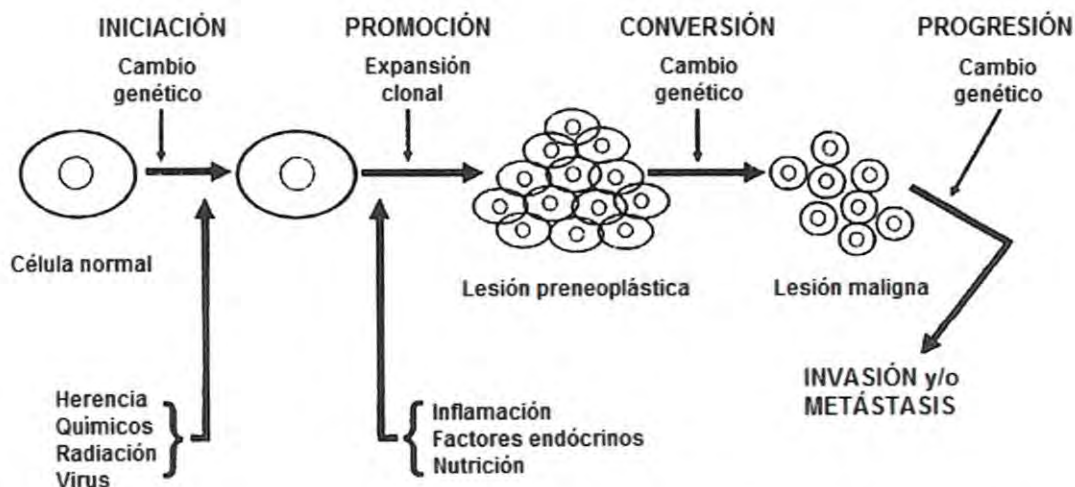


Figura 1. Modelo esquemático de carcinogénesis (Pelayo-Martínez, 2013).

I.1.1. Epidemiología del cáncer

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial, se le atribuyeron 8.2 millones de muertes en el 2012 (WHO, 2014). El cáncer de mama está entre los primeros cinco tipos de causas de muerte por cáncer en el mundo. Aproximadamente un 30% de las muertes por este padecimiento se deben a cinco factores de riesgo comportamentales y alimentarios (índice de masa corporal elevado, consumo insuficiente de frutas y verduras, falta de actividad física

y consumo de tabaco y alcohol) y, por lo tanto, pueden prevenirse. El 70% de todas las muertes por cáncer registradas en 2012 se produjeron en África, Asia, América Central y Sudamérica. Se prevé que los casos anuales de cáncer aumentarán de 14 millones en 2012 a 22 en las próximas dos décadas (GLOBOCAN, 2012).

En México, al igual que en el plano internacional, existe un incremento en los casos de muertes por cáncer (Figura 2), con un total de 524,420 defunciones en el año 2007, de las cuales 55.4% fueron hombres y 44.6% mujeres; de estas muertes, los tumores malignos ocuparon el tercer lugar entre las principales causas de muerte del país con 68,815 casos (13.4%). Durante 2009, en las mujeres, el cáncer de mama constituyó la principal causa de morbilidad hospitalaria (22.0%); seguida de los tumores de los órganos hematopoyéticos (14.1%) y de los órganos genitales femeninos (13.5%). En contraste, las tasas más baja se observan para el cáncer de labio, de la cavidad bucal y de la faringe (1.2%), ojo y sus anexos (0.5%) y los tumores malignos (primarios) de sitios múltiples independientes (0.1%) (INEGI, 2012).

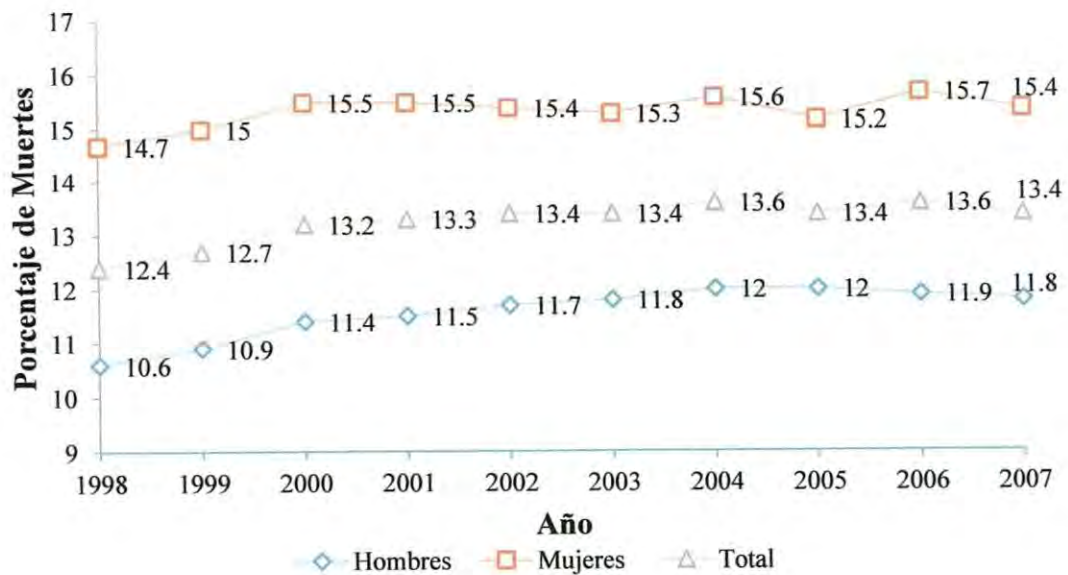


Figura 2. Mortalidad por neoplasias de 1998 hasta 2007 en México (INEGI, 2008).

I.1.2. Productos naturales contra el cáncer

El cáncer es una enfermedad agresiva y mortal si no se detecta en sus etapas tempranas y se ataca con un tratamiento adecuado, ya que las células cancerosas son difíciles de erradicar. Desafortunadamente, los medicamentos y las terapias que se utilizan no son completamente efectivas, y además de su alto costo económico, producen diversos efectos secundarios que desgastan al paciente tanto física como emocionalmente. También, los tratamientos que matan células cancerosas generalmente son tóxicos para las células normales. Por estas razones, se realizan investigaciones para la búsqueda de compuestos de origen natural que inhiban la proliferación de las células cancerosas (Sarker *et al.*, 2006)

El término productos naturales es frecuentemente utilizado de manera indistinta al concepto de metabolitos secundarios, los cuales resultan de gran interés debido a sus efectos biológicos en otros organismos (Hanson, 2003). Existen varios programas para la detección de compuestos bioactivos en múltiples especies, los cuales han permitido el desarrollo de nuevos fármacos, como el taxol, compuesto ampliamente utilizado para el tratamiento de varios tipos de cáncer (Boik, 2001). Los productos naturales muy frecuentemente juegan un papel en la regulación de las interacciones entre plantas, microorganismos, insectos y animales. Éstos pueden ser sustancias empleadas para defensa, con la finalidad de repeler a los organismos predadores, o para favorecer la reproducción y distribución de la especie por medio de la atracción de insectos polinizadores, también estas moléculas biológicas desempeñan un papel en la comunicación química actuando como hormonas (Morrissey, 2005).

Una gran cantidad de estudios muestran evidencias de los efectos protectores de la ingesta de compuestos fenólicos en la dieta, principalmente de flavonoides, frente al cáncer. García-Closas *et al.* (1999), demostraron una asociación inversa entre el consumo total de flavonoides, de quercetina o de kaempferol y el riesgo de padecer cáncer de estómago, mientras que, en otro estudio, la ingesta de catequinas se asoció con menor incidencia de cáncer rectal y del tracto digestivo alto (Arts, 2001). Las dietas ricas en quercetina o miricetina han demostrado proteger frente al cáncer de pulmón y de próstata,

respectivamente, en hombres, y, en ese mismo estudio, se encontró una tendencia a un menor riesgo de cáncer de mama en mujeres con alta ingesta de quercetina (Knekt *et al.*, 2002). Sin embargo, otros estudios no encuentran ninguna relación entre el consumo de dietas ricas en estos compuestos y el cáncer (Wang *et al.*, 2009).

I.2. Uva (*Vitis vinifera* L.)

La vid pertenece al reino *Plantae* (Plantas), subreino *Tracheobionta* (Plantas vasculares), superdivisión *Spermatophyta* (Plantas de semilla), división *Magnoliophyta* (Plantas de flores), clase *Magnoliopsida* (Dicotiledóneas), subclase *Rosidae*, orden *Rhamnales*, familia *Vitaceae* (Familia de uvas), género *Vitis* L. (Uva) y especie *Vitis vinifera* L. (Uva de vino) (USDA, 2014).

I.2.1. Bagazo de uva

El bagazo de uva es un subproducto de la industria vitivinícola y representa aproximadamente el 20% en peso de la uva procesada (Hogan *et al.*, 2010) y está constituido en su gran mayoría por la cáscara y la semilla de la uva. Este se obtiene después del prensado de la uva triturada en la elaboración del vino blanco o después de la maceración y fermentación para vino tinto. En el año 2012, la tecnología de vinificación generó a nivel mundial 67, 067,128.98 toneladas de uva, siendo más de 13,000 millones de bagazo de uva, mientras que en nuestro país las cantidades de uva cosechadas en el mismo año fue de 375,298 toneladas, de las cuales el bagazo superó las 70,000 toneladas (FAOSTAT, 2014), todas estas cantidades de bagazo de uva generadas usualmente carecen de aplicaciones sustentables (Rivera *et al.*, 2007).

I.2.2. Cultivo de uva en México

Durante el año 2012, en México se cosechó un área de aproximadamente 30, 050 ha, produciendo 375,298 ton de uva (FAOSTAT, 2014).

La cosecha de uva en México se destina principalmente a la producción de vinos, con una superficie sembrada de 27,830.86 ha y una producción de 281,144.98 ton en 2011, donde se incluye la producción de uva de mesa, uva industrial y uva para pasa (FAOSTAT, 2014).

I.2.3. Cultivo de uva en Baja California

La producción vitivinícola de Baja California se encuentra desde Mexicali hasta Ensenada (Tabla 1), dentro de una zona conocida como la franja del vino con una buena influencia de los vientos marinos. El clima de esta región favorece cosechas de máxima calidad por sus inviernos húmedos y veranos secos y templados.

Tabla 1. Superficie plantada de uva (Ha) por municipio según su uso en Baja California en el año 2010 (SIAP, 2014).

Municipio	Vino	%	Mesa	%	Pasa	%
Ensenada	2813	96.85	526.2	73.81	20	17.02
Mexicali	0	0	174.73	24.51	97.5	82.98
Tecate	24.5	0.84	12	1.68	0	0
Tijuana	66.9	2.3	0	0	0	0
Total	2904.4	100	712.93	100	117.5	100

Las zonas de cultivo más importantes son Valle de Guadalupe, Valle de San Antonio de las Minas y Valle de Calafia al noroeste de Ensenada, Valle de Santo Tomás y Valle de San Vicente al sur de Ensenada.

La producción total en baja California para el año 2012 fue de 25,345.53 Ton de uva, donde se incluye la producción de uva de mesa, uva industrial y uva pasa (Figura 3), mismas que fueron sembradas en una superficie de 3,768.06 Ha, de las cuales fueron cosechadas 3,285.96 Ha, resultando en un rendimiento de 7.71 Ton/Ha, dando un valor total de \$266,778,890 pesos (SIAP, 2014).

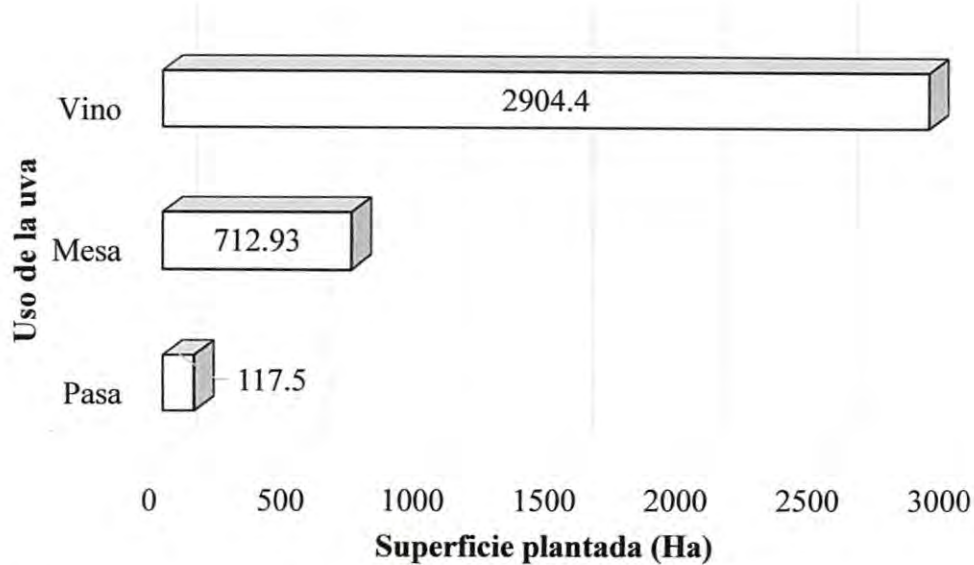
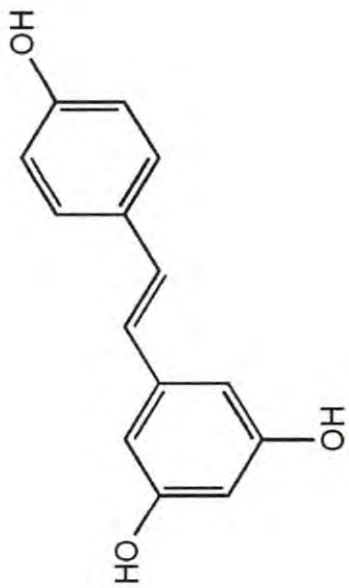


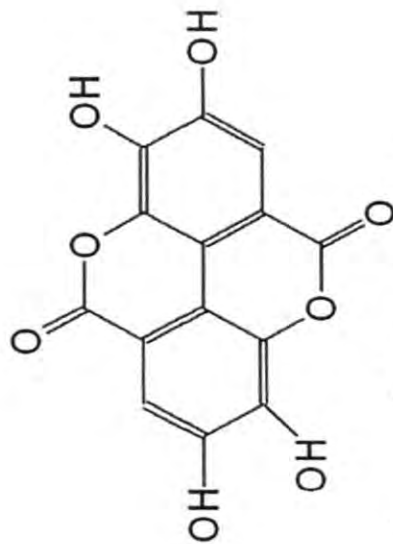
Figura 3. Superficie plantada de uva según su uso en Baja California en el año 2010 (SIAP, 2014).

1.2.4. Compuestos fenólicos de la uva

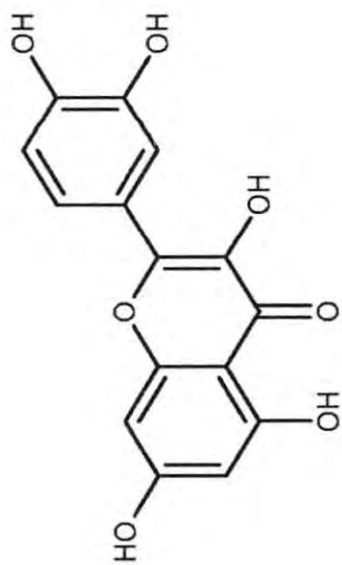
La uva es una de las frutas más cultivadas alrededor del mundo, y es considerada fuente de una alta cantidad de compuestos fenólicos (Monagas *et al.*, 2003). El bagazo de uva, constituido más del 80% por cáscara (CU) y semilla (SU) es considerado subproducto de la industria vitivinícola, además de que posee una elevada actividad biológica (Agustín-Salazar *et al.*, 2014; Pinelo *et al.*, 2006). Los extractos de CU y SU han mostrado tener efectos benéficos en la salud humana, siendo mayoritariamente la actividad antioxidante la preponderante en los compuestos presentes (Faria *et al.*, 2006). Los compuestos fenólicos de la uva poseen en su estructura química una variedad de grupos hidroxilo (Figura 4), lo cual se relaciona con su actividad antioxidante (Caillet *et al.*, 2006). Se cree que al menos algunos de los constituyentes presentes en los extractos de CU y SU actúan sinérgicamente y pueden proporcionar mejores efectos contra el cáncer que un solo constituyente (Singh *et al.*, 2011).



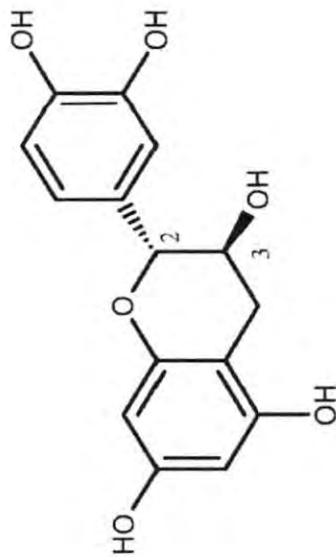
Resveratrol



Ácido elágico



Quercetina



Catequina

Figura 4. Estructura de compuestos fenólicos presentes en uva (Hollecker *et al.*, 2009).

Los fitoquímicos en las uvas son en su mayoría compuestos fenólicos. De acuerdo a su estructura molecular, los compuestos fenólicos se dividen en cuatro clases: un anillo fenólico (ácidos cinámico y benzoico), dos anillos fenólicos (estilbenos), tres anillos (antocianinas, flavonoles y flavon-3-oles) y anillo complejo (ácido elágico) (Lu y Foo, 1999). Las antocianinas, flavonoles y flavon-3-oles, que contienen la estructura molecular nuclear de C6-C6-C6, también se llaman compuestos flavonoides, y comprenden del 65 al 76% de los compuestos fenólicos presentes en la uva (Hogan *et al.*, 2009).

En los últimos años se han estudiado ampliamente los compuestos presentes en la uva, la cual muestra abundantes y muy variados polifenoles (Tabla 2), los cuales juegan un papel muy importante en las propiedades sensoriales y nutricionales de las uvas y los vinos. Muchos estudios demuestran que los compuestos fenólicos, principalmente los flavonoides, reducen la incidencia de enfermedades crónicas graves como el cáncer y las enfermedades cardiovasculares, debido principalmente a su actividad antioxidante (Hartle *et al.*, 2005; Pezzuto, 2008, Xia *et al.*, 2010).

I.2.5. Actividad antiproliferativa de la uva (*Vitis vinifera* L.)

Los compuestos fenólicos de la uva han sido objetos de mayor estudio en los últimos años por los investigadores debido a sus posibles efectos contra el cáncer. Una serie de estudios sugieren que el alto consumo de componentes de la uva podría tener asociación con la reducción del riesgo de ciertos tipos de cáncer, tales como el cáncer de mama y de colon (Falcao *et al.*, 1994; Viel *et al.*, 1997).

Los polifenoles de la uva han mostrado capacidad para inducir la detención del ciclo celular y la apoptosis en células de cáncer (Aggarwal *et al.*, 2004). Teniendo en cuenta la diversidad de compuestos fenólicos en la uva (Tabla 2), es muy probable que éstos ejerzan una potente actividad anticancerígena actuando en varios eventos celulares asociados con la iniciación, promoción y progresión del tumor.

Tabla 2. Compuestos identificados en extractos de diferentes variedades de uva.

Tipo de Extracto	Variedad de Uva	Compuestos Identificados	Referencia
Semilla	Merlot Chardonnay Muscadine	Ácido Gálico, catequina, epicatequina	Yilmaz y Toledo, 2004
Vino, Semilla	Tempranillo, Graciano, Cabernet Sauvignon	Catequina, epicatequina, epicatequina-3-galato, dímeros de procianidinas B3, B1, T2, B4, B2, B2-3-galato, flavan-3-ol	Monagas <i>et al.</i> , 2003
Cáscara, Vino tinto	Castelão	Estilbenos (Resveratrol)	Sun <i>et al.</i> , 2006
Cáscara	Muscadine	Antocianinas (Delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina, maldivina)	Hueang <i>et al.</i> , 2009
Cáscara, Semilla	Chardonnay Sauvignon	Ácido gálico, metil-galato, catequina, epicatequina, Rutina, epicatequin-galato, Procianidina B1 y B2, Quercetina, , Kaempferol	Hollecker <i>et al.</i> , 2009

Los mecanismos propuestos de los potentes efectos anticancerígenos de los compuestos fenólicos de la uva incluyen actividades antioxidantes, antiinflamatorias y antiproliferativas (Seeram *et al.*, 2005). Los compuestos fenólicos de la uva pueden actuar como captadores de radicales libres, y los agentes quelantes ayudan a reducir las especies reactivas del oxígeno (ROS) (Sun *et al.*, 2011). Las ROS son conocidas como un importante mediador de la apoptosis desde la iniciación, además de que su regulación está asociada con modificaciones en el entorno oxidativo (Matés y Sánchez-Jiménez, 2000). Los antioxidantes de la uva también ejercen actividad antiinflamatoria, la cual se cree que está asociada con sus efectos quimiopreventivos (Hogan *et al.*, 2010; Hogan, *et al.*, 2011). Los agentes quimiopreventivos del cáncer incluyen los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs), como la indometacina, piroxicam y sulindac, todos los cuales inhiben la ciclooxigenasa (COX) (Jang *et al.*, 1997). Esta actividad inhibitoria es relevante para la quimiopreención del cáncer debido a que la COX cataliza la conversión del ácido araquidónico en sustancias proinflamatorias, tales como las prostaglandinas, que pueden estimular el crecimiento de células tumorales (Jang *et al.*, 1997). Por otra parte, la COX puede

activar carcinógenos mediante sustancias más reactivas que causan daño genético (Zenser *et al.*, 1983). En su estudio, Zhang *et al.* (2005), encontraron que los compuestos fenólicos de la uva ejercen actividad antitumoral parcialmente relacionada con sus actividades inmunopotenciadoras a través de las mejoras de proliferación linfocítica, la citotoxicidad de las células NK y la producción de IL-2.

II. HIPÓTESIS

El extracto metanólico de la cáscara y semilla de uva (*Vitis vinifera* L.) presenta actividad antiproliferativa sobre líneas celulares de cáncer de mama y cáncer cervicouterino.

III. OBJETIVOS

III.1 General

Evaluar la actividad antiproliferativa de los extractos de compuestos fenólicos de la cáscara y semilla de uva (*Vitis vinifera* L.) sobre líneas celulares HeLa, MDA-MB-231 y ARPE-19.

III.2. Objetivos específicos

- 1.- Determinar el perfil fenólico del extracto metanólico de cáscara y semilla de uva (*V. vinifera*).
- 2.- Analizar los compuestos fenólicos individuales presentes en el extracto metanólico de la cáscara y semilla de uva mediante tiempos de retención por HPLC.
- 3.- Evaluar la actividad antiproliferativa del extracto metanólico de cáscara y semilla de uva sobre las líneas celulares HeLa, MDA-MB-231 y ARPE-19.
- 4.- Determinar la concentración mínima Inhibitoria (IC₅₀) del extracto metanólico de la cáscara y de la semilla de uva sobre células HeLa, MDA-MB-231 y ARPE-19.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. Materia prima

El bagazo de uva Cavernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) fue recolectado de la empresa Agroindustrias del Desierto S.A. de C.V., localizada en Ensenada, México (31°52' N latitud y 116°35' W longitud y a una altitud de 35.84 m sobre el nivel del mar), correspondiendo a la cosecha de Junio del 2011. La cáscara y semilla fueron separadas y almacenadas herméticamente a -80°C hasta su posterior utilización.

IV.2. Reactivos

Todos los estándares, reactivos, y solventes de grado analítico fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Las curvas de calibración fueron preparadas con estándares de ácido gálico y quercetina.

IV.3. Líneas celulares

Para la evaluación de la inhibición de la proliferación celular se utilizaron las líneas celulares de adenocarcinoma de cérvix, HeLa (CCL-2) y epitelio pigmentado de retina, ARPE-19 (CRL 2302) fueron donadas por la empresa Rubio Pharma, mientras que la línea de adenocarcinoma invasivo de mama, MDA-MB-231 (HTB 26) fue obtenida de ATCC.

Los cultivos se propagaron en frascos para cultivo celular de 25 cm² utilizando un medio de Cultivo Eagle Modificado de Dubecco (DMEM), suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) para las líneas HeLa y ARPE-19, y suplementado con 15% de SFB, 2% de penicilina-estreptomina, 1% de aminoácidos esenciales y 1% de glutamina fueron necesarios para la línea MDA-MB-231. Se mantuvieron a una temperatura de 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ y una humedad relativa de 80-90% en una incubadora VWR 2425. (Hsieh *et al.*, 2005).

IV.4. Obtención de los extractos metanólicos

Los compuestos fenólicos de la CU y SU fueron extraídos con MeOH-Agua (6:4 v: v), acorde al procedimiento realizado por Molina-Quijada *et al.*, (2010) con algunas modificaciones. 2 g de muestra fueron homogenizados con 20 mL de metanol acuoso (60%) utilizando un Polytron 1300D; posteriormente se sonicó a temperatura ambiente durante 30 min (Ultrasonic Cleaner, Cole-Parmer, USA) y se centrifugó (Heraeus Megafuge 16R, Thermo Scientific) a 3,000 x g a 4°C durante 15 min. El sobrenadante se filtró con papel Whatman No. 1 y el material sólido fue homogenizado de nuevo con 20 mL de metanol acuoso para después ser sonicado y centrifugado nuevamente bajo las mismas condiciones. Una vez filtrado el sobrenadante obtenido se mezcló con el primero para pasar a eliminar el metanol en un rotavapor, cuidando no pasar de los 45°C para evitar la desnaturalización de los compuestos fenólicos. Después de eso se liofilizó (LABCONCO Freezone 6 Plus) hasta eliminar el agua presente (Figura 5). El extracto crudo fue llevado a congelación a -20°C hasta su posterior utilización. El producto final fue considerado como extracto de cáscara de uva (ECU) y extracto de semilla de uva (ESU).

IV.5. Determinación de fenoles totales

Las determinaciones se realizaron espectrofotométricamente utilizando el método de Folin-Ciocalteu descrito por Jiménez-Estrada *et al.*, (2013) con modificaciones, dicho método está basado en la oxidación de los grupos fenólicos por los ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico, formándose un complejo verde-azulado que se mide espectrofotométricamente a 765nm (Ramírez-Sánchez *et al.*, 2010).

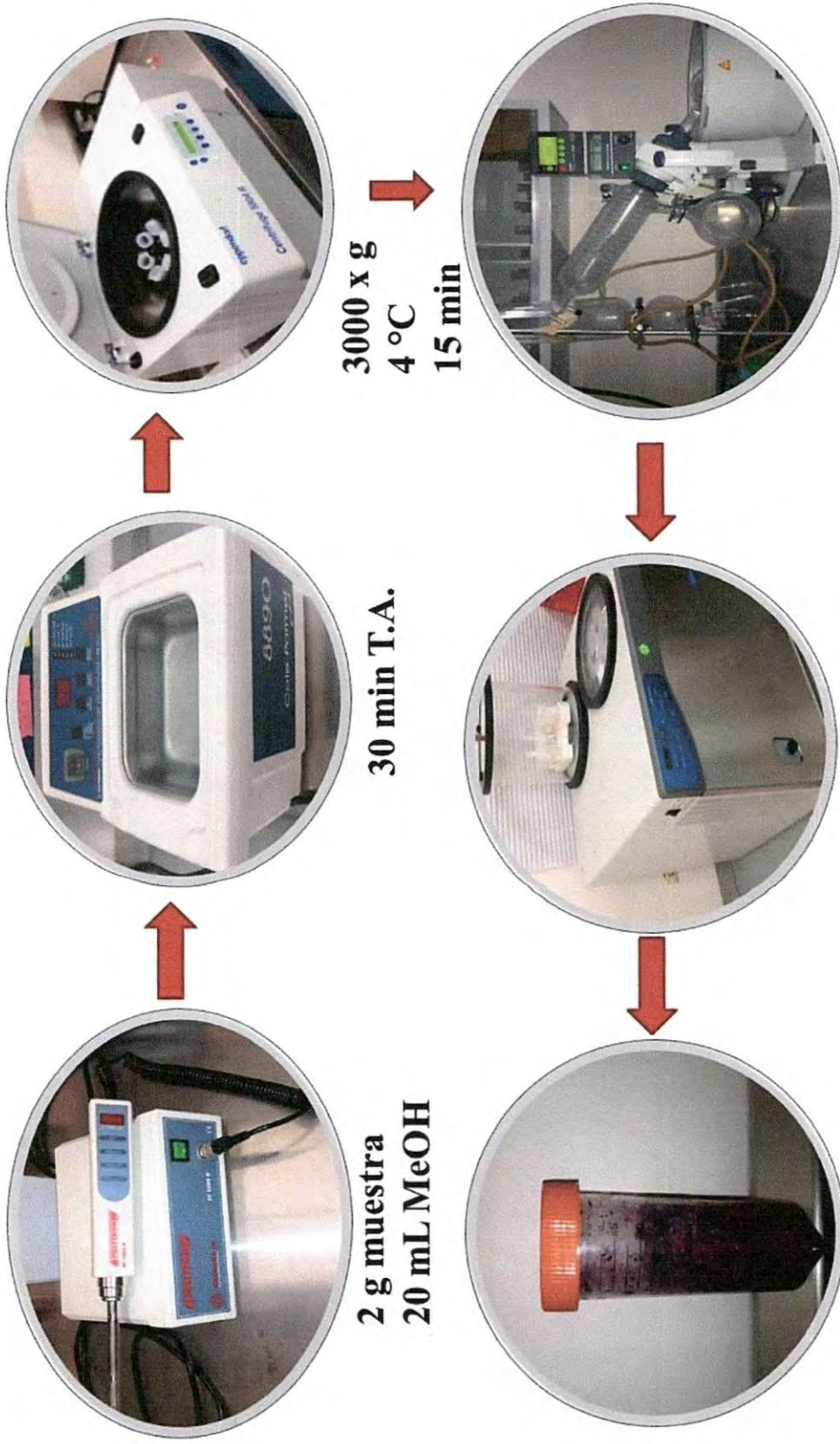


Figura 5. Procedimiento para la obtención del extracto metanólico.

En un tubo de ensayo se mezclaron 50 μL de extracto con 3 mL de agua destilada, se adicionaron 250 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu (1N), dejándolo reposar durante 5 minutos; después se agregaron 750 μL de Na_2CO_3 al 20% y 950 μL de agua destilada, dejándolo reposar nuevamente, ahora durante 30 min. Después de la reacción se midió la absorbancia a 765 nm con un espectrofotómetro Beckman Coulter DU530 (Figura 6). Se preparó una curva de calibración usando ácido gálico como estándar (Ainsworth y Gillespie, 2007). La concentración de los compuestos fenólicos en las muestras fue expresada como equivalentes de ácido gálico (mg/g de peso seco).

IV.6. Determinación de flavonoides totales

Los flavonoides totales se determinaron con el método del cloruro de aluminio (Hogan *et al.*, 2009) modificado, el principio de dicho método es que el AlCl_3 forma complejos ácido-estables con el grupo ceto del C4 y con el grupo hidroxilo del C3 o C5 de flavones y flavonoles. Además, el AlCl_3 forma complejos ácido-lábiles con los grupos o-dihidroxis en el anillo A o B de los flavonoides (Chang *et al.*, 2002). Un volumen de 1 mL de extracto se colocó en un tubo de ensayo, adicionándole 4 mL de agua destilada, enseguida se añadieron 0,3 mL de NaNO_2 (5%) y 0,3 mL de AlCl_3 (10%). Se agitó vigorosamente el tubo y se dejó reposar durante 1 min, para después añadir una solución de NaOH (1M) y aforar a 10 mL con agua destilada. Después de la reacción se midió la absorbancia a 415 nm en un espectrofotómetro (Beckman Coulter DU530) (Figura 7). Se preparó una curva de calibración utilizando quercetina como estándar. La concentración de flavonoides fue expresada como equivalentes de quercetina (mg/g de peso seco).

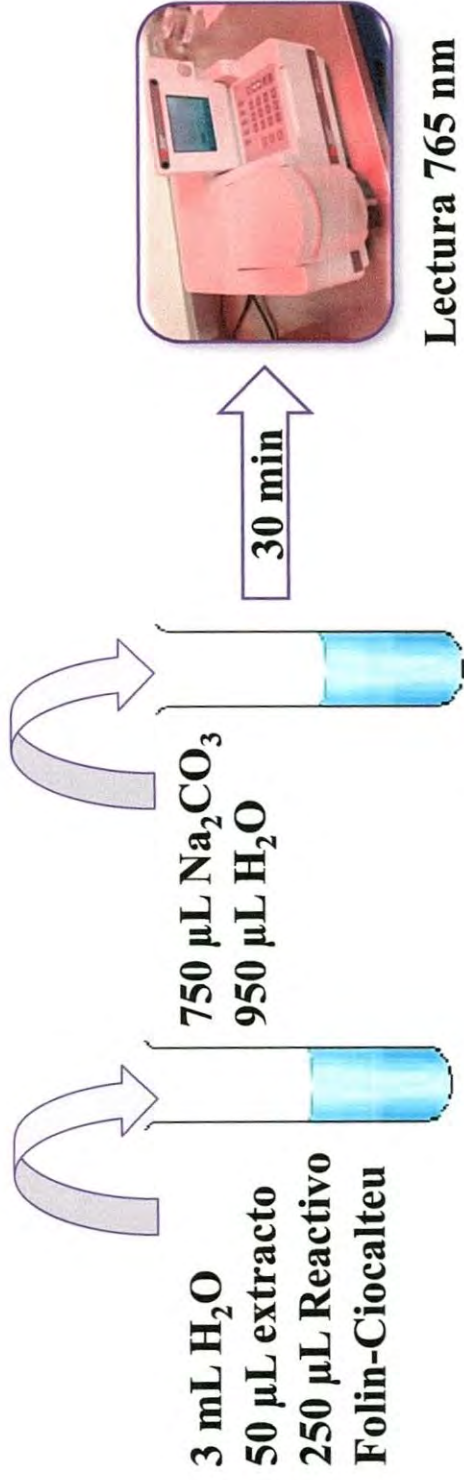


Figura 6. Procedimiento para la determinación de fenoles totales.

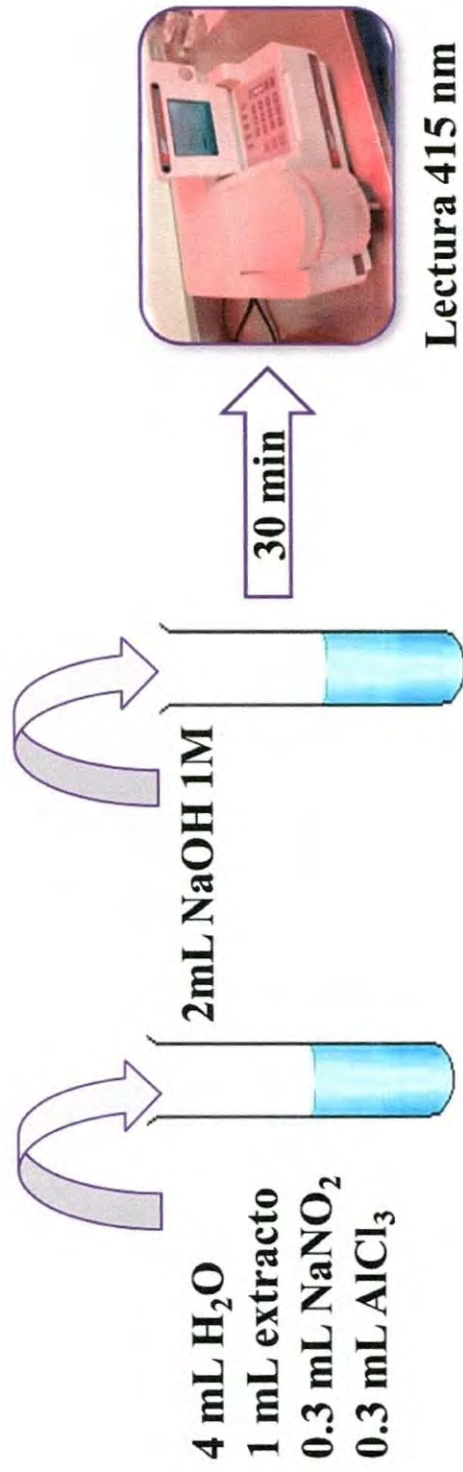


Figura 7. Procedimiento para la determinación de flavonoides totales.

IV.7. Identificación de los compuestos fenólicos mediante HPLC

El procedimiento para la identificación de los compuestos fenólicos se realizó de acuerdo al método descrito por Cantos *et al.* (2000), con modificaciones. El equipo utilizado fue un Agilent 1100 Series, equipado con un detector de luz de arreglo de diodos. Se utilizó una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 x 250 mm, 5 µm). Los solventes fueron agua: ácido fórmico (95:5) (solvente A) y Metanol grado HPLC (solvente B) a un flujo de 1mL/min. La elusión se realizó con un gradiente de un 0 a un 60% de B a los 60 min. Los cromatogramas fueron registrados a 280, 290 y 340nm.

IV.8. Evaluación de la actividad antiproliferativa

La actividad antiproliferativa de los ECU y ESU fue medida evaluando la viabilidad celular usando el método del MTT (Mosmann, 1983). Dicho método se basa en la habilidad de las enzimas mitocondriales deshidrogenasas, presentes sólo en células viables, de unirse a los anillos de la sal de tetrazolio (MTT) de coloración amarilla para reducirlos a cristales de formazán, de color azul-púrpura; dichos cristales son impermeables a la membrana celular, dando como resultado una acumulación de éstos dentro de las células sanas.

Células tumorales de las líneas HeLa (Adenocarcinoma de cérvix), MDA-MB-231 (Adenocarcinoma invasivo de mama) y ARPE-19 (Epitelio pigmentado de retina) fueron cultivadas en su medio de cultivo apropiado. Las células fueron cultivadas en una placa ELISA de 96 pozos a una densidad de 2×10^6 células/mL en cada pozo usando un breve tratamiento con tripsina, para pasar a agregar concentraciones de 1, 0.5, 0.25 y 0.125 mg/mL de los extractos de CU y SU en los pozos correspondientes. Después de 48 h de incubación a una temperatura de 37 °C, en una atmósfera de 5 % de CO₂ y una humedad relativa de 80-90 % en una incubadora VWR 2425, se agregaron 10 µL del reactivo MTT y se incubó de nuevo durante 4 h para pasar a determinar la absorbancia a 550 nm (Beckman Coulter AD340) (Figura 8). Se utilizó cis-platino como control positivo y medio de cultivo como control negativo para todos los ensayos.

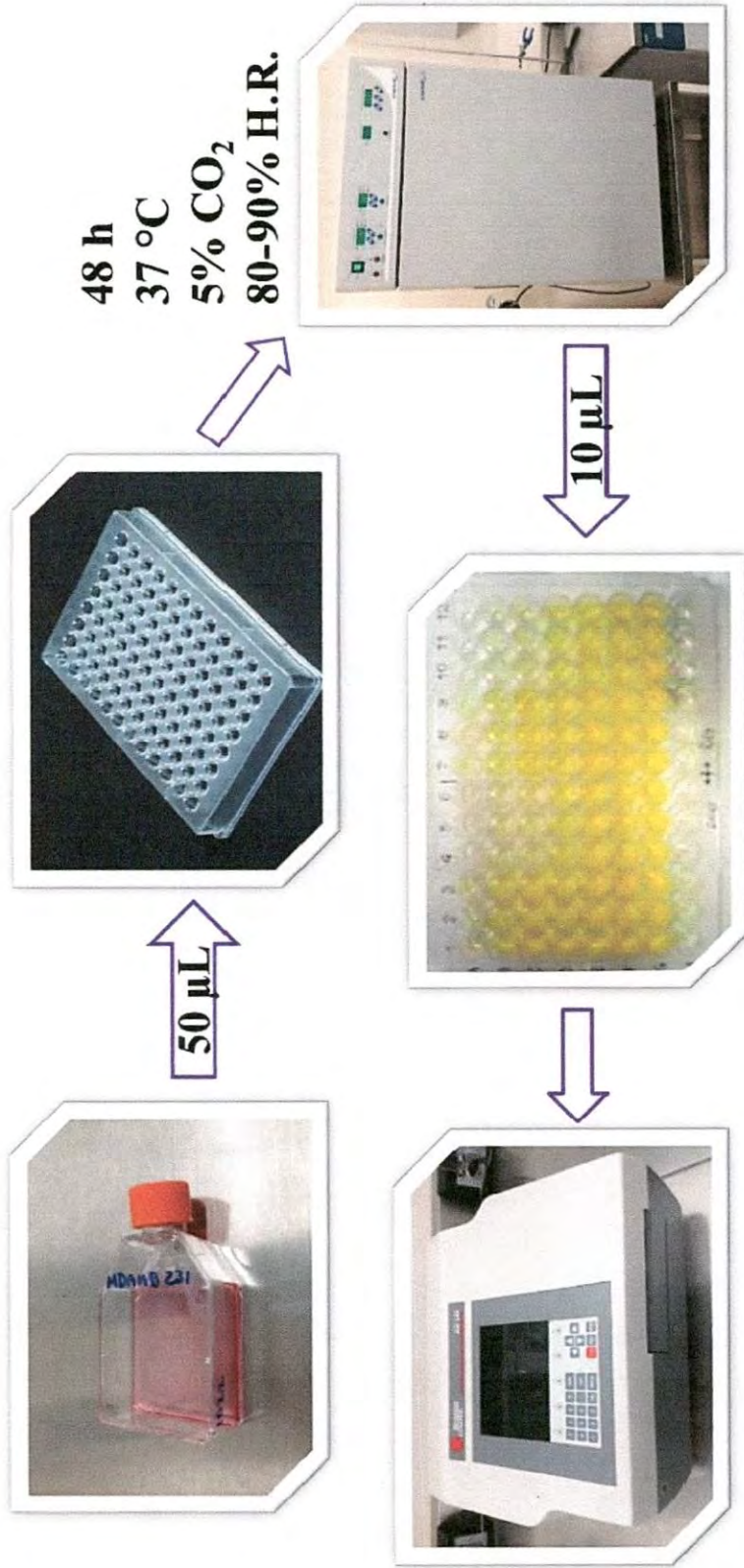


Figura 8. Procedimiento para la evaluación de la actividad antiproliferativa.

IV.9. Análisis estadístico

Se realizó un ANOVA de una vía y una comparación de medias mediante la prueba de Tukey para las variables de respuesta. Se realizaron análisis de correlación lineal para los datos requeridos. Los resultados son expresados como medias \pm E.S. $P < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo. Todos los análisis se realizaron por triplicado. Se realizaron pruebas de normalidad y de homocedasticidad para todas las variables de respuesta. El software utilizado fue el GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc, San Diego, CA.).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1. Rendimiento de la extracción metanólica

Se procesaron 1,250 g de bagazo de uva, el cual fue recolectado en el mes de Junio del 2011. El Bagazo fue analizado en sus dos componentes principales, la cáscara y la semilla, siendo 1,100 y 150 g respectivamente. Ambas fueron congeladas a -20°C y se procedió a su liofilización; después de la liofilización se obtuvieron 124.6 g de cáscara y 44.7 g de semilla; lo cual indica un alto contenido de agua en el vegetal, 92.2% de agua en CU y 88.8% de agua en SU (Tabla 3). El rendimiento de la extracción metanólica se muestra en la Tabla 4, resultando ser mayor en la SU que en la CU, 15.2 y 7.7%, respectivamente. Estos resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por García-Becerra (2010), quien en su trabajo realizó extracciones de orujo de uva con cinco diferentes extracciones, siendo la extracción alcohólica con la que obtuvo mayor rendimiento, siendo éste del 8.11%.

Tabla 3. Rendimiento de la liofilización de cáscara y semilla de uva.

Parte de la uva	Peso fresco (g)	Peso liofilizado (g)	Contenido agua (%)
Cáscara	1100	81.8	92.5
Semilla	150	24.9	83.4

Tabla 4. Rendimiento de la extracción metanólica.

Parte de la uva	Peso (g)	Extracto metanólico recuperado (g)	Rendimiento (%)
Cáscara	81.8	6.3	7.7
Semilla	24.9	3.8	15.2

V.2. Determinación de fenoles y flavonoides totales mediante HPLC

En el presente estudio, se cuantificó el contenido de fenoles y flavonoides totales de CU y SU, mismos que son ampliamente relacionados con sus actividades biológicas (Bunea *et al.*, 2012). Los fenoles y flavonoides totales se muestran en la Tabla 5; el más alto contenido de fenoles totales fue encontrado en la CU (5.04 ± 1.19 mg/g de peso seco) y el más bajo en la SU (1.15 ± 0.39 mg/g de peso seco).

Estos resultados son similares a los reportados por Molina-Quijada *et al.* (2010), quienes reportaron fenoles totales de 7.18 mg/g en cáscara de uva de mesa Sugar one, y valores de hasta 10.60 mg/g de peso seco en cáscara de uva industrial roja Carignane. Sin embargo, otros estudios reportan niveles mucho más bajos, como el caso de Kuskoski *et al.* (2005), quienes encontraron niveles de fenoles totales de 1.17 mg/g de peso seco, y Hogan *et al.* (2009), que reportaron niveles de fenoles totales de 1.82 ± 0.07 mg/g de peso seco, los tres estudios mencionados fueron reportados también como equivalentes de ácido gálico.

Tabla 5. Contenido de fenoles y flavonoides totales.

Extracto metanólico	Fenoles totales (mg/g peso seco)	Flavonoides totales (mg/g peso seco)
Cáscara de uva	5.04 ± 1.19	2.91 ± 0.85
Semilla de uva	1.15 ± 0.39	0.86 ± 0.12

Los fenoles totales se muestran como mg/g de peso seco equivalentes de ácido gálico. Los flavonoides totales se muestran como mg/g de peso seco equivalentes de quercetina.

Los niveles más altos de flavonoides fueron detectados en CU (2.91 ± 0.85 mg/g de peso seco) y los más bajos estuvieron en la SU (0.86 ± 0.12 mg/g de peso seco). A diferencia del contenido de fenoles totales, los flavonoides totales fueron muy similares a los reportados por Hogan *et al.* (2009), siendo éstos de 1.19 ± 0.03 mg/g peso seco en cáscara de uva industrial roja, sin embargo, hay estudios que muestran valores mayores a los encontrados en el presente estudio, como lo son el caso de Mané *et al.* (2007), quienes reportaron contenidos de flavonoides totales cercanos a los 6.00 mg/g de peso seco. Las diferencias de fenoles y

flavonoides totales de los estudios mencionados se pueden deber a la maduración, al tipo de riego, al tipo de tierra, o al tipo de secado de las uvas (Teixeira *et al.*, 2013).

V.3. Identificación de los compuestos fenólicos

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ha sido descrita por una gran cantidad de autores durante las últimas décadas, por lo que el procedimiento adecuado para realizar la experimentación requerida por cada investigador debe ser optimizado por él mismo según sus necesidades (Moserova *et al.*, 2009).

En el presente estudio se utilizaron 8 estándares diferentes de flavonoides que han sido reportados como compuestos presentes en la uva, dichos estándares fueron: ácido gálico, catequina, quercetina, vainillina, flavona, hidroxiflavona, rutina y ácido elágico. Los extractos de CU y SU se inyectaron en el HPLC bajo las mismas condiciones que una mezcla de los estándares, dando como resultados picos con tiempos de retención muy similares a los del ácido gálico, catequina, vainillina, rutina, quercetina e hidroxiflavona en el caso de la CU, así como también tiempos de retención muy similares a los del ácido gálico, catequina, vainillina, rutina, ácido elágico y quercetina en el caso de la SU; los cromatogramas de los extractos de CU y de SU en comparación con el cromatograma de la mezcla se pueden observar en la Figuras 9 y 10, respectivamente.

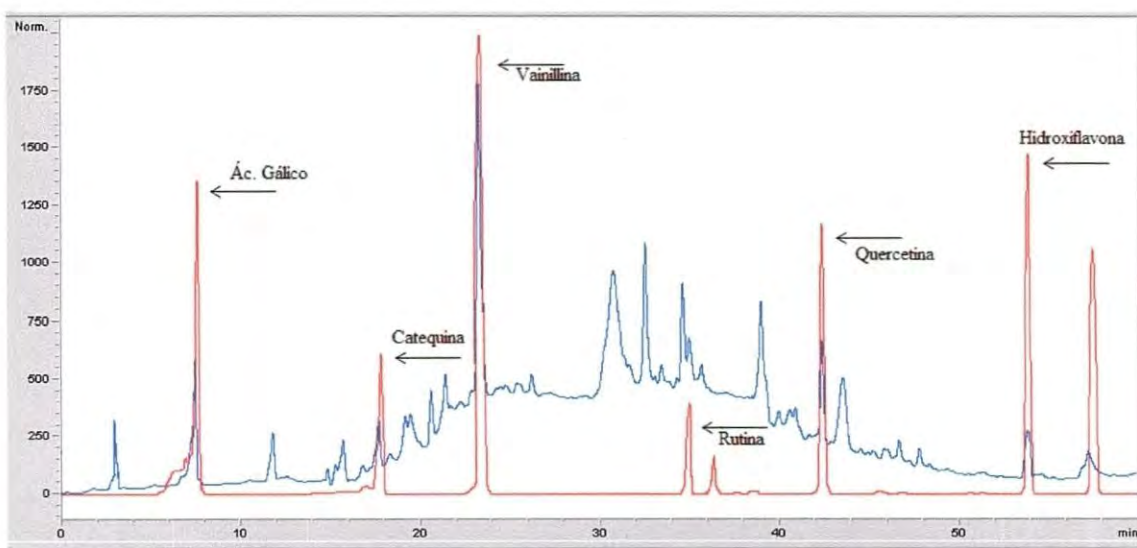


Figura 9. Cromatograma del extracto de cáscara de uva (línea azul) en comparación con la mezcla de estándares (línea roja).

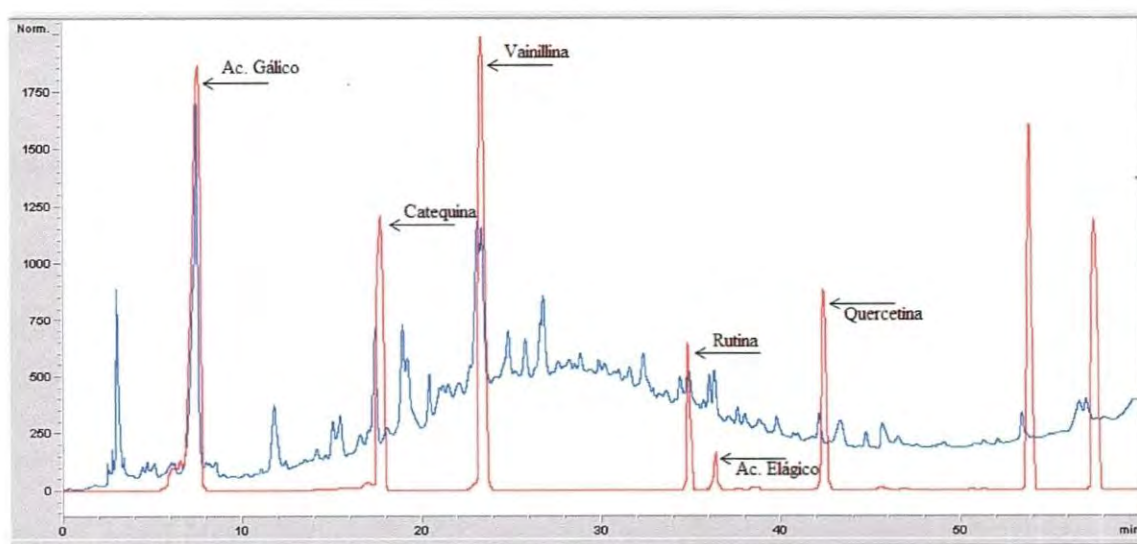


Figura 10. Cromatograma del extracto de semilla de uva (línea azul) en comparación con la mezcla de estándares (línea roja).

V.4. Evaluación de la Actividad Antiproliferativa

En el presente estudio fue evaluada la inhibición del crecimiento celular de los extractos de CU y SU usando modelos celulares *in vitro* de células de cáncer cervicouterino (HeLa) y células de cáncer de mama (MDA-MB-231). La actividad antiproliferativa de diferentes concentraciones de los extractos de CU y SU contra la línea celular MDA-MB-231 se muestra en la Figura 11, y contra la línea celular HeLa se muestra en la Figura 12.

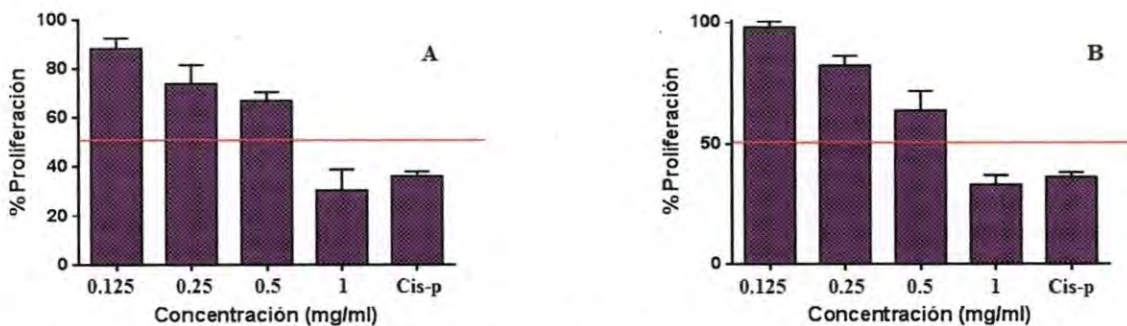


Figura 11. Proliferación de células MDA-MB-231 en presencia de diferentes concentraciones de los extractos. A. Cáscara de uva. B. Semilla de uva.

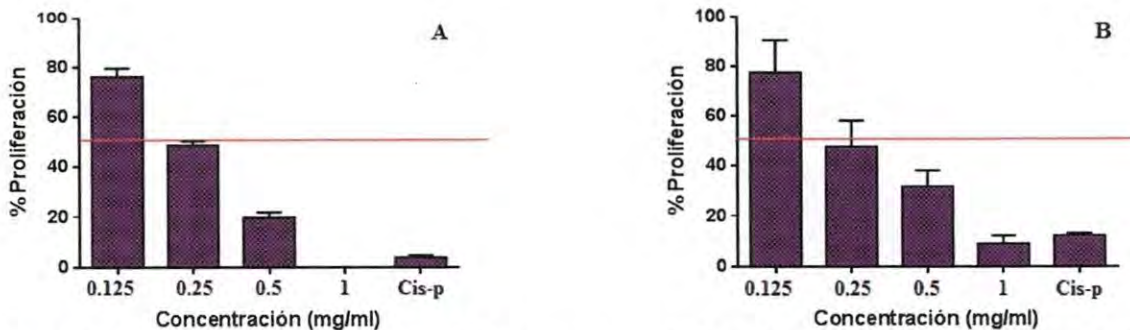


Figura 12. Proliferación de células HeLa en presencia de diferentes concentraciones de los extractos. A. Cáscara de uva. B. Semilla de uva.

Los valores de la actividad antiproliferativa se muestran en la Tabla 6, los cuales están expresados como IC_{50} del extracto contra las células. Ambos extractos exhibieron una potente actividad antiproliferativa contra ambas líneas celulares, siendo mayor el de ECU, con

valores de 702.39 $\mu\text{g/mL}$ contra células MDA-MB-231 y de 296.54 $\mu\text{g/mL}$ contra células HeLa, mientras que la IC_{50} del ESU fue de 738.25 $\mu\text{g/mL}$ contra células MDA-MB-231 y 346.95 $\mu\text{g/mL}$ contra células HeLa; en cambio contra la línea celular normal (ARPE-19) no mostraron actividad antiproliferativa elevada, siendo las IC_{50} de 755.75 y 1,171.81 de los extractos de cáscara y semilla de uva, respectivamente (Figura 13).

Tabla 6. Actividad antiproliferativa (IC_{50}) de los extractos metanólicos de CU y SU ($\mu\text{g/mL}$).

Extracto metanólico	Líneas celulares		
	MDA-MB-231	HeLa	ARPE-19
Cáscara de uva (CU)	702.39	296.54	755.75
Semilla de uva (SU)	738.25	346.95	1171.81

Los anteriores resultados concuerdan con lo reportado por Esfahanian *et al.* (2013), quienes al utilizar diferentes variedades de *Vitis vinifera*, obtuvieron en extractos de cáscara IC_{50} poco mayores a 750 $\mu\text{g/mL}$ contra la línea celular MDA-MB-231. Matito *et al.* (2003), reportaron valores de IC_{50} mayores para extractos metanólicos de una mezcla de cáscara, semilla y tallos de uva al fraccionar el extracto alcohólico principal, dando como resultados valores de 43 hasta 81 $\mu\text{g/mL}$ en las diferentes fracciones de extractos analizadas, dichos resultados sobre la línea celular cancerígena Hepa 1c1c7 (hepatoma de ratón). El alto efecto inhibitorio alcanzado por los extractos de CU y SU puede ser atribuido a su contenido de compuestos fenólicos (Maier *et al.*, 2009).

Contra la línea celular normal de retina (ARPE-19) no se alcanzó tan elevada actividad antiproliferativa como contra las líneas cancerígenas HeLa y MDA-MB-231 (Figura 13).

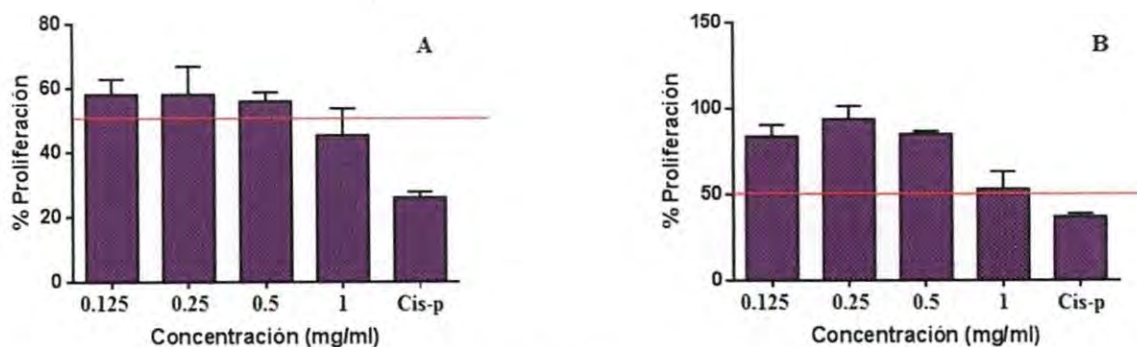


Figura 13. Proliferación de células ARPE-19 en presencia de diferentes concentraciones de los extractos. A. Cásara de uva. B. Semilla de uva.

En el presente estudio, no se puede afirmar que la inhibición de la proliferación de las células cancerígenas se debe a la concentración de fenoles o flavonoides totales por sí solos, lo que sugiere que puede haber una actividad sinérgica entre ellos, o inclusive algunos otros fitoquímicos pueden jugar un papel importante en la actividad antiproliferativa de la cáscara y la semilla de uva.

VI. CONCLUSIONES

El extracto de cáscara de uva contiene compuestos fenólicos (5.04 ± 1.19 mg/g peso seco) en una proporción de 5 veces más que el extracto de semilla de uva (1.15 ± 0.39 mg/g peso seco).

Los flavonoides totales presentes en el extracto de cáscara de uva son cerca del 60% de los compuestos fenólicos totales presentes, mientras que en el extracto de semilla de uva abarcan cerca del 75% de los compuestos fenólicos totales.

En los cromatogramas obtenidos mediante HPLC, los extractos de la cáscara de uva mostraron picos con tiempos de retención muy similares a los del ácido gálico, catequina, vainillina, rutina, quercetina e hidroxiflavona. Mientras que en el caso del extracto semilla de uva similares al ácido gálico, catequina, vainillina, rutina y ácido elágico.

El extracto de cáscara de uva mostró una actividad antiproliferativa significativa sobre las líneas celulares de adenocarcinoma de cérvix (HeLa; $IC_{50} = 287.96$ μ g/mL) y adenocarcinoma invasivo de mama (MDA-MB-231; $IC_{50} = 702.39$ μ g/mL).

El extracto de semilla de uva mostró una actividad antiproliferativa significativa sobre las líneas celulares de adenocarcinoma de cérvix (HeLa; $IC_{50} = 322.80$ μ g/mL) y adenocarcinoma invasivo de mama (MDA-MB-231; $IC_{50} = 738.25$ μ g/mL).

Con base a los resultados obtenidos de esta investigación, los extractos metanólicos de cáscara y semilla de uva poseen una significativa actividad antiproliferativa, por lo que pueden ser propuestos como productos naturales alternativos para el tratamiento de enfermedades.

VII. RECOMENDACIONES

Con base en lo realizado en el presente trabajo de investigación, se sugieren las siguientes recomendaciones con el fin de elucidar aspectos adicionales relacionados con los compuestos fenólicos presentes en la uva (*Vitis vinifera* L.) y su actividad antiproliferativa.

1. Utilizar técnicas específicas para aislar e identificar los compuestos fenólicos individuales presentes en la cáscara y semilla de uva.
2. Evaluar la actividad antiproliferativa de los compuestos individuales en líneas celulares diferentes a las utilizadas en el presente estudio.
3. Conducir a nuevas investigaciones *in vivo* sobre células cancerígenas.

VIII. LITERATURA CITADA

- Aggarwal, B.B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R.S., Seeram, N.P., Shishodia, S., Takada, Y. 2004. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Research*. 24, 2783–2840.
- Agustín-Salazar, S., Medina-Juárez, L.A., Soto-Valdez, H., Manzanarez-Lopez, F., Gámez-Meza, N. 2014. Influence of the solvent system of the composition of the phenolic substances and antioxidant capacity of extracts of grape (*Vitis vinifera* L.) marc. *Australian Society of Viticulture and Oenology*. 20 (2), 208-213.
- Ainsworth, E.A., Gillespie, K.M. 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nat. Protoc.* 2, 875-877.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson J. D. 1996. *Biología Molecular de la Célula*. Tercera edición. Ediciones Omega S.A.P. 481-484.
- Arts, I.C.W., Hollman, P.C.H., Bueno de Mesquita, H.B., Feskens, E.J.M., Kromhout, D. 2001. Dietary catechins and epithelial cancer incidence: the Zutphen elderly study. *Int. J. Cancer*. 92, 298-302.
- Ávila-Barceló, J.R. 2009. Evaluación *in vitro* de Actividad Antiproliferativa de Extractos Proteicos de Tejido Estomacal de Tiburón en Células HeLa. Tesis de Maestría. Universidad de Sonora. 37 p.
- Bagchi, D., Bagchi, M., Stohs, S., Ray, S.D., Sen, C.K., Preuss, H.G. 2002. Cellular protection with proanthocyanidins derived from grape seeds. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 957, 260-270.
- Bagiu, R.V., Vlaicu, B., Butnariu, M. 2012. Chemical composition of *in vitro* antifungal activity screening of the *Allium Ursinum* L. (Liliaceae). *International Journal of Molecular Sciences*. 13, (2): 1426-1436.
- Benito, S., Lopez, D., Sáiz, M.P., Buxaderas, S., Sánchez, J., Puig-Parellada, P., Mitjavila, M.T. 2002. A flavonoid-rich diet increases nitric oxide production in rat aorta. *British Journal of Pharmacology*. 135, 910-916.
- Boik, J. 2001. Cancer at the cellular level / clinical considerations. Part I and part III in natural compounds in cancer therapy. *Promising nontoxic antitumor agents from plants & and other natural sources*. Quality Books. 1 (33): 251-267.

- Bunea, C. I., Pop, N., Babeș, A. C., Matea, C., Dulf, F. V., Bunea, A. 2012. Carotenoids, total polyphenols and antioxidant activity of grapes (*Vitis vinifera*) cultivated in organic and conventional systems. *Chemistry Central Journal*, 6(1), 66.
- Caillet S, Salmiéri S, Lacroix M. 2006. Evaluation of free radical-scavenging properties of commercial grape phenol extracts by a fast colorimetric method. *Food Chemistry*. 95, 1-8.
- Cantos, E., García-Viguera, C., de Pascual-Teresa, S. y Tomás-Barberán, F. A. 2000. Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of cv. Napoleon table grapes. *Journal of agricultural and food chemistry*. 48, 4606–4612.
- Cavenee W.K., White R.L. 1995. The genetic basis of cancer. *Scientific American*. 272, 72-79.
- Chang, C., Yang, M., Wen, H., Chern, J. 2002. Estimation of Total Flavonoids Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal of Food and Drugs Analysis*. 10, 178-182.
- Del Maso L., Tavani A., Zucchetto A., Montella M., Ferraroni M., Negri E., Polesel J., Decarli A., Talamini R., La Vecchia C., Franceschi S. 2011. Anthropometric measures at different ages and endometrial cancer risk. *British Journal of Cancer*. 7, 1207-1213.
- Devi, A., Jolitha, A.B., Ishii, N. 2006. Grape seed proanthocyanidin extract (GSPE) and antioxidant defense in the brain of adult rats. *Medical science monitor*, 12(4), BR124-BR129. 12, 124-129.
- Domingo, D., López-Brea, M. 2003. Plantas con acción antimicrobiana. *Revista especializada quimioterapia*. S. E. D. Madrid, Hospital universitario de la princesa. 385–393.
- Esfahanian, Z., Behbahani, M., Shanehsaz, M., Hessami, M. J., & Nejatian, M. A. 2013. Evaluation of Anticancer Activity of Fruit and Leave Extracts from Virus Infected and Healthy Cultivars of *Vitis vinifera*. *Cell J*. 15, 116-123.
- Falcao, J. M., Dias, J.A., Miranda, A.C., Leitao, C.N., Lacerda, M.M. Cayolla Da Motta, L. 1994. Red wine consumption and gastric cancer in Portugal: a case-control study. *European Journal of Cancer Prevention*. 3, 269–276.
- FAOSTAT, 2014. Retrieved February 20, 2014. <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/browse/Q/QC/E>
- Faria, A., Calhau, C., de Freitas, V., Matheus, N. 2006. Procyanidins as antioxidants and tumor cell growth modulators. *J. Agric. Food Chem*. 54, 2392-2397.
- Flavel, T.C., Murphy, D.V., Lalor, B.M. y Fillery, I.R.P. 2005. Gross N mineralization rates after application of composted grape marc to soil. *Soil Biology and Biochemistry*. 37, 1397–1400.

- Galluzzi, L., Larochette, N., Zamzami, N., Kroemer, G. 2006. Mitochondria as therapeutic targets for cancer chemotherapy. *Oncogene*. 25, 4812-4830.
- García-Becerra, L.E. 2010. Actividad biológica e identificación de compuestos del extracto de orujo de uva (*Vitis vinifera*. Var. Rubi Cabernet). Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Nuevo León. 109 p.
- García-Closas, R., González, C.A., Agudo, A., Riboli, E. 1999. Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of gastric cancer in Spain. *Cancer Causes Control*. 10, 71-75.
- GLOBOCAN. 2012. 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012.
- Hakimuddin, F., Paliyath, G., Meckling, K. 2006. Treatment of MCF7 breast cancer cells with a red grape wine polyphenol fraction results in disruption of calcium homeostasis and cell cycle arrest causing selective cytotoxicity. *J. Agr. Food Chem.* 54, 7912-7923.
- Hanson, J. 2003. The classes of natural products and their isolation. Ch 1. In Natural Products: The Secondary Metabolites. *The Royal Society of Chemistry* (Ed). pp. 1-33. Cambridge, UK.
- Hartle, D.K., Greenspan, P., Hargrove, J.L. 2005. *Muscadine Medicine*, 1st ed. Blue Heron Nutraceuticals: Fullerton, CA, USA. 47-96
- Hogan, S., Zhang, L., Li, J., Zoecklein, B., Zhou, K. 2009. Antioxidant properties and bioactive components of Norton (*Vitis aestivalis*) and Cavernet Franc (*Vitis vinifera*) wine grapes. *Food Science and Technology*. 42, 1269-1274.
- Hogan, S., Canning, C., Sun, S., Sun, X., Zhou, K. 2010. Effects of grape pomace antioxidant extract on oxidative stress and inflammation in diet induced obese mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58, 11250– 11256.
- Hogan, S., Canning, C., Sun, S., Sun, X., Kadouh, H., Zhou, K. 2011. Dietary supplementation of grape skin extract improves glycemia and inflammation in diet-induced obese mice fed a western high fat diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59, 3035–3041.
- Hollecker, L., Pinna, M., Filippino, G., Scrugli, S., Pinna, B., Argiolas, F., Marru, M. 2009. Simultaneous determination of polyphenolic compounds in red and white grapes grown in Sardinia by high performance liquid chromatography-electron spray ionization-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1216, 3402-3408.
- Hsieh, T.C., Wijeratne, E.K., Liang, J.Y., Gunatilaka, A.L., Wu, J.M. 2005. Differential control of growth, cell cycle progression, and expression of NF- κ B in human breast cancer cells MCF-7, MCF-10A, and MDA-MB-231 by ponocidin and oridonin,

diterpenoids from the chinese herb *Rabdosia rubescens*. *Biochemical and biophysical research communications*. 337, 224-231.

Huang, Z., Wang, B., Williams, P., Pace, R. 2009. Identification of anthocyanins in muscadine grapes with HPLC-ESI-MS. *LWT-Food Science and Technology*. 42,819-824.

INEGI. 2008. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Retrieved February 20, 2014. <http://www.inegi.gob.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2008/cancer08.doc>.

INEGI. 2012. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Retrieved February 20, 2014. <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2012/cancer0.doc>.

Isnard-Bagnis, C., Moulin, B., Launay-Vacher, V., Izzedine, H., Tostivint, I., Deray, G. 2005. Anticancer drug-induced nephrotoxicity. *Nephrol Ther.* 1, 101-114.

Jang, M., Cai, L., Udeani G.O. 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*. 275, 218–220.

Jiménez-Estrada, M., Velázquez-Contreras, C., Garibay-Escobar, A., Sierras-Canchola, D., Lapizco-Vázquez, R., Ortiz-Sandoval, C., Burgos-Hernandez, A., Robles-Zepeda, R.E. 2013. In vitro antioxidant and antiproliferative activities of plants of the ethnopharmacopeia from Northwest of Mexico. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 13, 12.

Khan, N., Mukhtar, H. Multitargeted 2008. Therapy of cancer by green tea polyphenols. *Cancer left*. 269, 269-280.

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

Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., Fett, R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology (Campinas)*. 25, 726-732.

Lu Y., Foo, L. Y. 1999. The polyphenol constituents of grape Pomace. *Food Chemistry*. 65, 1–8.

Mané, C., Souquet, J. M., Olle, D., Verries, C., Veran, F., Mazerolles, G., Fulcrand, H. 2007. Optimization of simultaneous flavanol, phenolic acid, and anthocyanin extraction from grapes using an experimental design: application to the characterization of champagne grape varieties. *Journal of agricultural and food chemistry*. 55, 7224-7233.

- Maier, T., Schieber, A., Kammerer, D.R., Carle, R. 2009. Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. *Food Chem.* 112, 551-559.
- Matés J.M., Sánchez-Jiménez, F.M. 2000. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology.* 32, 157-170.
- Matito, C., Mastorakou, F., Centelles, J.J., Torres, J.L., Cascante, M. 2003. Antiproliferative effect of antioxidants polyphenols from grape in murine Hepa-1c1c7. *Eur J. Nutr.* 42, 43-49.
- Molina-Quijada, D.M.A., Medina-Juárez, L.A., González-Aguilar, J.A., Robles-Sanchez, R.M., Gámez-Meza, N. 2010. Compuestos fenólicos y actividad antioxidante de cáscara de uva (*Vitis vinifera* L.) de mesa cultivada en el Noroeste de México. Phenolic compounds and antioxidant activity of table grapes (*Vitis vinifera* L.) skin form northwest Mexico. *CyTA – Journal of Food.* 8, 57-63.
- Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B., Laureano, O., Ricardo da Silva, J.M. 2003. Monomeric, oligomeric, and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* L. Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *J. Agric. Food Chem.* 51, 6475-6481.
- Morrissey, C., O'Neil A., Spengler, B., Christoffel V., Fitzpatrick, J., Watson, R. 2005. Apigenin drives the production of reactive oxygen species and initiates a mitochondrial mediated cell death pathway in prostate epithelial cells. *Prostate.* 63, 131-142.
- Moserova, M., Kotrbova, V., Aimova, D., Sulc, M., Frei, E., Stivorova, M. 2009. Analysis of benzo[a]pyrene metabolites formed by rat hepatic microsomes using high pressure liquid chromatography: optimization of the method. *Interdiscip Toxicol.* 4, 239-244.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- Muñoz, A. 1997. *Cáncer: genes y nuevas terapias* (Vol. 2). Editorial Hélice.
- Pelayo-Martínez, F.P. 2013. Actividad antiproliferativa del extracto metanólico de *Asparagus* spp. sobre las líneas celulares cancerígenas HeLa y A-549. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora. 44 p.
- Peña, E., Badillo, D., Viana, M.T., Correa-Reyes, G. 2007. Utilización de bagazo de uva como un ingrediente en la formulación de alimentos balanceados para juveniles de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). Pp. 15-17 in XIII CONGRESO BIENAL AMENA: DR. ALBERTO
- RIVERA BRECHU. VERACRUZ 2007. Pérez, R., Ávila, A., Edgill, R., Colon, Y., Quesada, W., Bello, J. Panfet, C. 2005. Actividad antitumoral de una mezcla de polisacáridos

- obtenida de la especie *Argemone mexicana*. L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 10, 3-4.
- Pezzuto, J.M. 2008. Grapes and human health: A perspective. *J. Agric. Food Chem.* 56, 6777-6784.
- Pinatel, E.M., Orso, F., Penna, E., Cimino, D., Elia, A.R., Circosta, P., Dentelli, P., Brizzi, M.F., Provero, P., Taverna, D. 2014. miR-223 is a coordinator of breast cancer progression as revealed by bioinformatics predictions. *PLoS One*. 9(1): e84859.
- Pinelo, M., Arnous, A., Meyer, A.S. 2006. Upgrading of grape skins: Significance of plant cell wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science and Technology*. 17, 579-590.
- Ramírez-Sánchez, I., Maya, L., Ceballos, G., Villarreal, F. 2010. Fluorescent detection of (-)-epicatechin in microsamples from cacao seeds and cocoa products: Comparison with Folin-Ciocalteu method. *J. Food Compost Anal.* 23, 790-793.
- Rivera, O.M.P., Moldes, A.B., Torrado, A.M., Domínguez, J.M. 2007. Lactic acid and biosurfactants production from hydrolyzed distilled grape marc. *Process Biochemistry*. 42. 1010-1020.
- Sarker, S.D., Latif, Z., Gray, A.I. 2006. *Natural products Isolation*. Second edition. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey, 1-5.
- Seeram, N.P., Adams, L.S., Henning S.M. 2005. in vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 16, 360-367.
- Shibuya, K., Mathers, C.D., Boschi-Pinto, C., Lopez, A.D., Murray, C.J. 2002. Global and regional estimates of cancer mortality and incidence by site: II. Results for the global burden of disease 2000. *BMC Cancer*. 2, 37.
- SIAP. 2012. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Ciclo: Perennes 2012. Retrieved February 20, 2014. (<http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>)
- Singh, T., Sharma, S.D., Katiyar, S.K. 2011. Grape proanthocyanidins induce apoptosis by loss of mitochondrial membrane potential of human non-small cell lung cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *PLoS One*. 6 (11), e27444.
- Soobrattee, M.A., Neergheen V.S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O.I., Bahorun, T. 2005. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and action. *Mutat. Res.* 579, 200-213.
- Sun, Q., Prasad, R., Rosenthal, E., Katiyar, S.K. 2011. Grape seed proanthocyanidins inhibit the invasive potential of head and neck cutaneous squamous cell carcinoma cells by

- targeting EGFR expression and epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 11, 134.
- Teixeira, A., Eiras-Dias, J., Castellarin, S. D., Gerós, H. 2013. Berry phenolics of grapevine under challenging environments. *International journal of molecular sciences*. 14, 18711-18739.
- Thakur, V.S., Gupta, K., Gupta, S. 2012. The Chemopreventive and Chemotherapeutic Potentials of Tea Polyphenols. *Curr Pharm Biotechnol*. 13, 191-199.
- Tsao, R., Yang, R. 2003. Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: Towards a total phenolic index using high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1018: 29-40.
- USDA. 2014. Natural Resources Conservation Service: Plants Profile. United States Department of Agriculture. Retrieved January 19, 2014. (<http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=VIVI5>).
- Veluri, R., Singh, R.P., Liu, Z., Thompson, J.A., Agarwal, R., Agarwal, C. 2006. Fractionation of grape seed extract and identification of gallic acid as one of the major active constituents causing growth inhibition and apoptotic death of DU145 human prostate carcinoma cells. *Carcinogenesis*. 27, 1445-1453.
- Viel, J. F., Perarnau, J.M., Challier, B., Faivre-Nappey, I. 1997. Alcoholic calories, red wine consumption and breast cancer among premenopausal women. *European Journal of Epidemiology*. 13, 639–643.
- Wang, L., Lee, I. M., Zhang, S. M., Blumberg, J.B., Buring, J. E., Sesso, H. D. 2009. Dietary intake of selected flavonols, flavones, and flavonoid-rich foods and risk of cancer in middle-aged and older women. *Am J. Clin. Nutr.* 89, 905-912.
- World Health Organization (WHO). 2014. Nota Descriptiva N°297. Retrieved February 20, 2014. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>.
- Xia, E.-Q., Deng, G.-F., Guo, Y.-J., Li, H.-B. 2010. Biological activities of polyphenols from grapes. *Int. J. Mol. Sci*. 11, 622-646.
- Yilmaz, Y., Toledo, R. 2004. Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52,255-260.
- Zenser, T.V., Mattammal, M.B., Wise, R.W. 1983. Prostaglandin H synthase-catalyzed activation of benzidine: a model to assess pharmacologic intervention of the initiation of chemical carcinogenesis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 227, 545–550.
- Zhang, X.Y., Li, W.G., Wu, Y.J. 2005. Proanthocyanidin from grape seeds potentiates anti-tumor activity of doxorubicin via immunomodulatory mechanism. *International Immunopharmacology*. 5, 1247–1257.

T-160201