



Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Ciencias Químico Biológicas
Programa Regional de Posgrado en Biotecnología
Maestría en Ciencias con Orientación en Biotecnología

Efecto Anticancerígeno de Fracciones Ricas en Polifenoles y Antocianinas de Tortilla de Maíz Criollo Azul en Líneas Celulares Daoy, Hela y Sw-480

TESIS

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias con Orientación en Biotecnología Agroalimentaria

Que presenta

LN. Cristian Yuriana González

Director de Tesis
Dr Jorge Milán Carrillo
Dr Oscar Alberto Pérez González

Culiacán de Rosales, SIN, MEX.

Abril, 2019

El presente trabajo de investigación, titulado **“Efecto Anticancerígeno de Fracciones Ricas en Polifenoles y Antocianinas de Tortilla de Maíz Criollo Azul en Líneas Celulares Daoy, HeLa y SW-480”** se llevó a cabo en los Laboratorios del Programa Regional de Posgrado en Biotecnología, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, y en el Laboratorio de Oncología Experimental, Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, Instituto Nacional de Pediatría, Ciudad de México. Este proyecto fue financiado por CONACyT CIENCIA BÁSICA 2015-2017 (Responsable técnico Dr. Jorge Milán Carrillo). La LN. Cristian Yuriana González recibió Beca de Estudios de Maestría por parte de CONACyT, y Beca para terminación de Tesis.

DEDICATORIA

**A Dios,
a mis Abuelos amados
a mi Madre linda
a mi querido amor, Miguel**

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada, a la **Universidad Autónoma de Sinaloa**, por brindarme la oportunidad y los espacios para realizar mi Maestría en la **Facultad de Ciencias Químico Biológicas**.

Al Programa de **Posgrado Regional de Posgrado en Biotecnología**, por darme la oportunidad de hacer ciencia y contribuir con un granito de arena a la sociedad y a su vez, a mi formación académica como Maestra en Ciencias.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por la Beca otorgada para la realización de mis estudios en el área de Biotecnología Agroalimentaria.

A todos aquellos **Maestros** que aportaron sus conocimientos para que, de una manera u otra, formaron mi caminar académico durante mi estancia en la Maestría, sin duda alguna, fueron muchos los aprendizajes, no resta más que decirles, muchas gracias por compartir conmigo sus conocimientos.

Al **Dr. Jorge Milán Carrillo**, por haberme aceptado como su alumna de Maestría. Desde el momento que me acerque con usted en aquel Simposium empezaba una aventura más, llamada Maestría, muchas gracias por la confianza brindada desde entonces y por darme todo el apoyo para realizar mi proyecto, y la estancia en la Ciudad de México. Gracias a todo esto es que mi formación académica fue muy productiva y de gran aprendizaje para mí.

Al **Dr. Oscar Alberto Pérez González**, Dr. que le puedo decir a usted que no le haya dicho antes. Gracias totales por todo su apoyo, no solo por aceptarme como su alumna en el Instituto, si no que por todas sus enseñanzas y conocimientos compartidos conmigo, gracias por toda su paciencia y por motivarme siempre a seguir. Para mí fue muy valiosa la estancia en la Ciudad de México, y fue gracias a usted. También gracias por aguantar mis locuras.

A la **Dra. Edith Cuevas Rodríguez**, por brindarme toda la asesoría necesaria y hasta incluso regaños durante toda la Maestría, gracias Dra por siempre mostrar

interés en mi proyecto y hacerme sentir en casa a la hora de trabajar. Gracias por compartir su amistad conmigo y siempre apoyarme con las dudas que tenía y también por quererme ayudar siempre con sus consejos, sabe que la quiero mucho, y que siempre cuenta conmigo.

A la **Dra. Saraid Mora Rochín**, Dra gracias infinitas y totales por todo lo que ha hecho por mi, sin usted, sin todas sus revisiones, sus correcciones y sus aportaciones a mi trabajo de Tesis, para nada hubiera sido posible llegar hasta la etapa final. Mi más sincero reconocimiento a su dedicación, buena actitud, motivación y sobre todo cariño a la hora de sentarme y trabajar con usted, para mi ha sido un placer ser su asesorada. Muchas gracias por toda su motivación siempre para concluir con mi trabajo, por esas personitas especiales como usted, es que los estudiantes no dejamos nuestros sueños, la quiero mucho y valoro mucho toda su entrega para mi trabajo. Que Dios me la bendiga siempre.

A todos los **Doctores** del Laboratorio por siempre darme sus consejos y opiniones respecto a mi Proyecto de Investigación, y también por todos esos ánimos cuando algo no salía bien, en especial al **Dr. Cuauhtémoc Reyes Moreno**, porque no solo es un excelente Investigador, sino una gran persona, que siempre me dio muchos consejos y que me demostró todo su cariño para mi persona, incluso escribo estas líneas y vienen a mi sonrisas grandes llenas de emoción, gracias Dr por siempre querer que me quedará a dormir en el Laboratorio, pero sobre todo por tantas carcajadas, anécdotas, charlas y risas compartidas.

A todo el **Laboratorio de Oncología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría en la Ciudad de México**, gracias infinitas por todas sus atenciones, asesoría y grandes experiencias juntos, en especial a **José Luis, JL** todo el trabajo realizado fue gracias a usted, gracias totales por toda su paciencia y entrega a mi proyecto, usted desde el primer día que nos conocimos tomo la batuta de mi trabajo con tanta responsabilidad y entrega, fue gracias a usted que fue posible realizarlo, yo no tendría palabras para agradecerle todo su apoyo y ayuda siempre. También a la **Dra. Rosy, Rosy** gracias por tu amistad tan valiosa brindada, por enseñarme a trabajar, y hacer las cosas de la forma correcta. Gracias por tu hospitalidad

brindada, demostrándome que tenía una familia más en casa. Y al **Dr. Alberto** por siempre ayudarme a entender el porqué de las cosas, y a buscar siempre una solución a las técnicas aplicadas en mis experimentos. A los demás compañeros, gracias por cada día compartir conmigo sus anécdotas y experiencias que siempre tenían para contar, pero sobre todo por sus lindas sonrisas y carcajadas que me solían dar.

A mis compañeros de generación de Maestría, gracias por compartir conmigo sus días y conocimientos en sus áreas, iniciamos esa gran aventura y ninguno se rindió, todos demostraron que tienen hambre de salir adelante y eso es admirable. Gracias **Evelyn, Lety, Teresita, Alex, César, Fonseca, Bon, Eduardo, Gaby, Mariana, Raquel, Nayeli, Ruy, Germán.**

Especialmente a **Evelyn**, gracias infinitas mi pequeña Ev porque nunca me dejaste sola, me apoyaste cuando siempre necesitaba, esas idas a la escuela diarias no eran las mismas sin ti, sabes que te quiero mucho y que siempre contaremos la una a la otra. A **Lety** por haberme demostrado que puedo contar también contigo, siempre anduvimos juntas para todos lados, las “mueganitas”. Fueron muchos días de risas que nunca olvidaré. A **Teresita**, porque nunca me dejaste abajo y me ayudaste siempre que lo necesite, gracias por tantas carcajadas y por tantas charlas y aventuras vividas juntas. A mi **Carito** bella, la niña que siempre me motivo de principio a fin, gracias por tantas aventuras tan geniales, por tantas risas, carcajadas y hasta llantos, gracias por no dejarme rendir nunca y siempre darme palabras de ánimo, sabemos que siempre estaremos en conexión. Las quiero mucho **amigas**, que Dios me las bendiga siempre.

A todos mis amigos y compañeros de **Laboratorio 18** que siempre estuvieron ahí de una forma u otra, apoyándonos, ayudándonos o simplemente riendo con nosotros, tantas salidas y momentos de risas y bailes, les agradezco siempre toda su motivación tan valiosa. Gracias **Mariela, Anita, Oscarito, Diana, Neto, Carlitos, Radamés, Bris, Nallely, Dulce, Gaby, Eslim, Jocelyn, Eduardo, Astrid.** También a mis vecinos del **Laboratorio 20** porque siempre estuvieron dispuestos a ayudarme y a brindarme una sonrisa para mis ocurrencias. A todos los del

Laboratorio del Dr. Julio y especialmente a él, por haberme permitido pasar horas en sus instalaciones sacando mis experimentos, pero además por haberme ayudado siempre en cualquier duda.

A todas mis **amigas y amigos** que, de una manera u otra, aunque no estuvieron haciendo conmigo la Tesis, siempre sus ánimos y vibras positivas estuvieron ahí para ayudarme a concluir, gracias por la paciencia de siempre darles lata con la Tesis, pero sobre todo gracias por su valiosa amistad que sé que esa tiene mucho más valor que cualquier otra cosa.

A mi **Madre** hermosa, por todas esas desveladas conmigo a la hora de hacer la Tesis, por siempre darme sus consejos y decirme que yo puedo con todo lo que me proponga, gracias infinitas Madre por creer y confiar en mí y por demostrarme día con día todo el amor que me tienes. Te amo por siempre mami.

A mis **Abuelitos** adorados, saben que sí yo hice está Tesis, en realidad fue por ustedes, por mi mayor motivación en la vida, al escribir estas líneas es imposible no llorar, ustedes siempre han sido mi motor para salir adelante y dejar aquel pequeño rancho donde me criaron, no basta nada de lo que yo les pueda decir para demostrarles todo el amor que les tengo, y lo agradecida que estoy con ustedes, aunque ya no estén conmigo, sé que desde el cielo me acompañan en mi caminar y me cuidan y guían, y que desde allá han sido los que me han ayudado a concluir este ciclo. Mis amores eternos, mis únicos amores verdaderos, mis héroes de mi vida real, mis motores, los amo por siempre, siempre en mi mente y en mi corazón. Por ustedes con todo mi amor, sí se pudo.

A mi querido amor, **Miguel Ángel** bello, sabes lo mucho que te quiero, lo mucho que te amo y lo cual eres tan importante para mí, le doy gracias infinitas a Dios por habernos permitido coincidir en esta vida, has llegado a mi vida para quedarte, ahora entiendo que los tiempos de Dios son perfectos, nada antes, nada después, todo en el momento justo y necesario, gracias por haber estado ahí esperándome hasta que yo pudiera estar en las mejores condiciones en las cuales te podría dar todo mi amor incondicional y lo más importante gracias totales por haberte vuelto mi principal motivación diaria, mi principal motivación que necesitaba para terminar

mi trabajo de investigación. Vienen cosas extraordinarias para ambos y lo mejor de todo, que siempre estaremos el uno para el otro. Te amo mi Miguelito <3.

Y finalmente, a **Dios**, el más importante de todos, el que guía cada paso que doy y en quien confío ciegamente. Gracias infinitas y eternas Padre Santo por nunca dejarme sola, y darme la fortaleza para salir adelante en todas las batallas que me regalas en esté caminar que se llama, Vida. Con tu manto que me abraza, nada fue imposible en este camino. Amén y Amén.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ÍNDICE DE CUADROS	5
ÍNDICE DE FIGURAS	6
I RESUMEN	8
ABSTRACT	9
II INTRODUCCIÓN	10
III REVISIÓN DE LITERATURA	12
A CÁNCER	12
1 Generalidades del Cáncer	12
2 Desarrollo del Cáncer	14
a Proliferación	14
b Diferenciación	15
c Apoptosis	15
4 Mecanismos de acción implicados	16
a Estrés oxidativo	18
b Daños provocados por radicales libres	18
B ANTIOXIDANTES	19
1 Clasificación del sistema antioxidante en el organismo humano	19
2 Mecanismos de acción de un antioxidante	22
C MAÍZ (<i>Zea mays</i> L.)	24
1 Generalidades	24
2 Consumo del maíz en México	25
3 Maíz Azul	26
4 Composición química del grano de maíz y su valor nutricional	28
5 Compuestos bioactivos en maíz azul	29
a Ácidos fenólicos	32
b Antocianinas	36
1 Estructura química y tipos de antocianinas	37

2	Biosíntesis de las antocianinas	37
3	Actividades biológicas de las antocianinas	39
5	Biodisponibilidad de polifenoles	45
6	Procesamiento del grano del maíz	47
a	Proceso de nixtamalización	48
b	Efecto de la nixtamalización sobre compuestos bioactivos	49
IV	JUSTIFICACIÓN	51
V	HIPÓTESIS	52
VI	OBJETIVOS	53
A	OBJETIVO GENERAL	53
B	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
VII	MATERIALES Y MÉTODOS	54
A	MATERIALES	54
B	MÉTODOS	54
1	Obtención de las harinas de maíz criollo azul	54
1)	Molienda	54
2)	Nixtamalización del grano de maíz criollo azul	54
3)	Secado y almacenamiento	55
4)	Elaboración de las tortillas de maíz criollo azul	55
	nixtamalizado	
2	Obtención de las fracciones ricas en polifenoles (FRP) y antocianinas (FRA)	55
a	Obtención del extracto crudo (EC)	55
b	Separación de la fracción no polar	57
c	Obtención de la fracción rica en polifenoles (FRP)	57
d	Obtención de la fracción rica en antocianinas (FRA)	58
3	Perfiles y niveles de compuestos bioactivos y actividad antioxidante	58
a	Contenido de antocianinas totales	58
b	Contenido de fenólicos totales	59
c	Capacidad antioxidante de las FRP y FRA	59

1) ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity, ORAC)	59
2) ABTS	61
d Análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en la FRA	61
4 Efecto antiproliferativo, anticancerígeno y antiapoptótico de las FRP y FRA	62
a Cultivo celular	62
b Conteo celular	62
c Tratamiento con las FRP y FRA	63
d Bioensayo de viabilidad y proliferación celular (XTT)	63
e Bioensayo de muerte celular: Apoptosis	64
5 Análisis Estadístico	66
VIII RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67
A Rendimiento del maíz y la tortilla para la purificación de los extractos	67
B Fenólicos totales en fracciones de maíz criollo azul y tortilla nixtamalizada	69
C Antocianinas totales en fracciones de maíz criollo azul y tortilla nixtamalizada	71
D Identificación y cuantificación de antocianinas por HPLC en maíz criollo azul y tortilla nixtamalizada	76
E Capacidad antioxidante evaluada por el método ORAC y ABTS en maíz criollo azul y tortilla nixtamalizada	78
F Efecto Antiproliferativo y anticancerígeno de polifenoles y antocianinas de maíz criollo azul y tortilla nixtamalizada	81
a Cultivo Celular	81
b Exposición al tratamiento con fracciones de polifenoles y antocianinas de maíz criollo azul y tortilla nixtamalizada	81
c Viabilidad Celular	81
1 Meduloblastoma (Daoy)	81
2 Cáncer Cervicouterino (HeLa)	89
3 Cáncer de Colon (SW-480)	91

d	Proliferación Celular	93
1	Meduloblastoma (Daoy)	93
2	Cáncer Cervicouterino (HeLa)	95
3	Cáncer de Colon (SW-480)	102
e	Muerte Celular: Apoptosis	108
IX	CONCLUSIONES	114
X	PERSPECTIVAS	116
XI	BIBLIOGRAFÍA	117
XII	ANEXOS	137
XIII	Abreviaturas	139

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Pág.
1	Composición química del grano de maíz	30
2	Compuestos bioactivos en el grano de maíz	33
3	Antocianinas y propiedad nutraceutica	41
4	Antocianinas en maíces pigmentados	42
5	Rendimiento en gramos de polifenoles y antocianinas obtenidos a partir de 1.5 Kg de maíz criollo azul	68
6	Cuantificación de antocianinas por HPLC en grano de maíz y tortilla nixtamalizada	76
7	Concentración inhibitoria al 50 % de extractos de antocianinas de grano de maíz y tortilla nixtamalizada en células cancerígenas	83
8	Concentración inhibitoria al 50 % de extractos de polifenoles de grano de maíz y tortilla nixtamalizada en células cancerígenas	84
9	Características principales de Daoy, HeLa y SW-480	138

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Pág.
1	Daño a las principales biomoléculas provocado por los radicales libres	20
2	Clasificación de los antioxidantes biológicos	21
3	Sistema antioxidante y sus niveles de defensa	23
4	Estructura del grano de maíz criollo azul	27
5	Diversificación de los fenilpropanoides basado en la vía metabólica fenilpropanoide	31
6	Estructura química de los ácidos fenólicos	34
7	Estructura y sustituyentes de las principales antocianinas	38
8	Ruta General de biosíntesis de las antocianinas	40
9	Proceso de nixtamalización para la obtención de harina instantáneas	56
10	Contenido de fenólicos totales en maíz azul y tortilla nixtamalizada	70
11	Contenido de antocianinas totales en maíz azul y tortilla nixtamalizada	72
12	Cromatogramas de la fracción de polifenoles y antocianinas de maíz azul y tortilla nixtamalizada	74
13	Capacidad antioxidante de los extractos de polifenoles y antocianinas de maíz azul y tortilla nixtamalizada	79
14	Capacidad antioxidante de los extractos de polifenoles y antocianinas de maíz azul y tortilla nixtamalizada	80
15	Porcentaje de viabilidad celular y Concentración Inhibitoria al 50 % de extractos de antocianinas en líneas celulares	85

16	Porcentaje de viabilidad celular y Concentración Inhibitoria al 50 % de extractos de polifenoles en líneas celulares	86
17	Porcentaje de viabilidad celular en líneas Daoy	88
18	Porcentaje de viabilidad celular en líneas HeLa	90
19	Porcentaje de viabilidad celular en líneas SW-480	92
20	Proliferación celular en líneas Daoy <i>versus</i> tiempo	94
21	Proliferación celular en líneas Daoy <i>versus</i> tratamiento	96
22	Proliferación celular en líneas Daoy <i>versus</i> tiempo y tratamiento	97
23	Proliferación celular en líneas HeLa <i>versus</i> tiempo	99
24	Proliferación celular en líneas HeLa <i>versus</i> tratamiento	100
25	Proliferación celular en líneas HeLa <i>versus</i> tiempo y tratamiento	101
26	Proliferación celular en líneas SW-480 <i>versus</i> tiempo	103
27	Proliferación celular en líneas SW-480 <i>versus</i> tratamiento	104
28	Proliferación celular en líneas SW-480 <i>versus</i> tiempo y tratamiento	105
29	Prueba TUNEL para células Daoy (D), HeLa (H) y SW-480 (SW) <i>versus</i> tratamiento	109

I RESUMEN

En algunas regiones serranas del estado de Sinaloa se ha identificado la presencia de maíces criollos con características químicas únicas. Dentro de la composición química de estos materiales criollos se ha reportado la presencia de compuestos bioactivos, como ácidos fenólicos, antocianinas y carotenoides, asociados con capacidad antioxidante (química y celular) y actividad antiproliferativa en células Caco2. Durante la transformación de maíz por nixtamalización, los compuestos bioactivos disminuyen, sin embargo, los remanentes de estos compuestos en tortillas son los responsables de proporcionar propiedades nutricionales y nutracéuticas al consumidor. El objetivo de la presente investigación fue evaluar fracciones ricas en polifenoles y antocianinas de maíz criollo azul, y tortillas obtenidas por nixtamalización tradicional sobre propiedades antioxidantes y anticancerígenas (utilizando líneas celulares Daoy, HeLa y SW-480). El contenido de fenólicos totales para las fracciones ricas en polifenoles y antocianinas en tortilla mostró incrementos del 90 y 17%. Sin embargo, el contenido de antocianinas totales solo mostró un incremento del 60% en la fracción rica en antocianinas de tortilla. Se identificó por HPLC que cianidina-3-glucósido, es el flavonoide mayoritario en grano crudo y tortilla nixtamalizada. La capacidad antioxidante por los métodos de ABTS y ORAC mostraron una mayor actividad en la fracción rica en polifenoles de tortilla. La viabilidad celular disminuyó hasta un 50 % en grano crudo y tortilla para las dos fracciones utilizadas, mientras que la proliferación celular disminuyó principalmente en tortilla nixtamalizada. Se induce apoptosis en al menos la mitad de la población celular. Con base a los resultados, se observó que la fracción rica en antocianinas de tortilla nixtamalizada contiene compuestos bioactivos que demuestran su efecto anticancerígeno en las diferentes líneas celulares tratadas.

Palabras clave: Maíz criollo azul, antocianinas, Hela, Daoy, SW-480.

ABSTRACT

In some mountain regions of the state of Sinaloa, the presence of criollo maize with unique chemical characteristics has been identified. The presence of bioactive compounds, such as phenolic acids, anthocyanins and carotenoids, associated with antioxidant capacity (chemical and cellular) and antiproliferative activity in Caco2 cells has been reported within the chemical composition of these criollo materials. During the transformation of corn by nixtamalization, the bioactive compounds decrease, however, the remnants of these compounds in tortillas are responsible for providing nutritional and nutraceutical properties to the consumer. The objective of the present investigation was to evaluate fractions rich in polyphenols and anthocyanins of blue Creole corn, and tortillas obtained by traditional nixtamalization on antioxidant and anticancer properties (using Daoy, HeLa and SW-480 cell lines). The content of total phenolics for fractions rich in polyphenols and anthocyanins in tortilla showed increases of 90 and 17%. However, the content of total anthocyanins only showed an increase of 60% in the fraction rich in tortilla anthocyanins. It was identified by HPLC that cyanidin-3-glucoside is the major flavonoid in raw grain and nixtamalized tortilla. The antioxidant capacity by the ABTS and ORAC methods showed greater activity in the polyphenol-rich fraction of tortilla. The cell viability decreased up to 50% in raw grain and tortilla for the two fractions used, while cell proliferation decreased mainly in nixtamalized tortilla. Apoptosis is induced in at least half of the cell population. Based on the results, it was observed that the fraction rich in anthocyanins from nixtamalized tortilla contains bioactive compounds that demonstrate its anticarcinogenic effect in the different treated cell lines.

Key words: Blue Creole corn, anthocyanins, HeLa, Daoy, SW-480.

II. INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas, México ha generado y recibido los beneficios de una mejoría notable en las condiciones de salud. El perfil demográfico es causa y consecuencia del perfil epidemiológico del país. La estructura por edad muestra una población que envejece paulatinamente, con el desplazamiento ascendente de la edad mediana, una menor participación de la población infantil, y un crecimiento de los grupos de edad media, edad productiva, así como el incremento acelerado de la población mayor de 65 años, en consecuencia, las causas principales de muerte también se han modificado (INEGI, 2016).

En el año 2008 se observó que en el país las principales causas de muerte entre hombres y mujeres eran similares, destacando enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus y tumores malignos. Las enfermedades del corazón son las primeras causas de muerte en la población del país, el 14.4 % de las defunciones masculinas, y el 16.7 % de las femeninas, se deben a padecimientos de este tipo. La diabetes mellitus representa la segunda causa de muerte en hombres con 10.5 %, mientras que para mujeres es 15.1 %. La tercera causa de muerte entre la población corresponde a tumores malignos, en hombres 10.5 % y en mujeres 15.1 %. En conjunto, las tres principales causas de muerte agrupan 56.1 % de las defunciones masculinas y 43.7 % de las femeninas (INEGI, 2014).

Recientemente se ha sugerido el papel del estrés oxidativo en las enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo I y II y cáncer; actualmente es objeto de investigaciones extensivas. El estrés oxidativo se define como un desbalance entre la producción de radicales libres y metabolitos reactivos, también llamados especies reactivas de oxígeno y la eliminación de estos últimos (por mecanismos protectores), son llamados antioxidantes (Reuter y col., 2010).

Diversas investigaciones han probado que las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), como productos del metabolismo celular

normal, juegan un papel muy importante en la estimulación de las vías de señalización que están involucradas en diversas enfermedades (Fang y col., 2009; Reuter y col., 2010). Se han identificado numerosos agentes químicos que interfieren con estas vías de señalización redox, estos agentes incluyen compuestos nutraceuticos derivados de cereales, leguminosas, especias, frutas y vegetales (Virgili y Marino, 2008; Coté y col., 2010; Schreckinger y col., 2010). El conocer e identificar mecanismos de inducción de muerte celular, tras tener una célula neoplásica en los organismos vivientes, es de relevante importancia hoy en día, pero aún más, el que estos mecanismos sean inducidos por componentes nutraceuticos encontrados en los alimentos tradicionales de nuestro país, como lo es el maíz azul regional. Es por ello, que en este trabajo se evaluaron las fracciones de polifenoles y antocianinas de maíz criollo azul y tortilla nixtamalizada sobre propiedades anticancerígenas y apoptóticas utilizando líneas celulares Daoy, HeLa y SW-480.

III REVISIÓN DE LA LITERATURA

A CÁNCER

1 Generalidades del Cáncer

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo; en el año 2012 se registraron 14 millones de nuevos casos y 8.2 millones de muertes relacionadas con el cáncer (OMS, 2015). Se prevé que el número de nuevos casos aumente en aproximadamente un 70% en los próximos 20 años. En 2012, los tipos de cáncer diagnosticados con más frecuencia en el hombre fueron de pulmón, próstata, colon y recto, estómago e hígado (OMS, 2015). En mujer fueron de mama, colon y recto, pulmón, cuello uterino y estómago. Aproximadamente un 30% de las muertes por cáncer son debidas a cinco factores de riesgo conductuales y dietéticos: índice de masa corporal elevado, ingesta reducida de frutas y verduras, falta de actividad física, consumo de tabaco y consumo de alcohol (OMS, 2015).

El consumo de tabaco es el factor de riesgo más importante, y es la causa del 20% de las muertes mundiales por cáncer en general, y alrededor del 70% de las muertes mundiales por cáncer de pulmón. Los cánceres causados por infecciones víricas, tales como las infecciones por virus de hepatitis B (VHB) y C (VHC), o por virus del papiloma humano (PVH), son responsables de hasta un 20% de las muertes por cáncer en los países de ingresos bajos y medios. Más del 60% de los nuevos casos anuales totales del mundo se producen en África, Asia, América Central y Sudamérica. Estas regiones representan el 70% de las muertes por cáncer en el mundo. Se prevé que los casos anuales de cáncer aumentarán de 14 millones en 2012 a 22 millones en las próximas dos décadas (Informe mundial sobre el cáncer 2014, IARC; OMS, 2015).

En 2012, de cada 100 hombres de 20 años y más que egresan de un hospital por cáncer, 25 padecen tumores malignos en órganos del sistema

digestivo. En 2012, el cáncer de mama es la principal causa de egreso hospitalario entre las mujeres de 20 años y más (30.8 por ciento) (INEGI, 2015). En 2013, del total de las defunciones por tumores malignos en la población de 20 años y más, 48.9% corresponden a hombres y 51.1% a mujeres. Del total de tumores malignos en la población de 20 años y más, los de órganos digestivos son la primera causa de mortalidad entre esta población, con 32 casos por cada 100 mil habitantes (INEGI, 2015).

El cáncer es un conjunto de enfermedades caracterizadas por la proliferación incontrolada de células que se encuentran dañadas genéticamente. Estas células presentan dos características fundamentales que las hacen potencialmente peligrosas al organismo. En primer lugar, se producen sin responder a los mecanismos de regulación y control, y por otra parte, invaden regiones que corresponden a otras células. El desarrollo de un cáncer implica la presencia de varias alteraciones genéticas en la célula, solo una alteración no es suficiente para originarlo. Estas mutaciones se van acumulando en las células somáticas a lo largo de la vida, por lo que la probabilidad de desarrollar un cáncer, en la mayoría de los casos aumenta considerablemente con la edad. La mayoría de las células cancerosas son genéticamente inestables y presentan defectos en los procesos de muerte y diferenciación. Los genes supresores de tumor codifican proteínas que restringen la proliferación de la transformación (Lozano y col., 2005, Redondo, 2014; U-Syn Ha y col., 2015).

El cáncer como enfermedad es bien conocido a lo largo de la historia de la humanidad. Esta entidad, mediante un proceso de carcinogénesis involucra diferentes mutaciones genéticas y cambios epigenéticos en proto-oncogenes, genes supresores tumorales, genes de reparación celular y microRNAs, con el fin de conferirle un fenotipo maligno a un clon celular; es decir adquiere la capacidad de ser autodependiente, invadir, evadir la respuesta inmune y dar metástasis a otras partes del cuerpo. Estos cambios genéticos son causados por la exposición ambiental, física y biológica, que aumenta la susceptibilidad a

padecer cáncer y modificar el perfil epidemiológico de cada país, explicando la gran variabilidad en la incidencia de morbilidad y mortalidad mundial por cáncer (Barroso-Mercado, 2014).

La transformación maligna de una célula, es un proceso complejo que resulta de varios eventos moleculares, lo más importante son la activación de proto-oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores, el cual ha sido uno de los campos más estudiados dentro de la investigación de cáncer (Báez-Alvarado y col., 2008).

Actualmente se conocen varios factores de riesgo del cáncer, sin embargo, en la mayoría de las personas que sufren esta enfermedad no es posible identificar factores de riesgo específicos (Fernández y col., 2015). El ambiente, los genes y el estilo de vida se conjugan para incrementar o disminuir la probabilidad de desarrollar cáncer. Distintos eventos tempranos o tardíos en la vida de los pacientes pueden influenciar sobre el riesgo de padecer cáncer, sin embargo, es complicado explicar por qué algunas personas desarrollan la enfermedad y otras no (Fernández y col., 2015).

2 Desarrollo del Cáncer

a Proliferación

La proliferación celular se define como el incremento del número de células por división celular. Además, tiene como característica ser muy específica, y tiene una forma de control con base a cada tipo de célula, y a su localización. Existen diversos mecanismos de regulación que controlan la proliferación celular, pero el más importante es el conjunto de proteínas que participan en la división celular. Para esto, cada tipo de célula va a contar con receptores específicos para factores de crecimiento característicos y que estarán estimulados en respuesta a otros factores (FIBAO, 2008; Redondo, 2014).

El control de la proliferación celular es esencial para el correcto funcionamiento del organismo. La pérdida de esta regulación incide en el desarrollo de ciertas enfermedades como el cáncer, donde una sola célula va a formar una línea celular con capacidad de proliferar de manera ilimitada e incontrolada debido a mutaciones genéticas. Por el contrario, la pérdida de la capacidad de proliferación celular incide como uno de los factores causantes del envejecimiento (FIBAO, 2008; Redondo, 2014).

b Diferenciación

Para que exista el desarrollo de enfermedades como el cáncer, se requiere un desbalance entre tres mecanismos: proliferación, diferenciación y apoptosis. Si alguno de estos tres mecanismos falla puede incidir en que se lleven a cabo o no, los otros dos. El proceso de diferenciación por sí solo, hace que cada tipo celular exprese un perfil de genes característicos, haciéndolos diferentes entre sí. Este perfil de expresión marca la capacidad proliferativa de cada tipo celular y su forma de responder a cada tipo de estímulo (Wang y col., 2008; Redondo, 2014).

Células como las epiteliales o hematopoyéticas, poseen una alta capacidad proliferativa, ya que están en constante renovación. Mientras que las neuronas, poseen una capacidad proliferativa muy baja (FIBAO, 2008; Redondo, 2014).

c Apoptosis

La apoptosis es un proceso fisiológico de muerte celular por el cual las células mueren de forma controlada en respuesta a diversos estímulos. Se trata de un proceso fisiológico esencial en el desarrollo de un organismo, en el control de la homeostasis de la célula, y en la respuesta a diferentes agentes externos, como son radiaciones ionizantes o agentes quimioterápicos. El exceso, o por defecto de este proceso, puede ser causa del desarrollo de diversas patologías,

entre ellas el cáncer (Wang y col., 2008, Redondo, 2014).

La homeostasis de los tejidos está regida por el equilibrio entre tres mecanismos: proliferación, diferenciación y muerte celular. Todas las células disponen de los mecanismos y maquinaria necesaria para desarrollar estos procesos, y su regulación es consecuencia de la integración de señales intra y extracelulares que condicionan a la célula a seguir un camino u otro. En algunos casos este equilibrio se altera produciendo un acúmulo de células que puede originar un cáncer. Este exceso celular podría ser la consecuencia de una proliferación descontrolada de células, una disminución del proceso normal de apoptosis, o bien a ambos casos (Green y Evan, 2002; Hanaham y Weinberg, 2000; Wang y col., 2008; Redondo, 2014).

Para que exista un desarrollo de la tumorigénesis, se requiere el acúmulo de diversos factores que alteren dentro de una misma célula para adquirir un mayor índice proliferativo, y volverse maligna con independencia de factores de crecimiento y supervivencia, resistencia a señales de inhibición del crecimiento, bloqueo de los sistemas que limitan la replicación, inhibición de la apoptosis, activación de angiogénesis e invasión de tejidos, así como la aparición de la metástasis (Green y Evan, 2002; Hanaham y Weinberg, 2000; Wang y col., 2008; Redondo, 2014).

Los defectos en el proceso de apoptosis, permiten que las células sobrevivan más allá de su vida fisiológica, permitiéndoles prescindir de factores extracelulares para la supervivencia y protegerse frente a la hipoxia y el estrés celular que provoca el tumor. Esta inhibición de la apoptosis también ofrece a la célula más tiempo para acumular alteraciones genéticas que pueden contribuir a la desregulación del ciclo celular, la alteración del patrón de diferenciación del tejido, la estimulación de la angiogénesis o el aumento en la movilidad e invasividad celular (Reed, 2003, Wang y col., 2008; Redondo, 2014).

3 Mecanismos de acción implicados

El oxígeno (O_2) contenido en el aire que normalmente respiramos es fundamental para la vida, sin embargo, muchas reacciones en las que participa el O_2 genera radicales libres (RL), los cuales son considerados dañinos para la célula. A este proceso se le ha denominado la paradoja del oxígeno. La reducción tetravalente en la mitocondria para producir agua mediante la cadena de transporte de electrones es relativamente segura; no obstante, la reducción univalente de oxígeno genera intermediarios reactivos, tales como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical aniónico superóxido (O_2^-), y el radical hidroxilo ($OH\cdot$), este último extremadamente reactivo (Wang y col., 2008; Redondo, 2014; Lippert y col., 2017; Fernández y col., 2018).

El desequilibrio bioquímico propiciado por la producción excesiva de especies oxidantes que provocan daño oxidativo a las biomoléculas, y que no puede ser contrarrestado por los sistemas antioxidantes, se denomina estrés oxidativo, el cual se ha relacionado con el envejecimiento y más de 100 padecimientos crónico degenerativos, ya que las especies reactivas y los radicales libres favorecen la presencia o las complicaciones de enfermedades como aterosclerosis, diabetes mellitus, procesos inflamatorios, el proceso isquemia/reperfusión, enfermedad de Alzheimer, y diversos tipos de cáncer; constituyendo así uno de los mecanismos fisiopatológicos más importantes para explicar dichos procesos morbosos (Wang y col., 2008, U-Syn Ha y col., 2015; Redondo, 2014; Lippert y col., 2017 y Fernández y col., 2018).

Se estima que las células humanas sufren diariamente 10,000 reacciones o golpes (hits) de RL, los cuales se pueden incrementar en función al número de factores pro-oxidantes, propiciando un aumento en el riesgo de aparición de enfermedades agudas y crónicas. En este sentido, los factores pro-oxidantes más estudiados relacionados con la aparición y complicación de enfermedades agudas y crónicas, son tabaquismo, alcoholismo, contaminación ambiental, radiación ultravioleta, horas de sueño, ejercicio físico extenuante, alimentación

inadecuada, género masculino, consumo de drogas, estrés psicológico y la edad (envejecimiento). Todos estos factores hacen que el organismo humano genere el proceso de estrés oxidativo (Redondo, 2014; Lippert y col., 2017).

a Extrés oxidativo

El estrés oxidativo en los sistemas biológicos es definido como un desbalance entre la producción de RLs y su neutralización y/o eliminación por los mecanismos de defensa antioxidantes (enzimáticos y no-enzimáticos). Sí este desbalance tiende a la sobreproducción de RLs, y excede la capacidad de defensa antioxidante de las células, estas últimas empiezan a sufrir las consecuencias del estrés oxidativo. El incremento en los niveles de radicales libres pueden causar daño a prácticamente todos los componentes celulares, incluyendo membranas, ADN, bicapas lipídicas y proteínas, los cuales son componentes de todos los tipos de células en el organismo (Durackova, 2010). El daño celular provocado durante el estrés oxidativo conduce a una variedad de enfermedades como el Alzheimer, Parkinson, aterosclerosis, cáncer, artritis, deficiencia inmunológica, enfermedades cardiovasculares, diabetes, inflamación, envejecimiento cutáneo y celular, etc. (Masisi y col., 2016).

b Daños provocados por los radicales libres

Los RLs tienen doble función, por un lado son importantes en el proceso de fagocitosis como agentes microbicidas, en varias reacciones bioquímicas (hidroxilación, carboxilación y peroxidación o reducción de ribonucleotidos), como biomoduladores y reguladores en la transducción de señales intercelulares, además de actuar como mensajeros secundarios para activar diferentes vías de señalización por la inducción de genes de respuesta al estrés; pero por otro lado, presentan un efecto oxidativo sobre importantes biomoléculas (Durackova, 2010; Dasgupta y Klein, 2014).

Los principales objetivos de los RLs durante el estrés oxidativo son biopolímeros, como proteínas, moléculas de ADN (ácido desoxirribonucleico) y ARN (ácido ribonucleico), carbohidratos y ácidos grasos poliinsaturados (Halliwell, 2006; Craft y col, 2012) (**Figura 1**).

Por otro lado, el organismo dispone de un sistema antioxidante para contrarrestar la generación de RL, con lo cual mantiene un equilibrio homeostático (Zorica-Juranić y col., 2005).

B ANTIOXIDANTES

En bioquímica y medicina, los antioxidantes son enzimas y otras sustancias orgánicas como la vitamina E y el β -caroteno de los alimentos que disminuyen los efectos oxidativos de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno sobre los tejidos, contrarrestando el efecto adverso sobre la función fisiológica normal en humanos. Esto se logra al retrasar, evitar o eliminar el daño oxidativo a una molécula diana, ya sea de forma directa, mediante la captación de especies reactivas, o indirecta al regular las defensas antioxidantes endógenas e inhibir la producción de especies reactivas (Halliwell, 2006; Carocho y Ferreira, 2013).

a Clasificación del sistema antioxidante en el organismo humano

El sistema antioxidante biológico está dividido en dos grupos principales, antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (**Figura 2**). Los antioxidantes enzimáticos se dividen en defensas enzimáticas primarias y secundarias. Con respecto a la defensa primaria, se compone de tres enzimas importantes que impiden la formación o neutralizan los RLs: glutatión peroxidasa, que dona dos electrones para reducir los peróxidos a través de la formación de selenoles, y también elimina los peróxidos como posible sustrato para la reacción de Fenton (Carocho y Ferreira, 2013; Fernández y col., 2018).

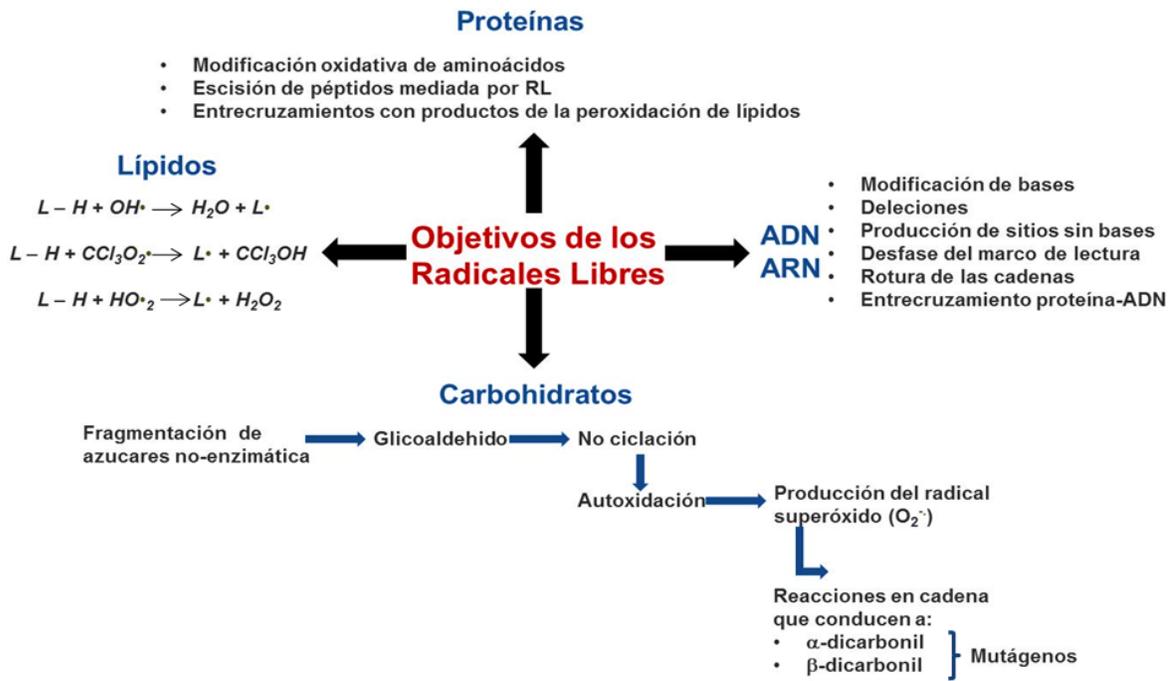


Figura 1. Daño a las principales biomoléculas provocado por los radicales libres.

Carocho y Ferreira (2013).

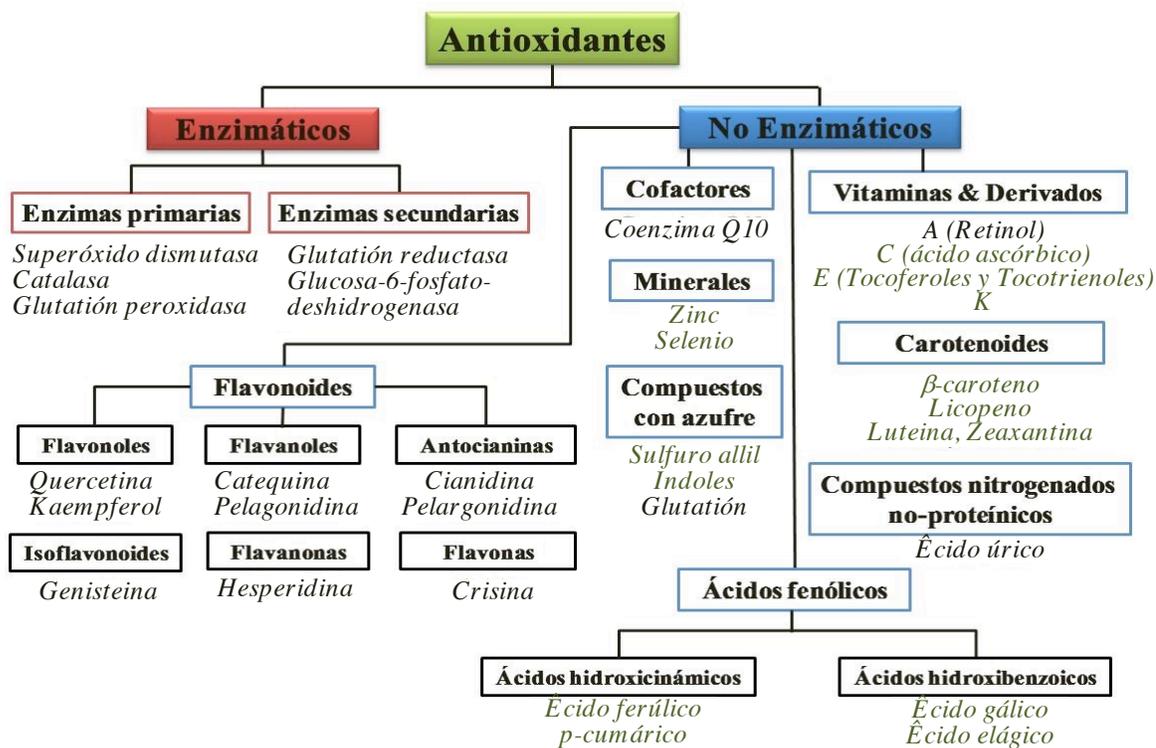


Figura 2. Clasificación de los antioxidantes biológicos. Las palabras verdes representan los antioxidantes exógenos, mientras que las negras representan los antioxidantes endógenos.

Carocho y Ferreira (2013).

La enzima catalasa convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular, y tiene una de las mayores tasas de rotación conocidas por el hombre, lo que permite que sólo una molécula de catalasa pueda convertir 6 mil millones de moléculas de peróxido de hidrógeno. Finalmente, la superóxido dismutasa que convierte aniones superóxido en peróxido de hidrógeno como un sustrato para la catalasa (Rahman, 2007, Cui y col., 2017).

La defensa enzimática secundaria incluye a la glutatión reductasa y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. La glutatión reductasa reduce el glutatión (antioxidante) de su forma oxidada a reducida, por lo que lo recicla para que siga neutralizando más RLs. La glucosa-6-fosfato regenera NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, coenzima utilizada en reacciones anabólicas), con lo cual se crea un entorno de reducción (Ratnam y col., 2006). Estas dos enzimas no neutralizan los RLs directamente, pero cumplen funciones de apoyo a otros antioxidantes endógenos (Ratnam y col., 2006; Cui y col., 2017).

Por su parte, los antioxidantes exógenos suministrados a través de la dieta se componen de flavonoides, carotenoides, ácidos fenólicos, compuestos con azufre, algunos minerales, y vitaminas como el ácido ascórbico y vitamina E (Halliwell, 2006; Carochó y Ferreira, 2013).

b Mecanismo de acción de un antioxidante

Un antioxidante es cualquier sustancia que retrase, prevenga o elimine el daño oxidativo de una molécula blanco. Por lo que los antioxidantes pueden actuar eliminando especies reactivas de oxígeno o nitrógeno, removiendo iones metálicos que pueden catalizar reacciones de oxidación y rompiendo cadenas en secuencias de iniciación oxidativa (Fantini y col., 2015). En este sentido, en un organismo la protección antioxidante puede operar a diferentes niveles (**Figura 3**).

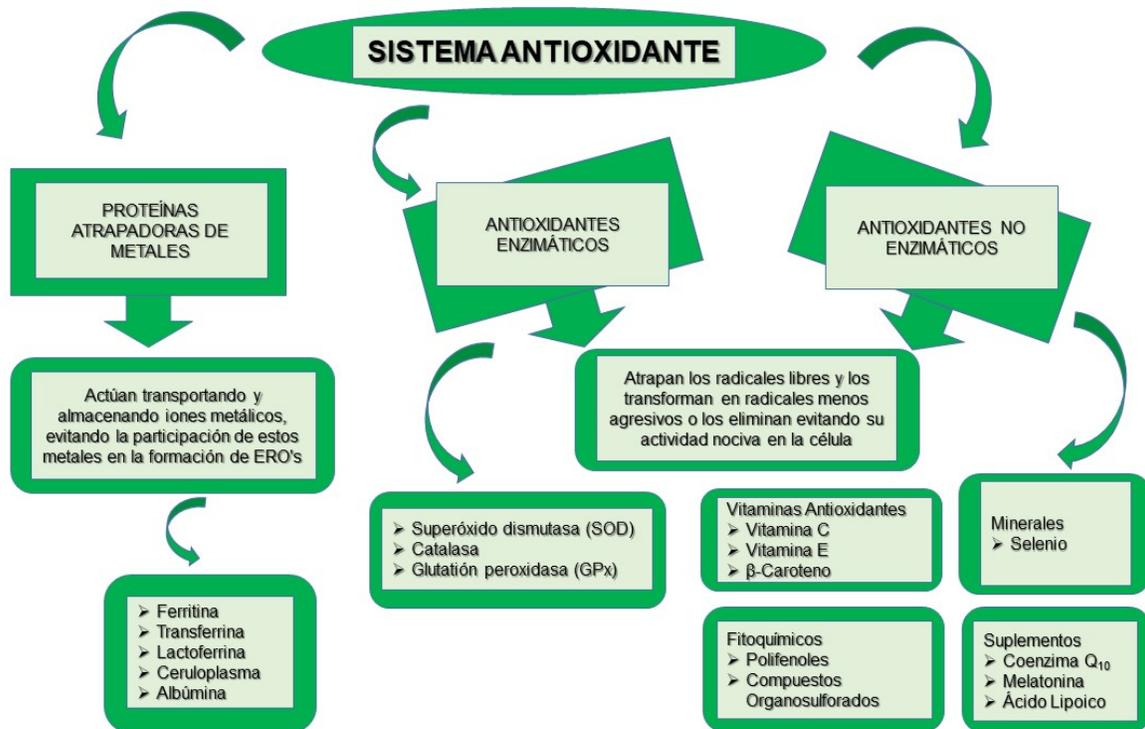


Figura 3. Sistema antioxidante y sus niveles de defensa.

Mendoza y Retana (2009).

En función de su modo de acción, los antioxidantes se pueden clasificar como antioxidantes primarios, secundarios o co-antioxidantes. Los antioxidantes primarios tienen la capacidad de donar rápidamente un átomo de hidrógeno a un radical de lípidos, formando un nuevo radical, que es más estable. Los antioxidantes secundarios reaccionan con los radicales iniciadores (o inhiben las enzimas iniciadoras), o reducen el nivel de oxígeno (sin generar especies de radicales reactivos). Por lo tanto, estos antioxidantes secundarios pueden retardar la velocidad de reacción de iniciación del radical por eliminación de iniciadores. Esta reacción se puede generar por la desactivación de las especies de alta energía (oxígeno singlete); al absorber luz ultravioleta, al captar oxígeno y quelantes de metales que catalizan la reacción de RLs, o al inhibir enzimas como peroxidasas, NADPH oxidasa, xantina oxidasa, entre otras enzimas oxidativas (Singh y Singh, 2008).

Actualmente los hábitos dietéticos promueven un mayor consumo de frutos frescos y secos, verduras, y cereales integrales, ya que están relacionados con una disminución en los procesos de estrés oxidativo por su alto contenido de compuestos bioactivos presentes. Entre estos compuestos destacan vitaminas (hidrosolubles y liposolubles), fenólicos y carotenoides antioxidantes y anticarcinogénicos (Halliwell y Chirico, 1993; Sarkar y Shetty, 2014; Milán-Carrillo y col., 2016; Gaxiola-Cuevas y col., 2017).

Estos compuestos bioactivos presentan interesantes propiedades biológicas y pueden ser empleados como agentes preventivos naturales contra enfermedades originadas por el estrés oxidativo, dada su capacidad antioxidante al neutralizar RLs (Rao y Rao, 2007; Pan y col, 2008; Masisi y col, 2016). Sin embargo, recientemente se han atribuido diversas propiedades benéficas de los cereales, destacando entre ellos el maíz y sus productos derivados.

C MAÍZ (*Zea mays* L.)

1 Generalidades

México es el lugar de origen de este cultivo; existen en el territorio nacional miles de variedades criollas y locales, así como parientes silvestres (Massieu Trigo y Montenegro, 2002). El maíz es el cereal que más se produce en el mundo (FIRA, 2016). Gracias a sus cualidades alimenticias para la producción de proteína animal, el consumo humano y el uso industrial se ha convertido en uno de los productos más importantes en los mercados internacionales. Su relevancia económica y social, supera a la de cualquier otro cultivo. Adicionalmente, el cultivo y transformación del maíz es fuente de empleo y alimento para un número importante de personas en el mundo (FIRA, 2016).

El nombre científico del maíz es *Zea mays*, pertenece a la familia GRAMINEAE, tribu Tripsaceae (*Maydeae*) y género *Zea* dentro del cual solamente la especie *mays*, se incluye en el nombre científico. Es una planta anual con un ciclo vegetativo que oscila entre 20-80 días desde la siembra hasta la cosecha. La altura de la planta es muy variable, existen variedades enanas de 40-60 cm, hasta cultivares gigantes de 200-300 cm. Cada planta tiene de una a tres mazorcas, dependiendo de la variedad y las condiciones ambientales (Saad, 1999).

El maíz posee una fuerte conexión que permite unir los contextos social y cultural, esto hace que sea el alimento básico de nuestro país, de forma tradicional se consume como tortilla (Massieu Trigo y Montenegro, 2002).

2 Consumo del maíz en México

El maíz es el grano de mayor producción a nivel mundial. La producción y utilización de este varía en cada país; la producción de Estados Unidos es para consumo externo y animal, en China se utiliza principalmente para la alimentación de ganado, y en México la producción de maíz es para consumo humano (FAO, 2016).

México es el principal productor de maíz blanco en el mundo. Asimismo, es el cultivo más importante del país, ya que representa aproximadamente el 35% de la superficie sembrada durante un año agrícola, tanto para cultivos cíclicos como perennes. Además, se consumen anualmente alrededor de 20 mtm (millones de toneladas métricas). El fortalecimiento de los precios internacionales incentivará la producción de granos en México. En el largo plazo, se espera que la producción de maíz blanco superé los 25 millones de toneladas (FAO, 2016).

En nuestro país las necesidades físicas de maíz blanco se cubren principalmente de las cosechas de los estados de Sinaloa y Jalisco (FAO, 2016).

En México la tortilla sigue siendo elaborada principalmente con masa de maíz nixtamalizado al representar un 65%, frente a un 35% por ciento que es elaborada con harina de maíz que está fragmentada de la siguiente manera: 25% por Maseca, 8% por Minsa, 1% por Harimasa, 0.50% por Cargill, 0.40% Macsa y 0.20% por Blancas (FAO, 2016). A su vez, la forma de consumo más tradicional en México es la tortilla, volviendo al maíz como un alimento básico para todos los mexicanos (SAGARPA, 2017).

3 Maíz azul

Se ha estimado que solamente el 3% de la producción de maíz domesticado es de genotipos azules, negros o morados (Serna-Saldívar y col., 2011). El pigmento azul se encuentra en la capa de células llamada aleurona, donde una mayor concentración de pigmentos de antocianina (principalmente cianidina y pelargonidina) hace que los granos parezcan negros (Collison y col., 2015; Mora-Rochín y col., 2016) (**Figura 4**).

La mayoría de los maíces azules son típicamente de grano harinoso y con endospermo de textura suave. Las razas de maíz azul muestran características muy variables de la planta, incluidos los periodos de floración, y la altura entre plantas. Otra característica peculiar es el mayor número de tallos por planta, que muchas veces no producen mazorcas.

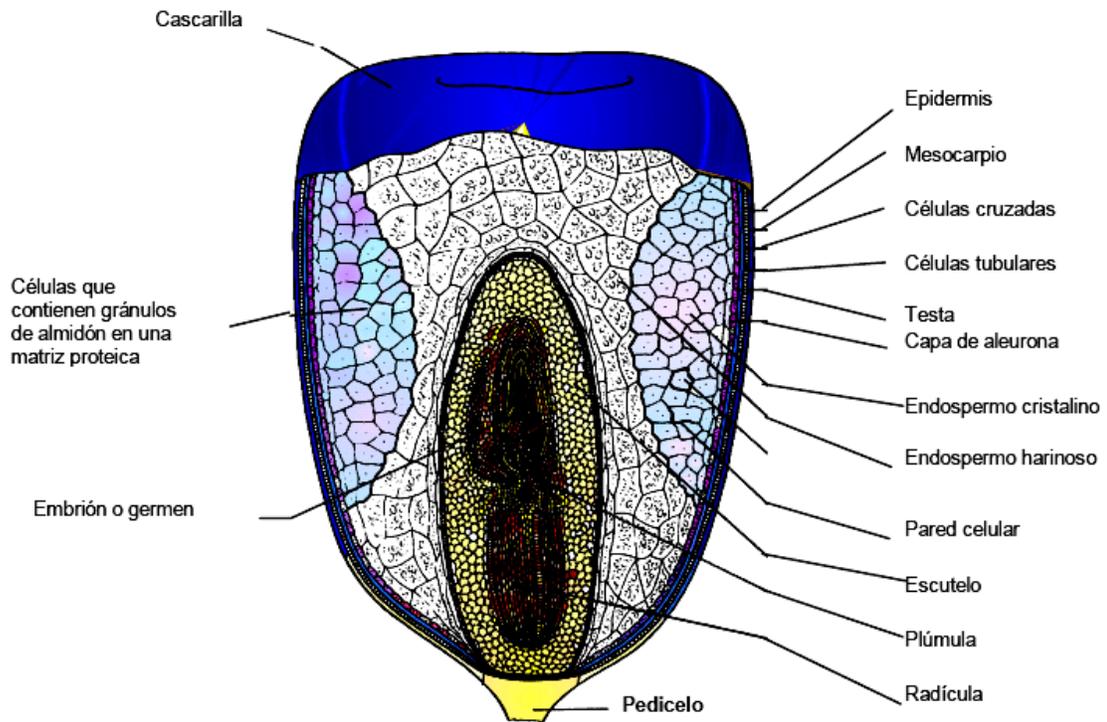


Figura 4. Estructura del grano de maíz criollo azul.

Fuentes (2012).

Sin embargo, el grado de ahijamiento en una población es factible de reducirse a través de algún método de selección (Salinas-Moreno y col., 2010).

Las características agronómicas que varían dentro de los maíces azules son días de floración masculina y femenina, número de hileras por mazorca, largo y ancho del grano. Existe una notoria variación genética en el intervalo entre floración masculina y femenina que va de 4.4 días a 8 días (Miguel y col., 2004; Salinas-Moreno y col., 2010).

El grano azul con endospermo harinoso, posee mayor valor alimenticio que el grano amarillo, el contenido de lisina en maíz azul es de 2.3 mg/g *versus* 1.4 mg/g de maíz híbrido amarillo; el contenido de proteína y minerales en maíz azul también es más alto que el de otras variedades. Además, el maíz azul contiene flavonoides, que actualmente se utilizan como fuente de antioxidantes (Gaxiola-Cuevas y col., 2017).

No obstante, las características más destacadas del maíz azul son su atractivo color y su diferente sabor (Miguel y col., 2004). Recientemente, el maíz azul ha sido utilizado para elaborar tortillas y botanas pigmentadas, debido a que estos productos se aprecian como promotores de salud.

La raza Elotero de Sinaloa es cultivada en el occidente de México, desde Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, y se extiende hasta Michoacán y Guerrero (Sánchez, 1989; Ron y col., 2006; Carrera y col., 2008; Gómez y col., 2010; CONABIO, 2011).

El maíz azul se localiza con mayor frecuencia en la parte sur de Sinaloa, en municipios como Concordia y El Rosario, y en la parte sur-centro, en los municipios de San Ignacio y Cosalá (CONABIO, 2008).

4 Composición química del grano del maíz y su valor nutricional

La composición química del maíz varía de acuerdo a diferentes condiciones climatológicas, variedad (genotipo) y condiciones de crecimiento; a

su vez, dentro de las distintas zonas del mismo grano, su composición varía de un lugar a otro.

La fracción del pericarpio se caracteriza por un elevado contenido de fibra cruda (aproximadamente 87 %), que a su vez está formada esencialmente por hemicelulosa (67%), celulosa (23%) y lignina (0.1 %) (Burge y Duensing, 1989). El endospermo contiene cerca del 86.4 % de almidón, 9.4 % de proteínas, y 0.8 % de lípidos. El germen contiene 34.5 % de lípidos, y 18.8 % de proteínas, además contiene 28 % de sólidos hidrosolubles (azúcares, proteínas hidrosolubles, minerales y vitaminas), y el porcentaje restante de sólidos insolubles en agua (Eckhoff y col., 2003) (**Cuadro 1**).

5 Compuestos bioactivos en maíz azul

El metabolismo de las plantas se puede separar en las vías primarias y secundarias presentes en todas las células. Las vías primarias se ocupan del metabolismo de los hidratos de carbono, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos a través de reacciones como la glucólisis, el ciclo del ácido tricarboxílico, las pentosas fosfato y la biosíntesis de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. En contraste, los metabolitos secundarios (por ejemplo, terpenos, alcaloides, fenilpropanoides, lignina, flavonoides, cumarinas, etc.) se producen por la vía del ácido shiquímico, malónico, ácido mevalónico, y la vía metil eritritol fosfato (Saltveit, 2009). En general, los compuestos fitoquímicos (**Figura 5**) son constituyentes bioactivos no nutricionales en alimentos de origen vegetal y se clasifican en compuestos fenólicos, terpenoides, alcaloides y compuestos con azufre (Goldberg, 2003).

Los compuestos bioactivos o fitoquímicos se caracterizan por ser suplementos dietéticos benéficos para la salud que se ingieren en forma concentrada en píldoras, pastillas, cápsulas o tónicos (Drago Serrano y col., 2006).

Cuadro 1. Composición química del grano de maíz

Fracción	Grano (%)	Almidón (%)	Proteína (%)	Lípidos (%)	Azúcares (%)	Cenizas (%)
Grano entero	100.00	71.5	10.3	4.8	2.0	1.4
Endospermo	82.3	86.4	9.4	0.8	0.6	0.3
Germen	11.5	8.2	18.8	34.5	10.8	10.1
Pericarpio	5.3	1.3	3.7	1.0	0.3	0.8
Pedicelo	0.8	5.3	9.1	3.8	1.6	1.6

Watson, (1987).

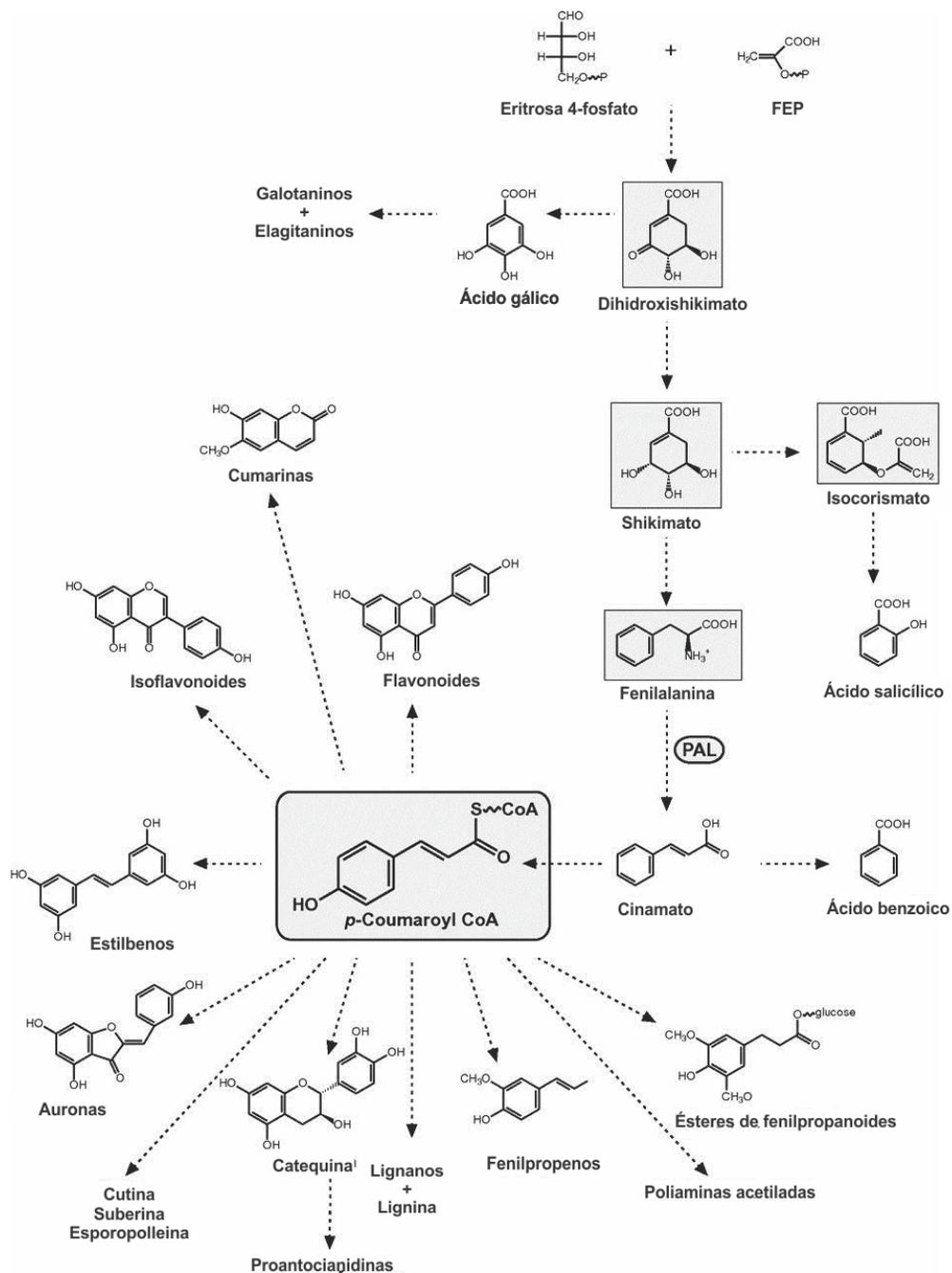


Figura 5. Diversificación de los fenilpropanoides basado en la vía metabólica fenilpropanoide. Los metabolitos de la vía siquimato y el metabolito central, CoA 4-coumaril están sombreadas en gris.

Vogt (2010).

El común denominador de la mayoría de los compuestos bioactivos, o compuestos nutraceuticos, son sus propiedades antioxidantes (**Cuadro 2**). Estos compuestos contrarrestan a los RLs, responsables de causar la oxidación de membranas y daño al ADN, desencadenando enfermedades como cáncer, problemas cardiovasculares, fibrosis y envejecimiento (Wang y col., 2014).

Además, el efecto benéfico a la salud, no se atribuye solamente a compuestos individuales, sino al efecto combinado de fibra dietaria, fenólicos, vitaminas, y otros componentes bioactivos presentes en la matriz alimenticia (Fardet, 2010).

a Ácidos Fenólicos

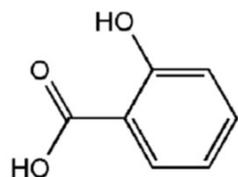
Los ácidos fenólicos son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal, se clasifican en ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos (Robbins 2003, Stalikas, 2007, Urías-Orona y col., 2015). Una de las principales propiedades biológicas de estos compuestos es su alta actividad antioxidante, propiedad atribuida a la estructura química, la cual tiene un núcleo fenólico y una cadena lateral insaturada que le permite formar un radical fenóxilo estabilizado por resonancia, el cual tiene actividad como agente secuestrador de radicales libres. Es por ello, que los ácidos fenólicos están relacionados con la protección del ADN y lípidos en la membrana celular contra especies reactivas de oxígeno, sugiriéndose su uso como agentes preventivos de enfermedades ligadas al estrés oxidativo (Srinivasan y col., 2007, Adalakun y col., 2012, Urías-Orona y col., 2015).

Los ácidos fenólicos son derivados del ácido benzoico y del ácido cinámico (Fantini y col., 2015). Los ácidos hidroxibenzoicos tienen una estructura C6-C1, se encuentran en pocas plantas comestibles y no poseen valor nutricional (**Figura 6**). Los miembros de esta subclase son el ácido protocatéquico y el ácido gálico, el ácido fenólico más común. En su forma de éster de galoil no azucarada se encuentra principalmente en uvas, vino, té verde y negro, y mangos (Fantini y col., 2015).

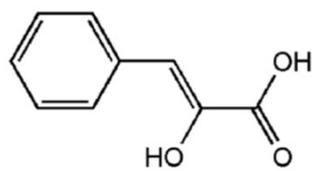
Cuadro 2. Compuestos bioactivos en el grano de maíz

Compuesto bioactivo	Efecto benéfico	Genotipo
Carotenoides (Luteína, zeaxantina, β -criptoxantina, β -carotenos)	Actividades preventivas del cáncer, protección contra la degeneración macular relacionada con la edad, efecto inhibitorio contra la promoción de hepatocarcinogénesis	Amarillo y rojo
Ácido ferúlico	Antiinflamatorio, anti carcinogénesis de colon y efecto anti-diabético mediante la estimulación de secreción de insulina	Amarillo, naranja y blanco
Antocianinas	Inhibición de carcinogénesis colorectal, antimutagénico y antioxidante, previene obesidad y disminuye la hiperglicemia, antimicrobiano, protector gástrico	Rojo, azul, morado, negro
Fitoesteroles	Disminuye colesterol LDL en suero, inhibe la absorción de colesterol de la dieta y biosíntesis de colesterol	Grano entero (sin color específico)

Luo y Wang (2012).



Ácido hidroxibenzoico



Ácido hidroxicinámico

Figura 6. Estructura química de los ácidos fenólicos.

Fantini (2015).

El ácido gálico también es el precursor biosintético de los taninos hidrolizables (galotaninos y elagitaninos), donde se producen como ésteres de azúcares complejos. Los galotaninos se encuentran en los mangos; mientras los elagitaninos se producen en frutos rojos como las fresas, frambuesas y las moras (Fantini y col., 2015).

Los ácidos hidroxicinámicos tienen una estructura C6-C3 y se encuentran principalmente en formas glicosiladas o ésteres de ácido quínico, shiquímico y tartárico (**Figura 6**). Los ácidos hidroxicinámicos más comunes son ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico y ácido sinápico. Cuando se combinan, el ácido cafeico y el ácido quínico forman ácido clorogénico, que se encuentra en frutas (arándanos, kiwis, ciruelas, cerezas, manzanas) y en altas concentraciones en el café (70-350 mg en una sola taza). El ácido cafeico, es el ácido fenólico más abundante, comprende del 75 al 100 % del contenido total de ácido hidroxicinámico de la mayoría de las frutas. Sin embargo, el ácido ferúlico es el ácido fenólico más abundante en cereales, y comprende hasta el 90 % del total del polifenol contenido en el grano de trigo. En el grano de maíz y sus productos, se ha reportado que el ácido ferúlico es el predominante, además proporciona más del 90 % de la capacidad antioxidante en maíz (Adom y Liu, 2002).

Los compuestos fenólicos más abundantes de los cereales son los ácidos hidroxicinámicos, siendo el ácido ferúlico el principal, seguido por los ácidos diferúlicos y cumárico. Se ha reportado que el 90 % del ácido ferúlico presente en los cereales se encuentra unido a arabinosilanos por medio de enlaces éster y el resto en forma libre. El 98 % del total de ácido ferúlico se encuentra distribuido en los tejidos externos de los cereales, como son pericarpio y capa de aleurona (Manach y col., 2004, Vitaglione y col., 2008 y Urías-Orona y col., 2015). Recientemente, Gaxiola-Cuevas y col. (2017), realizaron un estudio en maíz criollo azul, estos autores encontraron que el ácido ferúlico es el mayoritario en este cereal.

b Antocianinas

Las antocianinas representan el grupo más importante de pigmentos hidrosolubles detectables en la región visible por el ojo humano (Escalante y col., 2013). Estos pigmentos son responsables de la gama de colores que abarcan desde el rojo hasta el azul en varias frutas, vegetales y cereales, y se encuentran acumulados en las vacuolas de la célula (Dykes y col., 2007). Las antocianinas poseen diferentes funciones en la planta, como son la atracción de polinizadores para la posterior dispersión de semillas, y la protección de la planta contra los efectos de la radiación ultravioleta, y contra la contaminación viral y microbiana. El interés por los pigmentos antocianícos, y su investigación científica se ha incrementado en los últimos años debido no solamente al color que confieren a los productos que las contienen, sino a su probable papel en la reducción de enfermedades coronarias, cáncer, diabetes mellitus, efectos antiinflamatorios y mejoramiento de la agudeza visual, así como en el y comportamiento cognitivo. Por lo tanto, además de su función como colorantes, las antocianinas son agentes potenciales en la obtención de productos con valor agregado para el consumo humano (Escalante y col., 2013; Mora-Rochín y col., 2016; Cui y col., 2017).

Las antocianinas son compuestos fenólicos presentes en frutas, verduras y en algunos cereales. En maíz azul, y productos como la tortilla, se han reportado diferentes concentraciones de Cianidina-3-Glucósido (13 a 34 mg ECG/100 g, bs) (Mora-Rochin y col., 2010; Aguayo-Rojas y col., 2012; Sánchez-Madrigal y col., 2015; Mora-Rochín y col., 2016; Gaxiola-Cuevas y col., 2017; Cristerna-Diaz, 2018).

Las antocianinas en maíz azul han sido ya aisladas e identificadas, siendo cianidina-3-glucósido (Cy-3-Glu), pelargonidina-3-glucósido (Pg-3-Glu), pelargonidina-3-(6" malonilglucósido) (Pg-Mal-Glu) y cianidina-3-(6"-malonilglucósido) (Cy-Mal-Glu) (Mora-Rochín y col., 2016).

1 Estructura química y tipos de antocianinas

Las antocianinas son glucósidos de antocianidinas, pertenecientes a la familia de los flavonoides, constituidos por dos anillos aromáticos A y B, unidos por una cadena de 3 C. Variaciones estructurales del anillo B resultan en seis antocianidinas conocidas (Delgado-Vargas, 2000) (**Figura 7**).

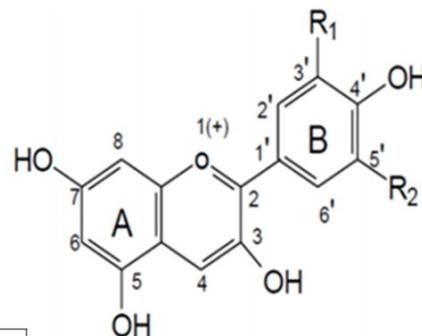
El color de las antocianinas depende del número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo de la molécula. Incrementos en la hidroxilación producen desplazamientos hacia tonalidades azules mientras que incrementos en las metoxilaciones producen coloraciones rojas (Stintzing y col., 2002). En la naturaleza, las antocianinas siempre presentan sustituciones glicosídicas en las posiciones 3 y/o 5 con mono, di o trisacáridos que incrementan su solubilidad. Dentro de los sacáridos glicosilantes se encuentran la glucosa, galactosa, xilosa, ramnosa, arabinosa, rutinosa, soforosa, sambubiosa y gentobiosa. Otra posible variación en la estructura es la acilación de los residuos de azúcares de la molécula con ácidos orgánicos (Delgado-Vargas, 2000; Cuevas-Rodríguez, 2014).

Los ácidos orgánicos pueden ser alifáticos, tales como malónico, acético, málico, succínico u oxálico, o aromáticos como *p*-coumárico, caféico, ferúlico, sinápico, gálico, o *p*-hidroxibenzóico (Stintzing y col., 2002).

Stintzing y col. (2002), demostraron que el tipo de sustitución glicosídica y de acilación producen efectos en el tono de las antocianinas; es así como sustituciones glicosídicas en la posición 5 al igual que acilaciones aromáticas, producen un desplazamiento hacia las tonalidades púrpura.

2 Biosíntesis de las antocianinas

Se ha establecido que al anillo A de las antocianinas se sintetiza por la ruta del ácido malónico con la condensación de tres moléculas de malonil-CoA, mientras que el anillo B se sintetiza por la ruta del ácido shikímico.



Aglicona	Substitución		λ max (nm)
	R1	R2	
	R1	R2	Espectro visible
Pelargonidina	H	H	494 (naranja)
Cianidina	OH	H	506 (naranja-rojo)
Delfinidina	OH	OH	508 (azul-rojo)
Peonidina	OCH3	H	506 (naranja-rojo)
Petunidina	OCH3	OH	508 (azul-rojo)
Malvidina	OCH3	OCH3	510 (azul-rojo)

Figura 7. Estructura y sustituyentes de las principales antocianinas.
Durst y Wrolstad (2001).

El ácido shikímico da paso a la fenilalanina que por acción de una fenilalanina amonía liasa (PAL), y después de una pérdida de NH₃ se convierte en ácido *p*-coumárico. El *p*-coumaril-CoA luego participa en una reacción de condensación con las tres moléculas de malonil-CoA, para formar una chalcona de 15 C, reacción propiciada por una chalcona sintetasa. Este compuesto intermedio de 15 C es transformado en una flavanona en una reacción catalizada por una chalcona isomerasa. Finalmente, la flavanona es transformada en la correspondiente antocianidina por una reacción de hidroxilación en el carbono 3 seguida por una deshidratación (**Figura 8**). La molécula de antocianidina se estabiliza por glicosilación del heterociclo; reacción en la que interviene una glicosil transferasa y posterior posibles reacciones de metilación de los hidroxilos seguidas de acilaciones (Stintzing y col., 2002; Diaconeasa y col., 2015).

3 Actividades biológicas de las antocianinas

El interés en las antocianinas, se ha intensificado recientemente debido a sus propiedades farmacológicas y terapéuticas (**Cuadro 3 y 4**). Durante el paso del tracto digestivo al torrente sanguíneo de los mamíferos, las antocianinas permanecen intactas, ejerciendo efectos terapéuticos como la reducción de la enfermedad coronaria, efectos anticancerígenos, antitumorales, antiinflamatorios y antidiabéticos; además del mejoramiento de la agudeza visual y del comportamiento cognitivo (Miyazawa y col., 1999).

Estudios con fracciones de antocianinas provenientes del vino han demostrado que estas son efectivas en atrapar especies reactivas de oxígeno, además de inhibir la oxidación de lipoproteínas y la agregación de plaquetas (Pérez, 2003). Estos resultados sugieren que las antocianinas son la explicación de la conocida “Paradoja Francesa”.

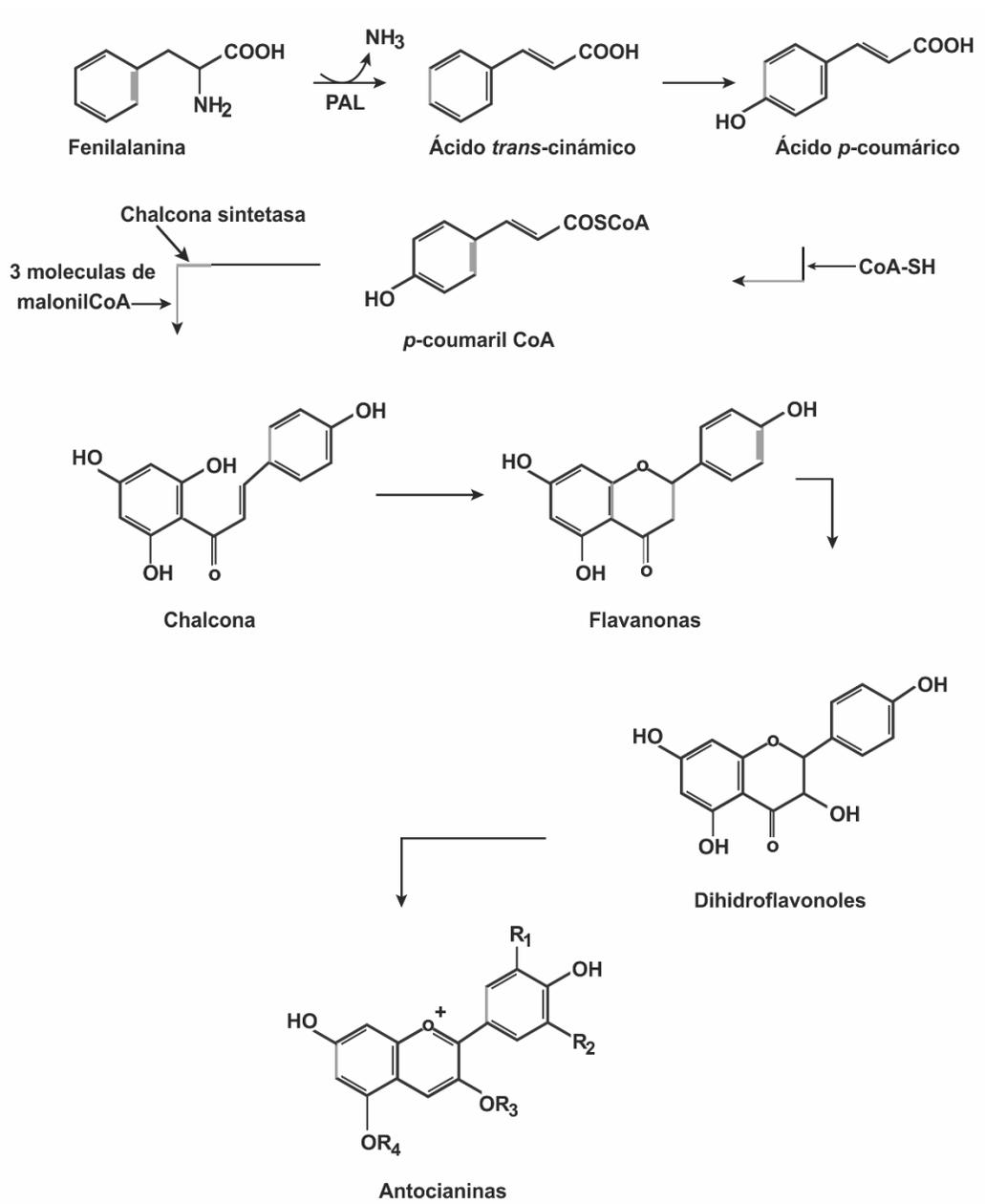


Figura 8. Ruta General de biosíntesis de las antocianinas.
Delgado-Vargas (2000).

Cuadro 3. Antocianinas y propiedad Nutracéutica

Material/Fuente	Tipo de antocianina	Propiedad Nutracéutica	Posible mecanismo	Referencia
Papa roja	Antocianinas de papa roja (no especificado tipo)	Actividad Anticancerígena, Inducción de la Apoptosis	Inhibición del crecimiento de células cancerígenas y muerte celular	Hayashi (2006)
Frutos de mora y frambuesa (berries)	Cianidina-3-glucosilrutinosido Cianidina-3-glucósido Cianidina-3-rutinosido Pelargonidina-3-glucósido Pelargonidina-3-rutinosido Cianidina-3-glucosilmalonato	Propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas. Alimento funcional.	Contenido de antocianinas, peroxidación de lípidos, acción ciclooxygenasa e inhibición de células tumorales de colon, mama, pulmón y estómago.	Bowen-Forbes (2010)
Maíz azul, morado, negro y rojo	Cianidina-3-Glucósido, Petunidina, Pelargonidina	Anticancerígeno, antimutagénico, antioxidante disminuye la hiperglicemia, antimicrobiano. Alimento funcional.	Inhibición de carcinogénesis colorectal debido a su alto potencial para la captura de radicales libres, previene la obesidad y mediante la protección de la mucosa gástrica	Luo y Wang (2012)
Berries: Aronia chokeberry	Cianidina-3-glucósido	Actividad Antioxidante y Antiproliferativa	Inhibición de células HeLa y HT-29, de cáncer cervicouterino y colon, anti-proliferación celular	Rugina (2012)
Arándanos	Malvidina	Actividad Antioxidante, Anti-proliferativa, simulador de apoptosis	Inhibición de células de melanoma en modelos murinos B16-F10, estimulando la apoptosis y el incremento de LDH en metástasis	Bunea (2013)
Frambuesas negras	Dieta rica de frambuesas negras y antocianinas (no especificado tipo)	Actividad Anticancerígena y Antiinflamatoria	Inhibición de N-nitrosometilbencilamina (NMBA) que induce cáncer de esófago, reducción de pentraxin-3 (PTX3), citoquina producida por células mononucleares de sangre en respuesta a la interleucina (IL) – 1b y TNF- α	Peiffer (2014)
Arroz Negro	Extracto de Antocianinas de Arroz Negro (no especificado tipo)	Actividad Anticancerígena	Supresión de la metástasis en las células de cáncer de mama al atacar la vía RAS/RAF/MAPK	Yan Chen (2015)
Arroz Negro Integral	Cianidina-3-glucósido	Actividad Anti-inflamatoria	Supresión de Lipopolisacárido (LPS) induciendo inflamación por la vía de señalización MAPK	Limtrakul (2015)
Soya negra	Petunidina	Supresión del estrés oxidativo, disminución de la respuesta inflamatoria	Disminución de la expresión mucosal de COX-2 y cPLA2	Park (2015)
Eugenia jambolana (Extracto de jugo de ciruela rico en antocianinas)	Peonidina	Actividad Anti-proliferativa, pro-apoptótica	Supresión de la proliferación en HTC-116 y elevación de la apoptosis en HTC-11 y cáncer de colon (CSCs)	Charepalli (2016)

Cuadro 4. Antocianinas en maíces pigmentados

Tipo de maíz	Lugar de origen	Muestra	Tipo de antocianina	Referencia
Maíces pigmentados (azul, morado, rojo escarlata, rosa, púrpura, rojo rubí, rojo carmesí, blanco)	Comprados y obtenidos de productores privados de granos y/o al por menor en el mercado, Universidades de Canadá	3 g de harina de maíz molido	Cy-3-Glu	Abdel-Aal (2006)
Maíz Morado (Zea mays L.)	Extractos obtenidos comercialmente, donados por proveedores (no especifica lugar de origen del maíz)	0.5 g de extracto rico en antocianinas de maíz morado	Cy, Pt, Pn	Jing (2008)
Maíces pigmentados (azul y rojo)	Programa de mejora genética de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Sinaloa	100 g de granos de maíz	Cy-3-Glu	Mora-Rochín (2010)
Hibrido y Maíz Azul (Zea mays L.)	Querétaro, México (Hibrido 2009) y Ciudad de México, México (Maíz Nativo 2008)	Concentración de extractos de antocianina acidificada y no acidificada fue un rango de 466.2 a 699.5 y 530.5 a 954.6 µg/g extracto IC50 = 5 mg/mL	Cy-3-Glu, CydiSucGlu, CyMalGlu, CySucGlu, Pg3-Glu, PgMalGlu	Urias-Lugo (2015)
Maíz Criollo Blanco, Amarillo, Azul y Rojo (Zea mays L.)	Huimilpan y Amazcala, Querétaro, México	100 g	Cy-3-Glu	Reynoso-Camacho (2015)
Elotero de Sinaloa (maíces pigmentados)	Municipio de Concordia, Sinaloa	1000 g de granos de maíz	Cy-3-Glu, Cy-Mal-Glu, Pg-3-Glu, Cy-Mal-Glu, Cy-Suc-Glu, Pg-Mal-Glu, Cy-diSuc-Glu	Mora-Rochín (2016)

Existen varias hipótesis, y se propone que el bajo riesgo de la enfermedad coronaria en Francia, se asocia con el alto consumo de vino tinto (Guillén-Sánchez y col., 2014). De igual manera, Wang y Jiao (2000) y Wang y Lin (2000), han demostrado que frutos ricos en antocianinas evidencian una alta actividad antioxidante contra el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y contra radicales peróxido ($ROO\cdot$), superóxido ($O_2\cdot^-$), hidroxilo ($\cdot OH$) y oxígeno singulete (1O_2) (Guillén-Sánchez y col., 2014; Cui y col., 2017; Fernández y col., 2018).

Hagiwara y col. (2002), demostraron que el suministro de papas púrpuras dulces, y repollo morado a ratas de laboratorio, causaron supresión de tumores.

De acuerdo a Tristan y col., 2008, antocianinas provenientes de cuatro especies de arándanos silvestres: *Amelanchier alnifolia*, *Viburnum trilobum*, *Prunus virginian* y *Shepherdia argentea*, muestran propiedades hipoglicémicas. Tales frutos, con alto contenido de sustancias fitoquímicas, han sido consumidos tradicionalmente por tribus norteamericanas para la protección de enfermedades crónicas como diabetes.

Extractos de fracciones ricos en protoantocianidinas de uvas y vino mostraron diferentes grados de polimerización y porcentajes de ésteres de galato; además cuando se variaron las concentraciones de las mezclas de extracto se obtuvieron diferencias en la capacidad de atrapar especies reactivas de oxígeno (probadas con células de cáncer de colon HT-29 humano) (Lizárraga y col., 2007).

Por otro lado, se mostró que este tipo de compuestos además de su capacidad antioxidante poseen capacidad anticarcinogénica a través de la regulación de citosinas como IL-10 e IL-6 en diferentes modelos de tumores, tales como, líneas celulares *in vitro*, células *in vivo* como macrófagos y algunos ratones (Mittal y col., 2003; Singh y col., 2004; Mantena y col., 2006; Cuevas-Rodríguez y col., 2014) e inducen apoptosis (regulan expresión de Bax-2), estimulan el sistema inmune y reprimen la expresión de genes de COX-2 e iNOS, y expresión de mRNA de biomarcadores durante el proceso de inflamación (Dai y col., 2007;

Pan y col., 2008; Nandakumar y col., 2008; Guo-Shu y col., 2010; Esposito y col., 2014; Cuevas-Rodríguez y col., 2014).

Los efectos antioxidantes de las antocianinas *in vitro* se han demostrado utilizando diversos sistemas celulares incluyendo colon, endotelio, hígado y mama (Renis y col., 2007; Singletary y col., 2007). En estos sistemas de cultivo las antocianinas han mostrado múltiples efectos antitóxicos y anticarcinogénicos atrapando directamente especies reactivas de oxígeno, incrementando la capacidad de absorber radicales de oxígeno de las células, reduciendo la formación de aductos en el ADN y disminuyendo la peroxidación de lípidos, inhibiendo mutagénesis y reduciendo la proliferación celular por la modulación de transducción de señales (Kong y col., 2003). La capacidad de atrapar radicales de las antocianinas se ha atribuido a la presencia de grupos hidroxilo en la posición 3 del anillo C y también en la posición 3', 4' y 5', en el anillo B de la molécula. En general, la capacidad de atrapar radicales de las antocianidinas (agliconas) es superior que la respectiva antocianina y ésta disminuye cuando el número de azúcares sustituyentes se incrementa (Wang y Stoner, 2008).

La actividad antioxidante de los polifenoles está relacionada con la prevención de cáncer en los estados iniciales. Boivin y col. (2009), realizaron un estudio donde evaluaron la capacidad antioxidante y la actividad antiproliferativa de diferentes líneas celulares de cáncer con diferentes vegetales, encontrando que el ajo, calabaza y coles de Bruselas mostraron mayor capacidad antioxidante (41.1, 40.5 y 32.9 μmol equivalentes Trolox/mL, respectivamente) (Boivin y col., 2009).

Bowen-Forbes y col., (2010) evaluaron antocianinas de frutos de mora y frambuesa identificando la presencia de Cianidina-3-glucosilrutinosido, Cianidina-3-glucósido, Cianidina-3-rutinosido, Pelargonidina-3-glucósido, Pelargonidina-3-rutinosido y Cianidina-3-glucosilmalonato. El contenido de antocianinas, la peroxidación lipídica, la acción de la ciclooxigenasa e inhibición de células tumorales de colon, mama, pulmón y estómago son posibles

mecanismos que sugieren sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas, además de sugerir a las berries como alimento funcional.

Por su parte, Luo y Wang (2012), evaluaron el efecto de las antocianinas del maíz azul, morado y rojo en el desarrollo de la carcinogénesis colorectal. Se encontró presencia de Cianidina, Petunidina y Pelargonidina como principales antocianinas, a las cuales se les atribuyó el efecto de inhibición de la carcinogénesis colorectal, debido a su alto potencial para la captura de radicales libres.

Rugina (2012), revela el efecto que tiene la cianidina-3-glucósido como principal componente de berries (*Aronia chokoberry*) en células de cáncer cervicouterino y células de cáncer de colon. Se atribuye su actividad antiproliferativa en las líneas celulares HeLa y HT-29 gracias a su alta actividad antioxidante.

Un extracto rico en antocianinas derivadas del arroz negro en China, comprobó la supresión de la metástasis en células de cáncer de mama al atacar directamente la vía RAS/RAF/MAPK (vía activa en el desarrollo de la carcinogénesis del tejido mamario y la extensión a otros órganos) (Chen y col., 2015). Por otro lado, un extracto de jugo de ciruela rico en antocianinas (*Eugenia jambolana*) demostró la supresión de la proliferación celular en la línea HTC-116 de cáncer de colon, y el aumento de la inducción de la apoptosis en las células HTC-11 de cáncer de colon (CSCs). Se determinó la actividad antiproliferativa y antiapoptótica al contenido mayoritario de Peonidina en el extracto de jugo de ciruela (Charepalli y col., 2016).

c Biodisponibilidad de polifenoles

Uno de los aspectos que más condiciona la actividad biológica de los polifenoles es su biodisponibilidad y biotransformación metabólica. Por ello, el estudio de la distribución de los polifenoles en la dieta y su biodisponibilidad en el organismo es clave para poder establecer su actividad biológica y evaluar la

concentración a la cual pueden ejercer sus efectos benéficos. Previo a la absorción de cualquier componente de los alimentos ha de tener lugar su liberación de la matriz alimentaria o bioaccesibilidad que genera la fracción bioaccesible y potencialmente biodisponible por el epitelio intestinal. La biodisponibilidad, definida como la fracción que alcanza la circulación sistémica y el sitio específico donde pueda ejercer su acción biológica, viene condicionada por numerosos factores (D'Archivio y col., 2010).

Inicialmente se relacionó más la absorción de los fenoles con la estructura química del compuesto que con la concentración ingerida (Scalbert y Williamson, 2000), aunque otros factores de índole genético, ambiental o culinario también determinan la biodisponibilidad de los polifenoles. Además, los polifenoles más abundantes, no son siempre los más activos biológicamente, porque tienen una baja actividad intrínseca, o bien porque son pobremente absorbidos, altamente metabolizados o rápidamente excretados (Manach y col., 2004).

El metabolismo de los polifenoles sigue las mismas vías que el metabolismo de xenobióticos (Manach y col., 2004). Para ello, intervienen un conjunto de reacciones globalmente denominadas de biotransformación, en las que se modifica de manera más o menos compleja la estructura química de los xenobióticos para aumentar su hidrosolubilidad y así facilitar su eliminación vía renal o biliar, por lo que también se denominan reacciones de detoxificación. Estas reacciones son mediadas generalmente por procesos enzimáticos endógenos, aunque también juega un papel importante la microbiota intestinal. Las biotransformaciones dependen de la polaridad y lipofilia de los biocompuestos, además están sujetas a procesos enzimáticos de metabolización en el sistema de fase I y fase II.

En el metabolismo de fase I, los polifenoles son comúnmente sometidos a reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis, mediadas por enzimas del complejo citocromo P-450 (CYP), localizadas en el retículo endoplasmático, y las mitocondrias de las células. La mayor concentración de estas enzimas se ha

encontrado en el hígado, pared intestinal, riñón e incluso en cerebro (Lavandera y col., 2007).

Las reacciones del metabolismo de fase II, son reacciones de conjugación catalizadas por enzimas tipo transferasa, para transformar el compuesto en otro más hidrofílico. La reacción de glucuronidación es la más frecuente, además de otras reacciones clave en la conjugación de los polifenoles, tal como la sulfatación y metilación (Pérez, 2012).

Wiczowski y col. (2010), realizaron un estudio con jugo de frutos de aronia (*Aronia melanocarpa*) rico en antocianinas (cianidina-3-galactósido antocianina mayoritaria). El jugo fue suministrado a trece voluntarios sanos (0.8 mg de antocianina/kg de peso corporal); antes y después del consumo del jugo se tomaron muestras en orina y sangre de cada individuo. Los resultados mostraron ocho derivados de cianidina después del consumo del jugo. La concentración máxima de antocianina en plasma fue de 2.9 nmol/h (después de 0.1 h del consumo de jugo), mientras que en orina la concentración fue de 5.0 nmol/h (alcanzada después de 1 h de consumo).

A pesar de los diversos factores que intervienen en la destrucción de las antocianinas durante su trayecto por el tracto intestinal, logran permanecer hasta el torrente sanguíneo, logrando así un efecto protector y preventivo de enfermedades crónicas (Wiczowski y col., 2010).

6 Procesamiento del grano de maíz

Debido a su gran diversidad genética, los maíces no contienen la misma composición química, presentan diferencias en sus propiedades y en su utilización final. Así el maíz puede utilizarse en la producción de hojuelas para el desayuno y botanas (Salinas-Moreno y col., 2003), aislamiento de almidón, el cual es materia prima en diversas industrias para la fabricación de harinas nixtamalizadas, para la industria molinera-tortillera, entre otros (Salinas-Moreno y col., 2003; Uriarte-Aceves y col., 2015).

En la industrialización del maíz, se aprecian dos formas de procesamiento: 1) molienda seca, y 2) molienda húmeda. A través del primer proceso se obtiene la harina de maíz, con diferentes tamaños de partículas, y el germen del grano, del cual se extrae el aceite. En la molienda húmeda, se obtiene almidón, aceite y subproductos para alimento animal (gluten, harina de gluten y tortas de germen) (Sala y Barroeta, 2003; Uriarte-Aceves y col., 2015). Sin embargo, la tortilla es la principal forma de consumo de maíz en México.

La Cámara Nacional del Maíz Industrializado, establece que la industria de la tortilla en México está constituida por cerca de 45,000 tortillerías, alrededor de 10,000 molinos de nixtamal y 4 empresas productoras de harina de maíz nixtamalizado (Espinoza y Carrillo, 2003).

a Proceso de nixtamalización

La tortilla puede ser producida a partir de masa fresca a través del proceso de nixtamalización tradicional o de harina de maíz instantánea, esta última ha llegado a ser más utilizada ya que no se requiere el trabajo intensivo y tedioso del proceso tradicional para la producción de tortillas, y puede ser almacenada por largos tiempos sin afectar su calidad (Arámbula, 1994; Bello-Pérez y col., 2015).

El método tradicional de nixtamalización, consiste en un cocimiento alcalino del grano de maíz en agua (relación 3:1 agua: maíz) a 85-100°C por 30 a 90 min, adicionando hidróxido de calcio al 1 %. Después de esta etapa, el maíz se deja reposar por un periodo de 12 a 18 horas. El grano cocido con cal en agua es denominado nixtamal, y el residuo líquido (nejayote) rico en sólidos es descartado. Después el nixtamal es enjuagado dos o tres veces con agua, para remover los fragmentos de pericarpio desprendidos del grano. El nixtamal se muele para obtener una pasta fina llamada masa. Alrededor de 35 a 50 g de masa son aplanados, para obtener una circunferencia de 15 a 20 cm de diámetro y aproximadamente 0.2 a 0.3 cm de grosor, la cual es cocida por 1-1.5 min.

Cuando se empieza a hinchar, la tortilla es volteada y cocida finalmente por otros 30 s (Serna-Saldivar y col., 1990).

Durante el proceso de nixtamalización, se presentan diferentes cambios fisicoquímicos y estructurales en los diversos componentes del grano de maíz. El cocimiento alcalino y el reposo, provocan el hinchamiento e hidrólisis de los componentes de fibra de las paredes celulares de la aleurona y pericarpio, y del endospermo, lo cual produce una disminución parcial de la cutícula y otras capas del pericarpio (Pflugfelder y col., 1988; Gómez y col., 1989; Serna-Saldivar y col., 1990; Ruiz-Gutiérrez y col., 2010); las células de aleurona permanecen intactas y quedan unidas en la periferia del endospermo (Gómez y col., 1989; 1992). La laminilla media y las paredes celulares son prácticamente degradadas y solubilizadas, lo cual es detectado por la pérdida de fluorescencia en las paredes celulares de la periferia del endospermo. Por otro lado, la fracción del germen se retiene durante el cocimiento del grano (Robles y col., 1988; Gómez y col., 1989).

En general, durante la nixtamalización los granos enteros pierden generalmente 0.5 a 14.5% de su peso en el nejayote. Estos sólidos se asocian principalmente con pericarpio, germen y el endospermo exterior o aleurona (Velazco-Martínez y col., 1997, Rosentrater, 2006).

b Efecto de la nixtamalización sobre compuestos bioactivos

Durante el proceso de nixtamalización existe pérdida de fenólicos totales, ácido ferúlico, atocianinas, carotenoides totales y sus fracciones (luteína, zeaxantina, β -criptoxantina y β -caroteno) en comparación con los granos crudos de maíz. Estas pérdidas son atribuidas al efecto combinado del procesamiento térmico y alcalino, lo cual genera una alta concentración de materia orgánica en el nejayote, incluyendo parte del endospermo, el germen y fitoquímicos (Gutiérrez-Urbe y col., 2010; Mora-Rochín y col., 2010 y 2016; Mendoza-Díaz y col., 2012; Corrales-Bañuelos y col., 2016). Sin embargo, el efecto del proceso térmico alcalino o nixtamalización, afecta de diferente forma a los diferentes

biocompuestos presentes en maíz. Algunos de estos compuestos son sensibles a factores como altas temperaturas, luz, calor, aire y pH (Corrales-Bañuelos y col., 2016).

A pesar que existe degradación de algunos de los biocompuestos presentes en el grano de maíz tras el proceso de nixtamalización, se ha reportado que sus productos como la tortilla, poseen propiedades antioxidantes (hidrofílica y lipofílica), y anticarcinogénicas. Sin embargo, es necesario la búsqueda de otras propiedades que pudieran generar los compuestos presentes en la tortilla.

IV JUSTIFICACIÓN

El cáncer es problema de salud pública a nivel mundial. Su etiología es de origen multifactorial, aunque se cree que intervienen factores genéticos, biológicos, hormonales y de estilo de vida. Su diagnóstico y tratamiento son de alto costo para el gobierno, y los sistemas de salud, e incluso para los pacientes. Debido a esto, es importante que las políticas públicas vayan encaminadas a estrategias de prevención en etapas tempranas durante el desarrollo de la enfermedad. El maíz criollo azul en México es parte de nuestra biodiversidad y riqueza nacional, sin embargo, ha sido poco estudiado. A partir de maíz criollo azul se pueden elaborar productos similares a los que se producen con maíces blancos comerciales. El maíz azul es fuente de compuestos fenólicos, principalmente flavonoides (antocianinas) y ácidos fenólicos (ácido ferúlico, cumárico y sinápico). Numerosos estudios han demostrado que los compuestos fenólicos poseen propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antiproliferativas, antiapoptóticas, antimutagénicas, antiparasitarias y antibacterianas. Sin embargo, a la fecha existen pocos estudios que demuestren el impacto que tienen extractos ricos en polifenoles y antocianinas de tortilla de maíz criollo azul en líneas celulares de Cáncer (Daoy, Hela y SW-480) sobre actividades anticancerígenas.

V HIPÓTESIS

Extractos ricos en polifenoles y antocianinas de tortilla de maíz criollo azul, poseen propiedades anticancerígenas en líneas celulares Daoy, Hela y SW-480.

VI OBJETIVOS

A Objetivo General

Evaluar propiedades anticancerígenas de extractos ricos en polifenoles y antocianinas de tortilla de maíz criollo azul en líneas celulares Daoy, Hela y SW-480.

B Objetivos Específicos

1. Elaborar tortillas de maíz criollo azul a partir de harinas nixtamalizadas.
2. Obtener extractos metanólicos ricos en polifenoles y antocianinas a partir de maíz criollo azul y tortillas elaboradas con harinas nixtamalizadas.
3. Evaluar niveles y perfiles de antocianinas en maíz criollo azul y tortillas elaboradas con harinas nixtamalizadas.
4. Evaluar la actividad antioxidante por los métodos químicos de ABTS y ORAC a extractos ricos en polifenoles y antocianinas de maíz criollo azul y tortillas elaboradas con harinas nixtamalizadas.
5. Evaluar el efecto de extractos ricos en polifenoles y antocianinas de maíz criollo azul y tortillas sobre bioactividades de viabilidad, proliferación y apoptosis en líneas celulares Daoy, Hela y SW-480.

VII MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo del trabajo experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Nutracéuticos del Programa Regional de Posgrado en Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa y en el Laboratorio de Oncología Experimental de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, de la Ciudad de México.

A Materiales

Se utilizaron granos de maíces (*Zea mays* L.) criollos pigmentados azul (FAUAS-512) del estado de Sinaloa. Después de la cosecha, los granos fueron limpiados y almacenados en refrigeración (4°C) hasta que fueron utilizados.

Las 3 líneas celulares que se utilizaron fueron proporcionadas por la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y el Laboratorio de Oncología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría en la Ciudad de México (INP). Las células de cáncer de colon (SW-480) fueron proporcionadas por la UNAM. Mientras que las células de meduloblastoma (Daoy) y cáncer cervicouterino (Hela), fueron proporcionadas por el INP.

B Métodos

1 Obtención de las harinas de maíz criollo azul

1) Molienda

Harina de maíz criollo azul fue obtenida con un molino hasta obtener partículas finas, y con textura suave.

2) Nixtamalización del grano de maíz criollo azul

Harinas instantáneas nixtamalizadas de maíz criollo azul fueron obtenidas de acuerdo al procedimiento de Milán-Carrillo y col. (2004) (**Figura 9**). La cocción del grano de maíz se llevó a cabo con la adición de 100 g de granos de maíz entero y serán sometidos a disolución de hidróxido de calcio [5.4 g de Ca (OH)₂/L en agua destilada]. La mezcla fue calentada a 85°C, seguido de un tiempo de

reposo de 8.1 h; el proceso de nixtamalización terminó con la remoción del agua de cocción (nejayote). El nixtamal (granos de maíz sometidos a cocción alcalina) fue lavado al chorro de agua potable varias veces y se quitó el exceso de humedad con papel absorbente.

3) Secado y almacenamiento

El nixtamal fue secado a 55°C por 12 h, luego se enfrió a temperatura ambiente por 30 min en un desecador. Finalmente, el nixtamal seco, fue sometido a molienda (UD Cyclone Sample Mill, UD Corp. Boulder, CO, USA) hasta alcanzar un tamaño de partícula hasta pasar por malla 80 (0.180 mm) de diámetro. Las harinas instantáneas de maíces criollos azules nixtamalizadas fueron guardadas en bolsas de polietileno selladas y fueron almacenadas (5-8°C) hasta su uso.

4) Elaboración de las Tortillas de maíz criollo azul nixtamalizado

Para la elaboración de las tortillas se dispuso de 1,500 gr de harina de maíz criollo azul la cual fue nixtamalizada previamente. Se requirió de agua a temperatura ambiente para la mezcla con la harina y de un comal casero tradicional. La manipulación de las tortillas fue realizada por una experta en elaboración de tortillas, asegurando así, el proceso y aplicación de calor. Las tortillas presentaron hinchabilidad y enrollamiento deseable como cualquier tortilla comercial.

2 Obtención de las fracciones ricas en polifenoles (FRP) y antocianinas (FRA)

a Obtención del Extracto Crudo (EC)

Para la extracción de los polifenoles de maíz criollo azul y tortillas, se utilizó el método descrito por Burns y col. (2008), con ligeras modificaciones. Se tomaron 30 g de cada muestra y se mezclaron con 150 mL de metanol al 80 % (v/v). Las muestras fueron agitadas durante 24 h a 4°C.

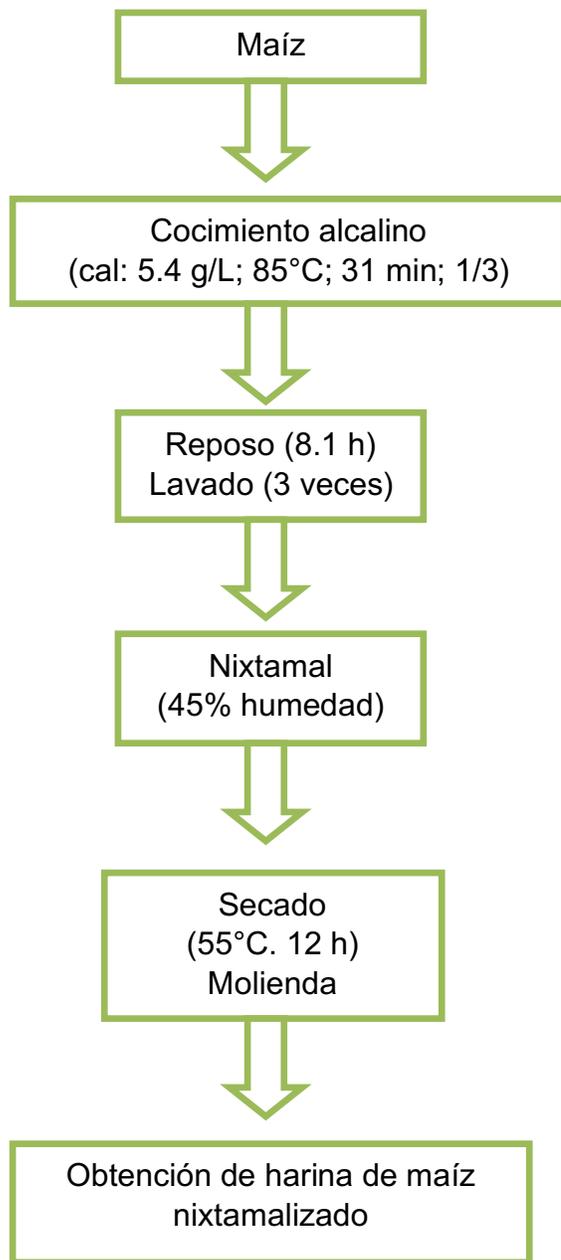


Figura 9. Proceso de nixtamalización para la obtención de harina instantáneas.

Milán-Carrillo y col. (2004).

Después de este tiempo, la solución fue centrifugada, y el sobrenadante fue recolectado para su posterior filtrado [(Qualitative Circles 125 mmØ Cat No 125 (Filter papers – Whatman)]. Finalmente, el filtrado fue almacenado a 4°C. El proceso de extracción se repitió dos veces. El sobrenadante recolectado fue evaporado en un rotavapor Büchi R-210 con bomba de vacío V-700 conectada a controlador de vacío V-850 (Büchi Corp, New Castle, DE, EUA). Los extractos obtenidos de maíz criollo azul y tortillas fueron liofilizados y almacenados a - 20°C para su posterior utilización.

b Separación de la fracción no polar

Para obtener los extractos de maíz criollo azul y tortilla libre de lípidos, se puso en contacto con acetato de etilo 100% (AET:1:1: v/v) con la solución obtenida del extracto crudo de cada harina (1:1). Se utilizó un embudo de separación con capacidad de 1000 mL en donde se mezclaron 250 mL del extracto crudo y 250 mL de acetato, se mezclaron de forma lenta para lograr la solubilidad de forma homogénea, y posteriormente se eluyó el extracto libre de grasa. Al final la parte lipofílica fue guardada en refrigeración, mientras que el extracto crudo libre de lípidos se evaporó en un rotavapor (Büchi R-210, con bomba de vacío V-700 conectada a controlador de vacío V-850, Büchi Corp, New Castle, DE, EUA), para posteriormente ser liofilizado.

c Obtención de la fracción rica en polifenoles (FRP)

La obtención de la fracción rica en polifenoles (FRP) se llevó a cabo de acuerdo al método reportado por Cuevas-Rodríguez y col. (2010), con modificaciones menores. Extractos crudos libres de lípidos (200 mL aprox.) se vertieron en la parte superior de una columna empacada con resina Amberlite – XAD-7 (3 X 30 cm) (100 a 200 mL aproximadamente), previamente preacondicionada con una disolución de agua acidificada [100 % (v/v) ATC 0.3 %]. En la columna eluyeron primeramente carbohidratos, seguido por la FRP, la cual fue retirada con metanol acidificado al 80 % (MeOH 80 %, H₂O 20 %, ATC

0.3 %), luego de ser colectada se evaporó en un rotavapor (Büchi Corp, New Castle, DE, EUA), para su posterior liofilización.

d Obtención de la fracción rica en antocianinas (FRA)

Para la extracción de la fracción rica en antocianinas (FRA) se llevó a cabo de acuerdo al método reportado por Grace y col. (2009) con modificaciones menores. Extractos ricos en polifenoles (FRP) (2.0 g) se disolvieron y sonicaron en 10 mL de metanol al 80 % (v/v). Posteriormente la disolución fue vertida en la parte superior de una columna empacada con resina Sephadex –LH-20 (3 X 30 cm), previamente preacondicionada con una disolución de metanol acidificada [80 % (v/v), 0.3 % ATA]. Para la obtención de esta fracción se utilizaron dos sistemas de disolventes para eludir los compuestos polifenólicos de la columna Sephadex: metanol [80 % (v/v), 0.3 % ATA]. Un total de 2 fracciones (250 mL cada una) se colectaron, iniciando cuando el material púrpura comenzó a eludir de la columna. Las primeras fracciones son las ricas en antocianinas (FRA) y se utilizó metanol [80 % (v/v), 0.3 % ATA] como fase móvil para eludir el extracto rico en antocianinas. Los solventes orgánicos se evaporaron con un rotavapor Büchi model R-210 con bomba de vacío V-700 conectada a un controlador de vacío V-850 (Büchi Corp.). Finalizado el proceso de evaporación, el extracto fue liofilizado en equipo modelo VL-61010 (Labconco Inc., Kansa City). Finalmente, la FRA fue almacenada a -20°C en botellas de vidrio color ámbar.

3 Perfiles y niveles de compuestos bioactivos y actividad antioxidante en las FRP y FRA

a Contenido de antocianinas totales

El contenido de antocianinas totales para las FRP y FRA fue determinado por el método descrito por Abdel-Aal y Huel (1999). Se pesaron 0.1 g de muestra en un vial de 2 mL, se agregó 1 mL de metanol (100 %). Una vez solubilizados, se tomaron 200 µL de cada uno de los extractos (FRP y FRA), y se colocaron en una placa de 96 pozos. La absorbancia de las muestras fue registrada a 535 nm

y 700 nm en un lector de microplatos (Synergy HT, Biotek Instrument). El contenido de antocianinas se calculó de la siguiente manera:

$$C = ((A_{535\text{nm}} - A_{700\text{nm}}) / \epsilon) \times (\text{vol. total de extracto}) \times \text{PM} \times (1/\text{peso de muestra})$$
, Donde, C es la concentración total de antocianina (mg equivalentes de cianidina-3-glucosido por gramo de muestra), ϵ es la absorción molar (cianidina-3-glucósido = $25965 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) y PM es el peso molecular de cianidina-3-glucósido (449.2 g/mol). Las mediciones se realizaron por triplicado.

b Contenido de Fenólicos Totales

Para determinar la concentración de fenólicos totales se empleó el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, descrito por Singleton y col. (1999). En una placa de 96 pozos, se agregaron 20 μL de las fracciones ricas en polifenoles (FRP) y antocianinas (FRA) del maíz criollo azul y tortilla elaborada con harinas nixtamalizadas. El estándar utilizado y los extractos, fueron mezclados con 180 μL del reactivo de Folin. La reacción fue neutralizada con 50 μL Na_2CO_3 al 7%, y posteriormente fue incubada por 90 min. La absorbancia fue registrada a 765 nm en un lector de microplatos (Synergy HT, Biotek Instrument). Se construyó una curva de calibración con ácido gálico como estándar. Los resultados fueron expresados como mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/100 g de muestra en base seca.

c Capacidad antioxidante de las FRP y FRA

1) ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity, ORAC)

La capacidad antioxidante de las FRP y FRA se realizó mediante el método ORAC (por sus siglas en inglés Oxygen Radical Absorbance Capacity, ORAC), desarrollado para compuestos hidrofílicos y lipofílicos (Cao y col., 1993 y 1995; Wu y col., 2004). La degradación térmica del compuesto 2-2'-Azobis amidinopropano (AAPH) produce radicales peroxilo (ROO^*), los cuales oxidan al

compuesto fluorescente, diclorofluoresceína (DCFH) al compuesto no fluorescente, diclorofluorescina (DCF). El grado de inhibición de los antioxidantes (polifenoles y antocianinas) de atrapar o secuestrar a los radicales libres, fue utilizado como base para calcular la actividad antioxidante.

Para la preparación de la solución generadora de radicales libres (2-2'-Azobis amidinopropano) AAPH, fueron pesados 0.207 g del reactivo, y fue aforada en un matraz volumétrico de 5 mL con solución reguladora de buffer de fosfato (pH 7.4). La fluoresceína fue preparada hasta el final (ya que esta puede ser oxidada muy lentamente en condiciones ambientales) a una concentración de 0.1 μ M con solución reguladora de fosfato (pH 7.4). Se realizaron diluciones de los extractos de las muestras usando una solución reguladora de fosfato (pH 7.4), y posteriormente fueron transferidos 25 μ L de cada extracto a una placa de 96 pozos.

La placa con las muestras fue colocada en el lector de microplatos (Synergy HT, Biotek Instrument) del espectrofotómetro fluorescente. Por medio de un auto-dispensador del equipo fueron agregados 150 μ L de fluoresceína a cada pozo del microplato, la solución fue mezclada agitando a 1200 rpm por 20 s. La reacción fue iniciada agregando 25 μ L de AAPH por medio del auto-dispensador del equipo previamente programado. La reacción se llevó a cabo a 37°C, y la fluorescencia fue medida a 485 nm de excitación y 538 nm de emisión. Los datos fueron recolectados por el software del equipo. La reacción con los radicales peróxilo generó la pérdida de la fluorescencia con el tiempo.

Los valores de ORAC fueron reportados como equivalentes de Trolox ET/g EL. Fue generada una curva estándar de cinco puntos (concentración de 25 a 100 μ M); los equivalentes de Trolox de la muestra fueron calculados usando la siguiente ecuación lineal o cuadrática:

Lineal: $Y = a + bX$;

Cuadrática: $Y = a + bX + cX^2$

que relaciona la concentración de equivalentes de Trolox (Y) (μM), y el área bajo la curva sobre la disminución de la fluorescencia (X) ($\text{ABC}_{\text{muestra}} - \text{ABC}_{\text{blanco}}$). Las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

2) ABTS

La capacidad antioxidante de las FRP y FRA de maíz criollo azul y tortillas elaboradas con harinas nixtamalizadas, fue evaluada en términos de la actividad captadora de radicales libres mediante el ensayo de decoloración del catión radical ABTS (Re y col., 1999), el cual se basa en la reducción del radical $\text{ABTS}^{+\cdot}$ por los antioxidantes presentes en los diferentes extractos.

El ABTS fue disuelto en agua desionizada a una concentración de 7 mM. Una solución stock del catión radical ABTS ($\text{ABTS}^{+\cdot}$) se generó mediante la reacción de la solución de ABTS con persulfato de potasio (K^+) 2.45 mM (concentración final), y permitiendo que la mezcla reposara en la oscuridad a temperatura ambiente durante 12-16 h antes de su uso. Una alícuota de la solución con el radical $\text{ABTS}^{+\cdot}$ se diluyó en PBS hasta alcanzar una absorbancia de 0.8 a 1.0, a 734 nm. Se colocaron 20 μL de cada extracto en una placa de 96 pozos para completar con 180 μL de la solución $\text{ABTS}^{+\cdot}$, haciendo un volumen total de 200 μL para cada pozo. La absorbancia fue registrada a 734 nm, 15 min después de la mezcla inicial y se calculó la pérdida de absorbancia del $\text{ABTS}^{+\cdot}$ respecto al blanco. Se preparó una curva de calibración con una solución de Trolox a concentraciones de 12.5, 25, 50, 75 y 100 μM . Los datos se expresaron como μmol equivalentes de trolox (ET) /g EL.

d Análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en la FRA

Los análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) se llevaron a cabo utilizando un cromatógrafo de líquidos de alta resolución HPLC 1100 (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, EUA), utilizando un detector de arreglo de diodos, inyector automático, columnas de

compartimiento a temperatura controlada y software ChemStation 3D para el procesamiento de datos. El gradiente de elución de la fase móvil para la identificación de antocianinas fue de 5 % de ácido fórmico en agua grado HPLC (A) y 100 % de metanol (B). El flujo (1 mL/min) fue constante durante el análisis de HPLC, con un gradiente de paso de 10, 15, 25, 30, 60, 100, y 10 % de solvente B a 0, 5, 15, 20, 25, 45, y 60 min, respectivamente, a una temperatura constante de 25°C. Las muestras de las FRA de maíz azul y tortillas, se prepararon disolviendo 5 mg en metanol (1 mL), y se filtraron a través de filtro nylon de 0.22 µm (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA). Finalmente, 10 µL del filtrado fue inyectado al sistema de HPLC.

Como estándares externos, se prepararon soluciones de cianidina-3-O-glucósido o catequina a diferentes concentraciones (1.0, 0.5 y 5.0 mg/mL). Para la cuantificación de antocianinas se llevó a cabo con el área bajo la curva obtenida a 520 nm. El análisis por HPLC se llevó a cabo por duplicado.

4 Efecto antiproliferativo, anticancerígeno y antiapoptótico de las FRP y FRA

a Cultivo Celular

Líneas celulares (Daoy, HeLa y SW-480) de tejidos cancerígenos se cultivaron en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con 1 % de las fracciones ricas en polifenoles (FRP) y antocianinas (FRA) de maíz criollo azul y tortilla, 1 % piruvato de sodio y 10 % de suero fetal bovino, y mantenido en una atmósfera humidificada con 5 % CO₂ a 37°C.

b Conteo Celular

Una vez que se obtuvo una confluencia mayor al 80 % en cada botella de 75 cm² para cada una de las líneas celulares, se procedió al conteo celular para asegurar el número de células requeridas. El medio de cada una de las líneas celulares fue retirado, haciendo lavados con PBS (solución amortiguadora de fosfatos estéril con pH de 7.4). Para despegar y disociar a las células de la botella

de cultivo, fue utilizada solución de tripsina EDTA. El concentrado celular se resuspendieron en medio de cultivo suplementado (10 % de Suero Bovino Fetal, 1 % antibiótico). Después de inactivar la reacción enzimática se realizó el conteo con el Hemocitómetro o Cámara de Neubaur (1:9). 5 μ L de la suspensión celular y 45 μ L de Azul de Tripán, fueron homogeneizados, y tomados 10 μ L para el conteo al microscopio. El porcentaje de células vivas, se obtuvo sumando el número de células vivas multiplicado por el factor de dilución por el volumen total de la suspensión celular, y por la constante determinada por la técnica (2,500). Se contaron las células muertas también para restarlas al 100 % de células, y poder obtener el número real de células viables.

c Tratamiento con las FRP y FRA

El efecto del tratamiento fue medido en tres líneas celulares: Daoy de Cáncer de Meduloblastoma, HeLa de Cáncer Cervicouterino, y SW-480 en Cáncer de Colon. El bioensayo se llevó a cabo mediante la siembra de 6×10^3 células para cada pozo en una placa de 96 pozos. Las células se cultivaron durante 24 horas a 37°C en 5 % CO_2 /95 % aire. Posteriormente, las células se trataron con las fracciones ricas en polifenoles (FRP) y fracciones ricas en antocianinas (FRA) de maíz azul criollo azul y tortillas elaboradas con harinas nixtamalizadas. La concentración utilizada de cada una de las fracciones fue la calculada por una $\text{IC}_{50} = 2 \text{ mg/mL}$ (10 μ L de cada extracto solubilizado).

d Bioensayo de Viabilidad y Proliferación Celular (XTT)

El ensayo de medición utilizado para este protocolo fue el Kit de Proliferación Celular II (XTT), ensayo colorimétrico basado en la cuantificación no radiactiva de la proliferación y viabilidad celular. El bioensayo se basa en la escisión de la sal de tetrazolio amarilla XTT para formar formazan color naranja en células metabólicas activas. El colorante de formazan se cuantificó usando un Espectrofotómetro de exploración múltiple (lector de ELISA). De donde se

obtuvieron las unidades de absorbancia (densidades ópticas) para cada una de las líneas celulares a diferentes tiempos de exposición a los tratamientos.

Para determinar el número de células requeridas por pozo, fue necesario realizar la técnica con células sin la sustancia a analizar y su Densidad Óptica (DO)= mayor ó igual a 1. Se utilizaron 6×10^3 células para cada pozo por cada línea celular en cajas de 96 pozos, por un período de incubación de 24 horas a 37°C y 5 % de CO₂, para permitir su adherencia y formar la monocapa con una confluencia mayor al 80 %. Se añadieron 10 µL de la sustancia problema por pozo. Se incubó a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 6 horas para permitir que la sustancia actúe en todas las células. Se descartó el medio y se colocaron 100 µL de medio nuevo. Se añadió 50 µL de XTT (mg/mL) en solución tampón libre de calcio y magnesio, y se incubó por 4 horas a 37 °C para su posterior medición en un lector de microplatos, ELISA. La lectura de DO se realizó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm.

El porcentaje de Viabilidad se obtiene de la siguiente forma:

% Viabilidad = DO células tratadas x 100 / DO células control

Cada bioensayo se realizó por triplicado, se utilizaron controles negativos (células cancerígenas no tratadas) las cuales dieron una lectura de DO mayor ó igual a 1. Los valores de comparación se hicieron sobre una base de 50 % de inhibición de crecimiento (IC₅₀) en células tratadas con los diferentes tratamientos.

e Bioensayo de Muerte Celular: Apoptosis

Para conocer el mecanismo de muerte celular se realizó el método de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling, por sus siglas en inglés) de Takara Inc, para la detección de apoptosis. Es un método efectivo para la medición de fragmentos de ADN, que resultan del proceso de apoptosis mediado por la activación intracelular de endonucleasas.

Los nucleótidos marcados con fluoresceína se incorporan en los extremos de estos fragmentos de ADN *in situ*, lo que permite la localización histológica y la detección de células individuales. El método TUNEL utiliza la desoxinucleotidil transferasa terminal para marcar los extremos 3'-OH de los fragmentos de ADN que se generan durante el proceso de apoptosis. Las células sometidas a la apoptosis son marcadas específicamente con fluoresceína dUTP con alta sensibilidad, que permite la detección inmediata de estas células por microscopía o citometría de flujo.

Células Daoy, HeLa y SW-480 fueron cultivadas a una concentración de 2×10^5 células en una botella de cultivo de 25 mL, e incubadas a 37°C, 5% CO₂ y 95 % aire, en medio EMEM para Daoy y HeLa, y DMEM para SW-480 suplementado con suero bovino fetal al 10% por 24 horas para su adhesión. Posteriormente fueron tratadas con la concentración de cada una de las fracciones a la concentración obtenida por IC₅₀ (6 horas). Transcurrido el tratamiento, las células fueron desprendidas de la superficie de la botella utilizando una espátula para cultivo, el concentrado celular obtenido fue centrifugado a 1200 rpm durante 3 min. El sobrenadante obtenido fue desechado, y el concentrado celular fue resuspendido en 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos con pH de 7.4. A la disolución obtenida se le realizó el conteo, utilizando una cámara de Neubaur de la misma manera que en el procedimiento antes mencionado.

De las diferentes fracciones utilizadas (FRAC, FRAP, FRPC y FRPP) con los diferentes tiempos de exposición (6, 12, 24, 48 y 72 horas) celular, se pudo observar que la mayor disminución de la proliferación celular (líneas Daoy, Hela y SW-480) fue a las 6 y 12 horas de exposición. Estos resultados fueron tomados como base para identificar el mecanismo de muerte celular. Por lo anterior se tomó el tiempo de 6 horas de exposición para los diferentes extractos.

Para llevar el bioensayo con 6 horas de exposición de los diferentes tratamientos, se tomaron botellas con cada una de las líneas celulares (Daoy, Hela y SW-480) para llevar a cabo el conteo de células viables y no viables. Se llevó a cabo el desprendimiento celular, y la suspensión celular fue lavada con PBS y secada en aire en un portaobjetos de vidrio. Las células fueron fijadas con paraformaldehído/PBS 4 % (pH 7.4) dejándolo secar durante 15 a 30 minutos a temperatura ambiente. Se realizó lavado con PBS, y se aplicaron 100 μ L del buffer de permeabilización en hielo por 2 a 5 minutos, para permitir la penetración de la mezcla de reacción de marcaje. Al lograr permeabilizar las membranas celulares, se aplicaron 50 μ L de la mezcla de reacción de marcaje (TdT Enzima 5 μ L + Buffer de marcaje 45 μ L), esta mezcla fue preparada y enfriada en hielo antes de usarla en el portaobjetos. Se incubó a 37 °C en cámara humidificada por 60 a 90 minutos, y posteriormente la reacción se finalizó realizando un lavado con PBS. Se utilizó una solución antiapagamiento de la fluoresceína, Vecta Shield (10 μ L), esto para evitar que la fluorescencia se desgastara al observar en microscopio de fluorescencia, así como permitir la tinción de los núcleos celulares. Por último, las laminillas fueron fijadas con un cubreobjetos de 1mm y selladas con barniz alrededor para su posterior vista en el microscopio de fluorescencia.

5 Análisis Estadístico

Los resultados se repitieron al menos tres veces. A menos que se indique lo contrario, los datos se expresan como media \pm desviación estándar. Los datos son analizados aplicando ANOVA simple de un factor (software GraphPad Prism 5) y la comparación de medias (comparación entre tratamientos) se utilizó la prueba de rango múltiple de Tukey con un nivel de significancia del 95% ($p < 0.05$). Se utilizó el programa GraphPad Prism 5 y SPSS (Statitics Program versión 22) para los análisis estadísticos.

VIII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A Rendimiento del maíz y tortilla para la purificación de los extractos

Para la obtención de la harina de maíz crudo y harina de tortilla nixtamalizada, se usaron 1.5 kg de granos de maíz. Sin embargo, durante el proceso de molienda para el grano crudo, y durante el proceso de nixtamalización, se generaron ligeras pérdidas (25 a 15% aproximadamente), obteniendo un promedio final de 1.25 a 1.35 kg de harina de maíz crudo, y harina de tortilla.

Del promedio obtenido de cada una de las harinas, se tomó 1 kg aproximadamente (para cada una de las harinas), para llevar a cabo la purificación de los biocompuestos. De la harina nixtamalizada (1.35 kg), se obtuvieron un total de 42 tortillas con un tamaño promedio a las tortillas comerciales. Los dos productos más importantes en la industria de la masa y la tortilla, son masa fresca y tortilla. El contenido promedio de humedad en tortilla es de 56 a 43 %.

El maíz que se destina a la industria de la masa y la tortilla debe presentar un rendimiento maíz/masa de 2.0 a 1.9 kg, y de maíz/tortilla de 1.5-1.54 por cada kg de maíz procesado, con humedad base estándar de 12 % (Salinas-Moreno y col., 2010). En nuestro estudio no se tomó en cuenta el rendimiento maíz/masa y maíz/tortilla, debido a que no se registró el índice de humedad, por lo que sería interesante ver la relación que existe entre ellos, y poder dar de manera certera un porcentaje de rendimiento.

En el **Cuadro 5** se puede observar los rendimientos de los extractos de polifenoles y antocianinas obtenidos después del proceso de purificación. Una vez que el extracto se hizo pasar por la resina Amberlite se obtuvo un extracto rico en polifenoles; la resina permitió remover carbohidratos, minerales y algunos ácidos fenólicos.

Cuadro 5. Rendimiento del extracto de polifenoles y antocianinas obtenidos a partir de 1.5 kg de maíz criollo azul

Harina cruda		Harina procesada	
<i>Peso inicial*</i>	1023.3 ± 723.6	<i>Peso inicial*</i>	1054.9 ± 723.6
<i>FRPC</i>	9.9 ± 1.5	<i>FRPP</i>	7.8 ± 1.5 g
<i>FRAC</i>	1.5 ± 0.06	<i>FRAP</i>	1.6 ± 0.06

FRPC: Fracción Rica de Polifenoles Crudo; **FRPP:** Fracción Rica de Polifenoles Procesada; **FRAC:** Fracción Rica de Antocianinas Cruda; **FRAP:** Fracción Rica de Antocianinas Procesada. *g/EL: gramos por extracto liofilizado.

B Fenólicos totales en fracciones de maíz criollo azul y tortilla nixtamalizada

El contenido de fenólicos totales en la fracción de polifenoles y antocianinas en maíz criollo azul (FRPC y FRAC) y tortilla nixtamalizada (FRPP y FRAP), mostró valores promedio de 15.9 y 51.2, vs 30.42 y 60.1 mg EAG/100 g, EL, respectivamente (**Figura 10**).

De acuerdo con los resultados obtenidos, se pudo observar que la transformación del grano crudo en tortilla por nixtamalización tradicional, logró incrementar ($p < 0.05$) el contenido de fenólicos totales en las FRPP y FRAP (90 y 17 %).

El aumento de fenólicos en cada una de las fracciones pudiera ser debido a las características del proceso tradicional de nixtamalización. Durante la cocción alcalina del grano de maíz ocurre hidrólisis de la pared celular, la cual esta formada por ácidos fenólicos que se encuentran de forma ligada. Además, es importante mencionar que en esta fracción también están presentes las antocianinas. A pesar que las antocianinas son sensibles a factores como altas temperaturas y pH alcalinos, la cocción alcalina del grano pudiera causar la liberación de otro tipo de antocianinas. Se conoce que las antocianinas aciladas son mas resistentes a las altas temperaturas vs antocianinas glucosiladas, por lo que este incremento pudiera ser atribuido a las aciladas (Mora-Rochin y col., 2016; Gaxiola-Cuevas y col., 2017).

Mora-Rochin y col. (2010), en un estudio con maíces pigmentados, reportaron un aumento en la fracción de fenólicos libres y ácido ferulico en tortillas elaboradas con harinas nixtamalizadas, mencionaron que el proceso térmico alcalino favorece la liberación de fenólicos contenidos en la pared celular. Además, el incremento de ciertos componentes por la hidrólisis que se da durante el proceso de nixtamalización, ayuda a la formación de otros polifenoles (Mora-Rochin y col., 2010).

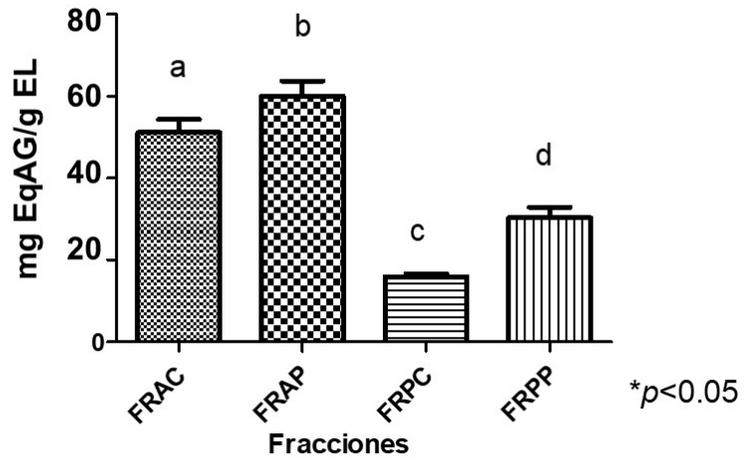


Figura 10. Contenido de fenólicos totales en maíz azul y tortilla nixtamalizada.

C Antocianinas totales en fracciones de maíz criollo azul y tortilla nixtamalizada

El contenido de antocianinas totales evaluada por espectrofotometría en la fracción rica en polifenoles y antocianinas en maíz criollo azul (FRPC y FRAC) y tortilla nixtamalizada (FRPP y FRAP), mostró valores promedio de 8.02 y 2.42 vs 6.94 y 3.92 mg EqCy-3-Glu/100 g, bs (**Figura 11**).

De acuerdo con los resultados obtenidos, se pudo observar que la transformación del grano crudo a tortilla, mostró una retención del 86% en el contenido de antocianinas totales para la FRPP. Efecto contrario fue observado para la FRAP, donde se observó un incremento mayor al 60%.

El incremento en el contenido de antocianinas coincide con lo reportado por Salinas-Moreno y col. (2003); estos autores observaron incrementos de Cianidina-3-glucósido en harina nixtamalizada de maíz azul. Los autores mencionan que este incremento esta relacionado con una posible degradación de antocianinas de tipo acilado. Además, existen reportes donde se menciona que en maíz azul predominan las antocianinas de tipo aciladas (60 a 82%), principalmente cianidina 3-(6"-malonilglucosido (Collison y col., 2015; Mora-Rochin y col., 2016), las cuales son mas resistentes a los tratamientos térmico-alcalinos. Se cree que cianidina 3-(6"-malonilglucosido) se convierte en cianidina-3-glucosido, debido a que el enlace éster con el que está unido el radical acilo (malonil y succinil) al azúcar, es inestable a las condiciones de temperatura y pH que se dan durante el proceso de nixtamalización, por lo tanto, el radical acilo es liberado y la antocianina resultante quede como cianidina-3-glucosido (De Pascual-Teresa y col., 2002; Mora-Rochín y col., 2016).

D Identificación y cuantificación de antocianinas por HPLC en maíz criollo azul y tortilla nixtamalizada

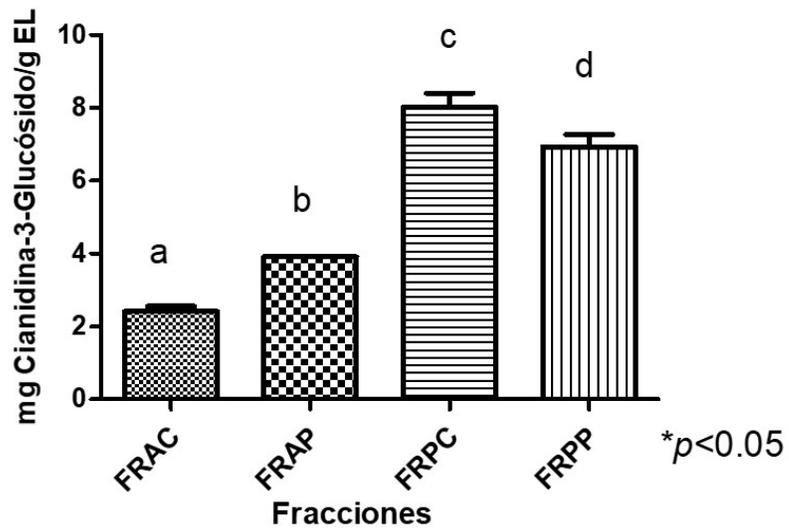


Figura 11. Contenido de antocianinas totales en maíz azul y tortilla nixtamalizada.

La identificación y cuantificación de antocianinas por HPLC para la fracción de polifenoles y antocianinas en maíz criollo azul (FRPC y FRAC) y tortilla nixtamalizada (FRPP y FRAP), se muestran en el **Figura 12 y Cuadro 6**.

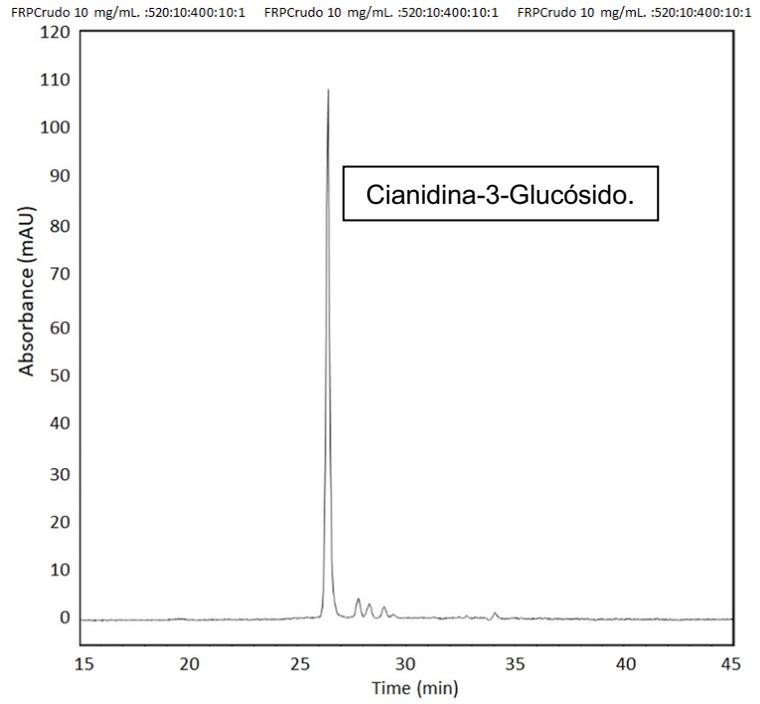
Los cromatogramas obtenidos por HPLC (**Figura 12**) para las diferentes fracciones purificadas (FRPC, FRAC, FRPP y FRAP), mostraron una disminución (50%) de la señal de Cianidina-3-Glucósido durante la transformación de grano a tortilla. Estos resultados son similares a lo reportados por otros autores, donde encontraron pérdidas mayores al 50% tras el proceso de cocción por nixtamalización en grano de maíz azul (Collison y col., 2015; Mora Rochín y col., 2016).

De acuerdo con el análisis de los espectros obtenidos a 520 nm, y los tiempos de retención (26.5 min), se pudo concluir que la cianidina-3-glucósido se encuentra en mayor proporción. Sin embargo, otras antocianinas se pudieran encontrar en menor proporción de acuerdo con las señales obtenidas a diferentes tiempos de retención.

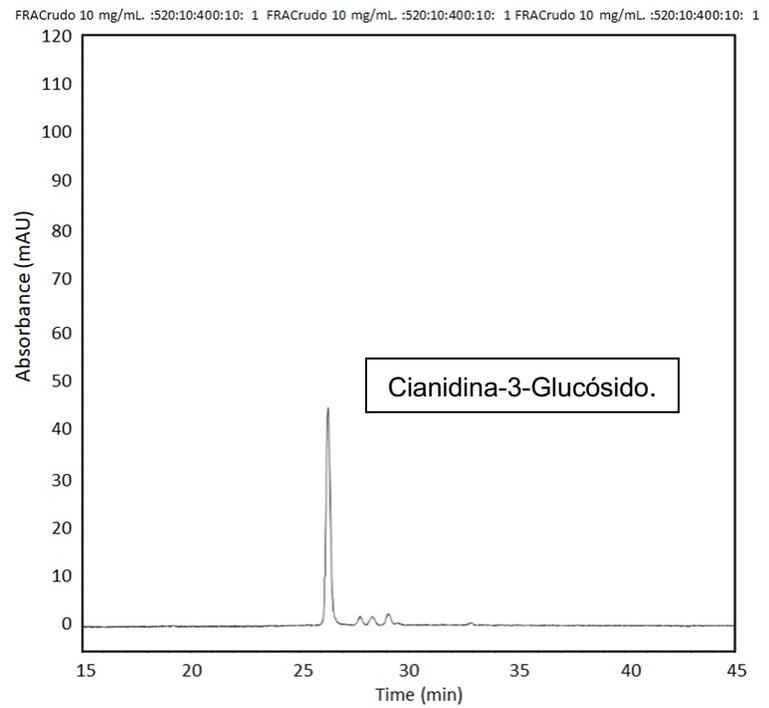
Los resultados obtenidos coinciden con otros investigadores que han encontrado diferentes antocianinas en maíz azul ([Pelargonidina-3-Glucósido (Pg-3-Glu); Peonidina-3-Glucósido (Pn-3-Glu); Cianidina-3-(6''-succinilglucósido) (Cy-3-6''-Suc-Glu); Cianidina-3-(6''malonilglucósido) (Cy-3-6''-Mal-Glu) y Pelargonidina-3-(6''malonilglucósido) (Pg-3-6''Mal-Glu)] (Collison y col., 2015; Menchaca-Armenta, 2016; Mora-Rochín y col., 2016).

La identificación y cuantificación de biocompuestos por HPLC es una técnica analítica ampliamente utilizada en el análisis estructural de alimentos, especialmente en la identificación de compuestos no polares, solubles en agua, y termo-lábiles no volátiles, además, tiene como ventajas el fácil manejo del equipo, alta sensibilidad y tiempos de análisis relativamente cortos (Menchaca-Armenta, 2016).

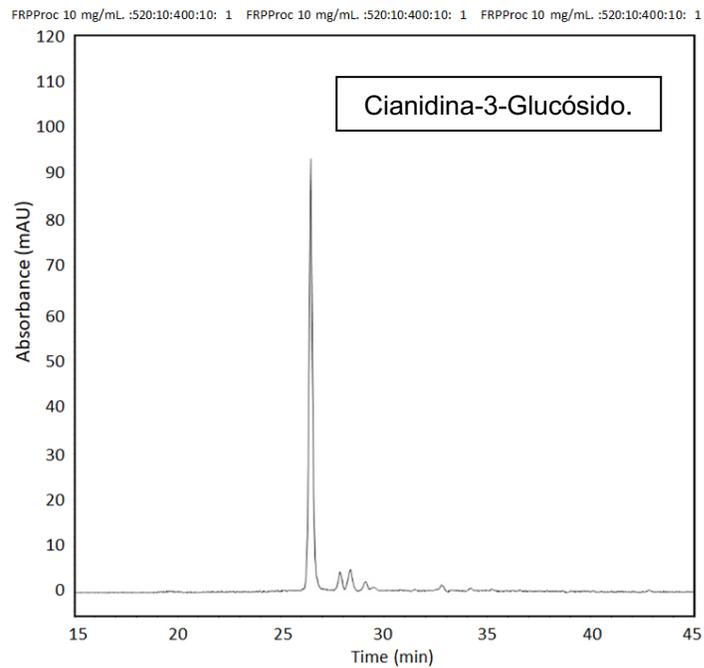
a



b



c



d

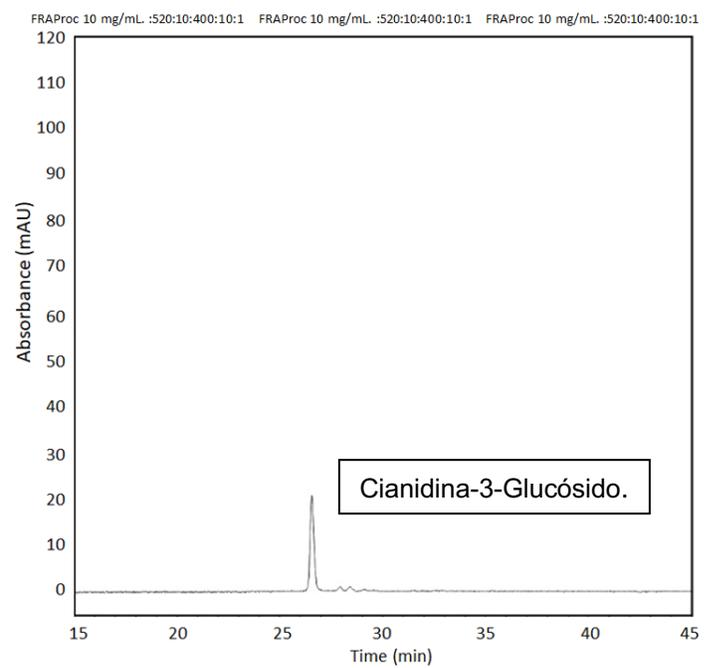


Figura 12. Cromatogramas de (a) (b) fracción de polifenoles y antocianinas de maíz azul y (c) (d) de tortilla nixtamalizada. Pico: Cianidina-3-Glucósido.

Cuadro 6. Cuantificación de antocianinas por HPLC en grano de maíz y tortilla nixtamalizada

Harina	Polifenoles	Antocianinas
	FRP*	FRA*
Harina Cruda	14.8 ± 0.23 ^a	11.0 ± 0.06 ^a
Harina de Tortilla nixtamalizada	13.6 ± 0.52 ^a	5.4 ± 0.31 ^b

^{a,b} letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$). **FRP**: fracción rica de polifenoles; **FRA**: fracción rica de antocianinas. *mgEqCy-3-Glu/g de extracto.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se observó que la transformación del grano de maíz a tortilla causó disminución en el contenido de antocianinas en las fracciones purificadas de polifenoles y antocianinas (FRPC, FRPP, FRAC y FRAP). La FRPP mostró ligeras pérdidas (8.2%) con respecto a la FRPC (13.6 vs 14.8 mg EqCy-3-Glu/g de EL). Sin embargo, la fracción mas afectada por el proceso de cocción alcalina, fue la FRAP (5.4 mg EqCy-3-Glu/g de EL), la cual mostró pérdidas ($p < 0.05$) de hasta el 50% con respecto a la fracción del grano de maíz (11.0 mgEqCy-3-Glu/g de EL). Nuestros resultados coinciden con lo reportado por Rodríguez-Méndez y col. (2013) y Mora-Rochín y col. (2016), quienes encontraron pérdidas de antocianinas en tortillas nixtamalizadas de maíz azul mayores al 50 %. Como ya se mencionó anteriormente, las antocianinas son sensibles a factores como pH alcalinos y altas temperaturas, lo que conduce a una disminución de su contenido con respecto al maíz sin procesar.

Para corroborar lo anteriormente mencionado, se observó una disminución en la primera señal del cromatograma de la **Figura 12**, que corresponde a Cianidina-3-glucósido, con lo que afirmamos que tras el proceso de nixtamalización o cocción alcalina del grano de maíz, se ve afectado el contenido de antocianinas con un porcentaje de retención del 49.3% con respecto al grano de maíz.

Los resultados obtenidos por HPLC son similares a los encontrados por el método colorimétrico en este mismo estudio, donde se reportaron pérdidas del 50% de antocianinas totales durante la transformación del grano de maíz a tortilla.

La determinación e identificación de antocianinas pudiera parecer una labor relativamente simple cuando se emplea HPLC, sin embargo, la falta de estándares es una gran desventaja, y en muchos casos dificulta el conocer la identidad de una señal en particular. Por lo tanto, la espectrometría de masas (MS) es requerida como técnica para la elucidación de la estructura de las

principales antocianinas presentes en los extractos de maíz crudo y tortilla, la cual no se llevó a cabo para este estudio.

E Capacidad antioxidante evaluada por el método de ORAC y ABTS en maíz criollo azul y tortilla nixtamalizada

La actividad antioxidante evaluada por los métodos de ORAC y ABTS en las diferentes fracciones de maíz criollo azul (FRPC y FRAC) y tortilla elaborada con harina nixtamalizada (FRPP y FRAP) se muestran en las **Figura 13 y 14**.

De acuerdo con los resultados obtenidos se pudo observar que las actividades por los métodos de ORAC y ABTS fueron diferentes en las fracciones purificadas de maíz. Se observaron actividades ORAC en maíz criollo azul para las FRAC y FRPC de 20,862.3 y 76,099.2 $\mu\text{mol ET}/100 \text{ g, EL}$, mientras que para ABTS se observaron valores de 900 y 12,366 $\mu\text{mol ET}/100 \text{ g, EL}$. (**Figura 13 y 14**).

Interesantemente, la transformación del grano crudo a tortilla mostró disminuciones (51 y 75%) en la actividad antioxidante para la fracción rica en antocianinas por los métodos de ORAC y ABTS. Sin embargo, la fracción rica en polifenoles mostró incrementos ($p < 0.05$) (8.7 y 7.5%) durante la transformación a tortilla (**Figura 13 y 14**). Nuestros resultados coinciden con lo reportado por Jiménez-Névarez (2017) en tortilla obtenida por nixtamalización. Este autor realizó extractos ricos en polifenoles y antocianinas, y observó un incremento del 100 % de la actividad antioxidante evaluada por ABTS para tortilla de maíz criollo azul.

La disminución de la actividad antioxidante por los métodos de ORAC y ABTS para los extractos ricos en antocianinas, podría ser debido a que estos biocompuestos son sensibles a factores como pH alcalinos, y altas temperaturas. Por otro lado, el incremento en esta propiedad para los extractos ricos en polifenoles podría deberse a que durante la nixtamalización tradicional existe

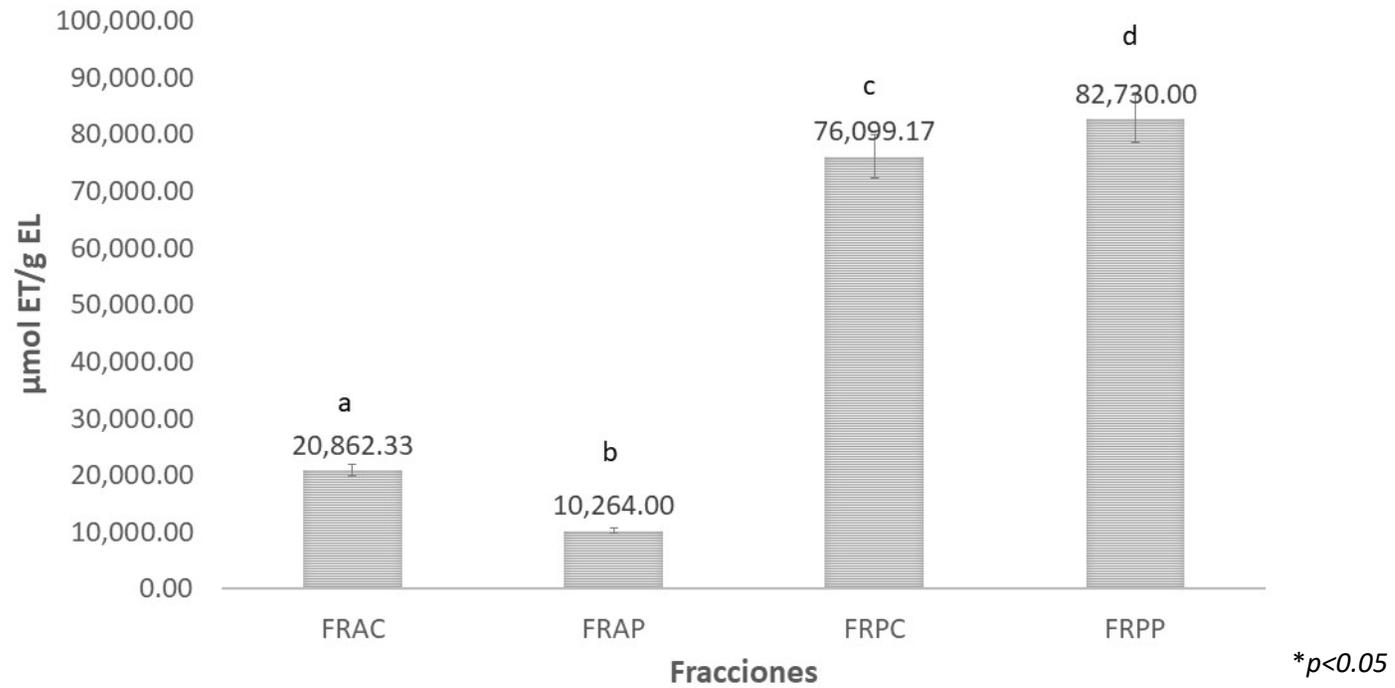


Figura 13. Capacidad antioxidante de los extractos de polifenoles y antocianinas de maíz azul y tortilla nixtamalizada.

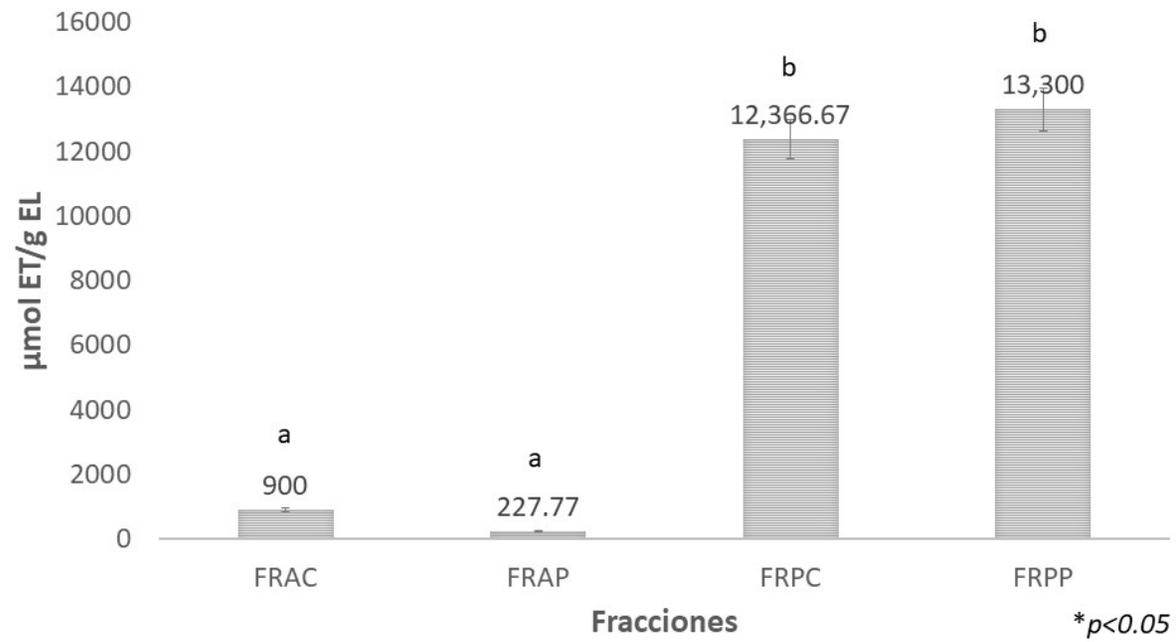


Figura 14. Capacidad antioxidante de los extractos de polifenoles y antocianinas de maíz azul y tortilla nixtamalizada.

liberación de ácidos fenólicos, principalmente ácido ferúlico, y principal fenólico promotor de la actividad antioxidante en cereales. Sin embargo, es importante mencionar que el extracto rico en polifenoles tanto en grano crudo como en tortilla también contiene antocianinas, no solo ácidos fenólicos, esto también podría ser una causa que este tipo de extracto posea mayor actividad antioxidante.

Compuestos bioactivos como antocianinas han demostrado tener mayor actividad antioxidante que vitaminas como la C y E. Su capacidad antioxidante es atribuida principalmente a la captura de radicales libres por donación de átomos de hidrógeno, siendo esta la razón por la que se le atribuye actividad anticarcinogénica (Castañeda-Ovando y col., 2009).

La mayoría de los reportes en la literatura sobre investigaciones realizadas respecto a la capacidad antioxidante de las antocianinas son en frutos y hortalizas, por lo que existen pocos estudios que evalúen la actividad antioxidante de extractos ricos de antocianinas provenientes de maíz azul y sus productos, es por ello que no se tiene evidencia suficiente para corroborar los datos obtenidos sobre su capacidad antioxidante.

Los métodos utilizados (ORAC y ABTS) para evaluar la actividad antioxidante se basan en diferentes mecanismos. La reactividad de los compuestos fenólicos es dependiente de las estructuras químicas que lo conforman, por lo tanto, los resultados obtenidos por diferentes métodos pueden ser sesgados (Zhao y col., 2008).

La elevada capacidad antioxidante presente tanto en grano crudo como en tortilla, podría estar directamente relacionada con la concentración de compuestos bioactivos, como son ácidos fenólicos y antocianinas, ya que son considerados potentes antioxidantes.

F Efecto Antiproliferativo y Anticarcinogénico de Polifenoles y Antocianinas de Maíz Criollo Azul y tortilla nixtamalizada

a Cultivo Celular

Con base en la revisión de la literatura se determinó probar diferentes concentraciones (2, 4, 6, 8 y 10 mg/mL) para determinar la Concentración Inhibitoria al 50 % (CI_{50}). La CI_{50} determinada en la curva de crecimiento celular tras la exposición al tratamiento fue de 2 mg/mL para cada una de las réplicas del ensayo (**Cuadro 7 y 8**) (**Figura 15 y 16**).

b Exposición al tratamiento con fracciones de polifenoles y antocianinas de maíz criollo azul y tortilla nixtamalizada

Las líneas celulares Daoy, HeLa y SW-480 se trataron con fracciones ricas en polifenoles (FRPC y FRPP) y fracciones ricas en antocianinas (FRAC y FRAP) en grano de maíz y tortilla nixtamalizada (a una CI_{50} de 2 mg/mL).

c Viabilidad Celular

Para las 3 líneas celulares obtuvimos un porcentaje de confluencia mayor al 80 % [Daoy (96 al 100 %), HeLa (96 al 98 %) y SW-480 (93 al 98 %)]. Para el control negativo (0 horas) se aplicó directamente la concentración del reactivo XTT para la medición de viabilidad celular sin exposición al tratamiento. Los resultados del porcentaje de viabilidad celular para cada línea tras la exposición al tratamiento con fracciones ricas en polifenoles y antocianinas se presentan en el **Cuadro 7 y Figura 15**.

1 Meduloblastoma (Daoy)

En la **Figura 17**, se puede observar los resultados obtenidos de la viabilidad celular de células de meduloblastoma (Daoy), tratadas con las fracciones de FRPC, FRPP, FRAC y FRAP a una concentración de 2 mg/mL de extracto, y

Cuadro 7. Concentración Inhibitoria al 50 % de extractos de antocianinas de grano de maíz y tortilla nixtamalizada en células cancerígenas.

Antocianinas Crudas y Procesadas						
CI50 (mg/mL)	% Viabilidad celular					
	SW-480 (AC)	SW-480 (AP)	HeLa (AC)	HeLa (AP)	Daoy (AC)	Daoy (AP)
2 mg/mL	20.24	41.74	36.31	30.37	24.94	30.33
4 mg/mL	32.19	36.44	47.54	45.52	28.60	39.96
6 mg/mL	34.29	31.67	33.12	35.91	33.82	30.39
8 mg/mL	60.30	78.51	79.91	76.67	63.47	65.63
10 mg/mL	56.40	68.47	89.11	88.48	74.91	72.58

CI50: Concentración Inhibitoria al 50 %; **AC:** Antocianinas Crudas; **AP:** Antocianinas Procesadas; **SW-480:** Línea Celular Cáncer de Colon; **HeLa:** Línea Celular Cáncer Cervicouterino; **Daoy:** Línea Celular de Meduloblastoma.
***mg/mL:** miligramos por mililitro.

Cuadro 8. Concentración Inhibitoria al 50 % de extractos de polifenoles en grano de maíz y tortilla nixtamalizada en células cancerígenas.

IC50 Polifenoles Crudos y Procesados						
% Viabilidad celular						
CI50 (mg/mL)	SW-480 (PC)	SW-480 (PP)	HeLa (PC)	HeLa (PP)	Daoy (PC)	Daoy (PP)
2 mg/mL	62.11	52.41	126.83	104.57	45.61	45.05
4 mg/mL	41.88	24.27	65.45	72.65	61.15	55.73
6 mg/mL	83.80	27.60	83.65	92.07	71.90	62.77
8 mg/mL	79.51	71.25	87.81	107.33	78.39	50.17
10 mg/mL	61.24	55.91	60.19	96.11	51.50	60.90

CI50: Concentración Inhibitoria al 50 %; **PC:** Polifenoles Crudos; **PP:** Polifenoles Procesados; **SW-480:** Línea Celular Cáncer de Colon; **HeLa:** Línea Celular Cáncer Cervicouterino; **Daoy:** Línea Celular de Meduloblastoma. ***mg/mL:** miligramos por mililitro.

CI50 de Antocianinas Crudas y Procesadas

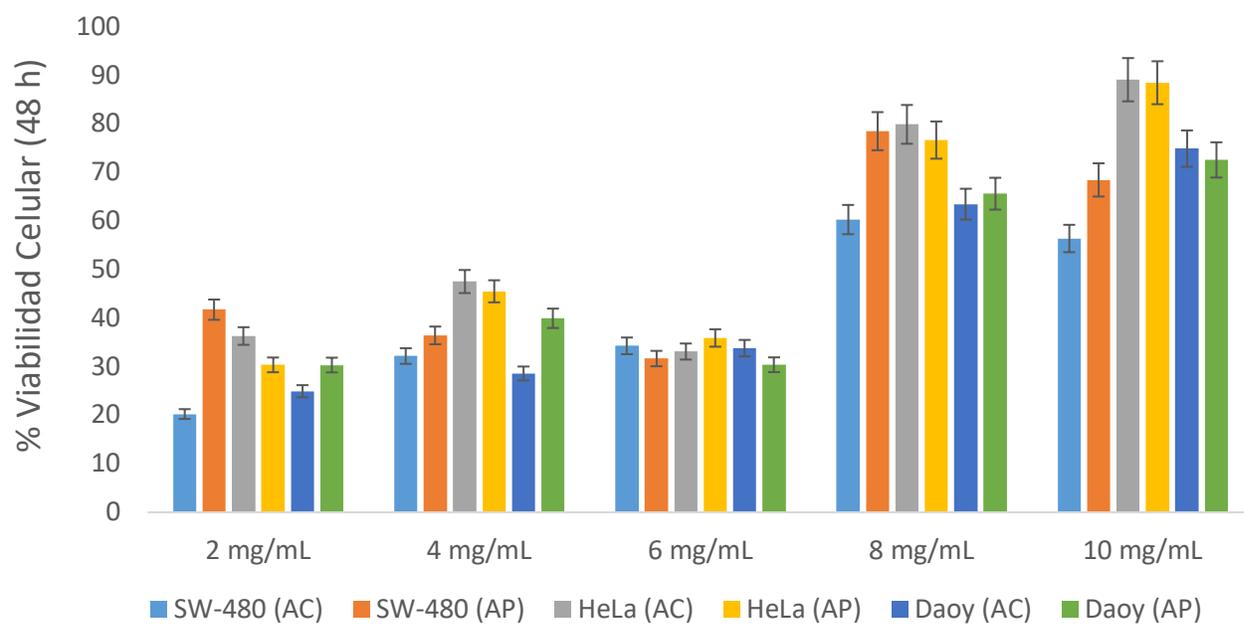


Figura 15. Porcentaje de Viabilidad Celular y Concentración Inhibitoria al 50 % de extractos de antocianinas en líneas celulares.

CI50 Polifenoles Crudos y Procesados

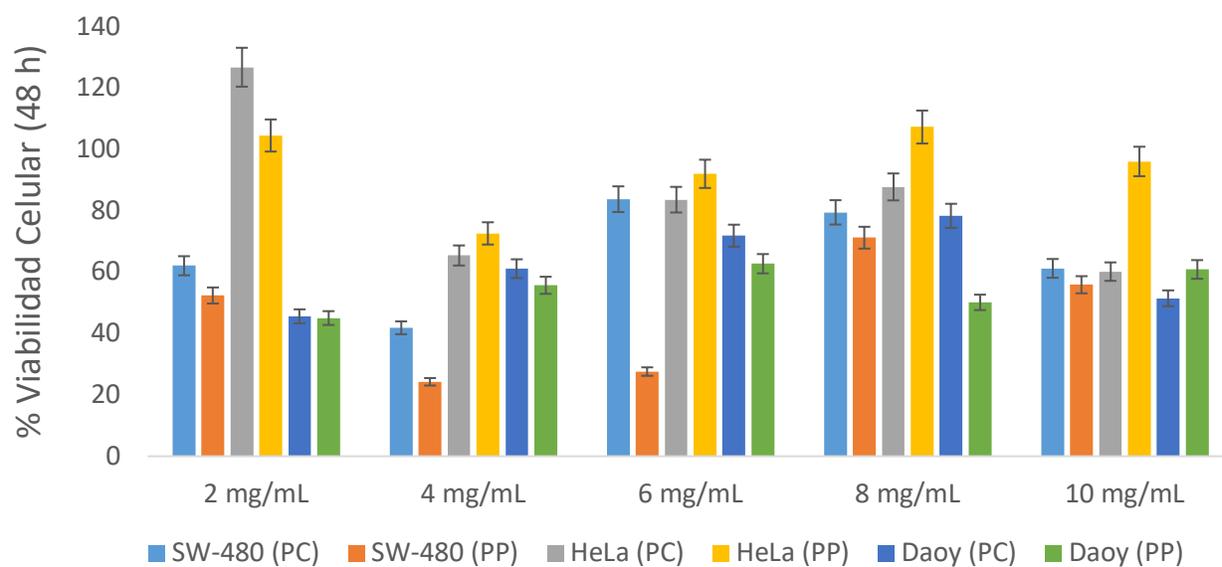


Figura 16. Porcentaje de Viabilidad Celular y Concentración Inhibitoria al 50 % de extractos de polifenoles en líneas celulares.

una confluencia de 96 a 100% tras la exposición al tratamiento durante 6, 12, 24, 48 y 72 horas. Para este estudio se tomó como control negativo células neoplásicas no tratadas.

El comportamiento de la línea celular Daoy tras la exposición a polifenoles presentes en FRPC y FRPP a las 6 horas de tratamiento fue de 74 y 79.91 % de proliferación. Mientras que para la exposición a antocianinas en las mismas células fue de 71.30 y 77.91 %, respectivamente.

Por otro lado, a las 12 horas de exposición al tratamiento, se observó una disminución en el porcentaje de proliferación celular con respecto al tiempo anterior (59.06, 65.62, 58.51 y 61.73 % para FRPC, FRPP, FRAC y FRAP, respectivamente).

Durante la exposición a 24 horas de FRPC y FRPP vs FRAC y FRAP se observaron porcentajes de proliferación celular de 63.18 y 71.84 % vs 62.97 y 57.58 %, respectivamente. Finalmente, a 48 horas se observó que el porcentaje de proliferación celular para la FRPC, FRPP, FRAC y FRAP fue de 59.58, 65.06, 56.05 y 49.34 %, respectivamente. Después de la exposición al tratamiento por 72 horas se observó que mientras para FRAC, FRAP y FRPC disminuía el porcentaje de proliferación celular (50.11, 48.77 y 56.93 %), la FRPP mostraba un ligero aumento (68.03 %).

De manera interesante se pudo observar que la mayor parte del porcentaje de disminución en viabilidad fue mostrada por la línea Daoy de Meduloblastoma, durante el tratamiento por 6 horas para los diferentes extractos purificados (**Figura 17**).

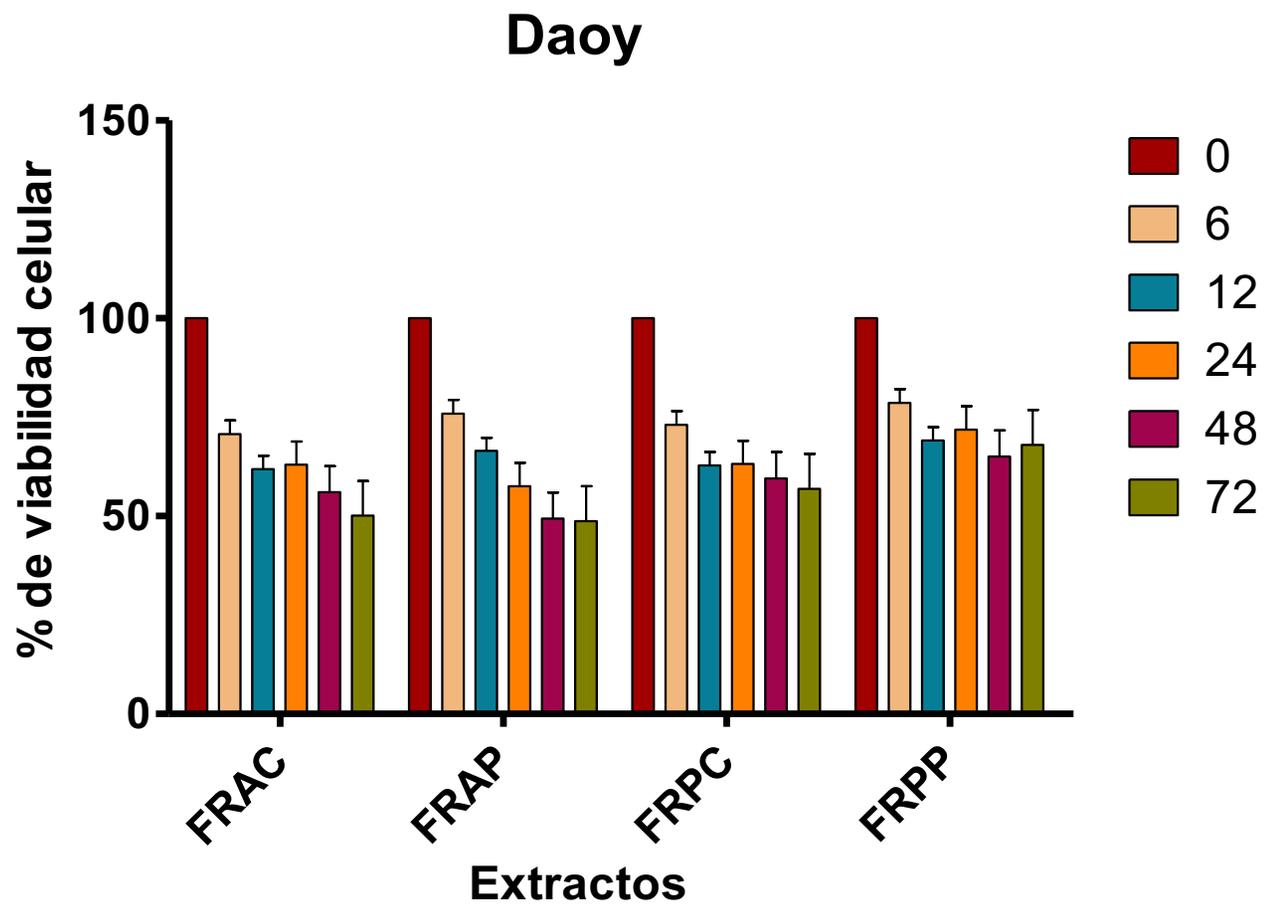


Figura 17. Porcentaje de viabilidad celular en líneas Daoy.

2 **Cáncer Cervicouterino (HeLa)**

En la **Figura 18**, se puede observar los resultados obtenidos de la viabilidad celular de células de cáncer cervicouterino (HeLa), tratadas con las fracciones de FRPC, FRPP, FRAC y FRAP a una concentración de 2 mg/mL de extracto y una confluencia de 96 a 98% tras la exposición al tratamiento durante 6, 12, 24, 48 y 72 horas, tomando como control negativo las células neoplásicas no tratadas.

Para la línea celular HeLa se observó un comportamiento similar al cultivo de células Daoy. La exposición de las células Hela con los diferentes extractos purificados (FRPC, FRPP, FRAC y FRAP) después de 6 horas de tratamiento, mostraron una viabilidad celular de 69.39, 71.68, 67.59 y 61.73 %, respectivamente.

De igual forma se pudo observar una disminución de la viabilidad celular a las 12 horas de exposición con los extractos de polifenoles y antocianinas de maíz criollo azul y tortilla nixtamalizada (55.05, 59.73, 56.78 y 46.70 %, respectivamente, para las diferentes fracciones: FRPC, FRPP, FRAC y FRAP). Sin embargo, para la exposición al tratamiento durante 24 horas se detectó un porcentaje de viabilidad celular de 72.06 % para FRAC, 64.88 % para FRAP, 84.46 % para FRPC y 102.22 % para FRPP (niveles ligeramente mayores a nuestro 100 %).

La exposición de las diferentes fracciones purificadas a 48 horas mostró diferentes comportamientos en viabilidad celular (62.60 %FRAC, 56.10 % FRAP, 72.76 % FRPC y 83.66 % para FRPP). Asimismo, de manera interesante se observó una disminución de la viabilidad celular al tratamiento por 72 horas con las diferentes fracciones purificadas (54.42 % FRAC, 46.58 % FRAP, 58.04 % FRPC, y para FRPP un 62.13 %, respectivamente).

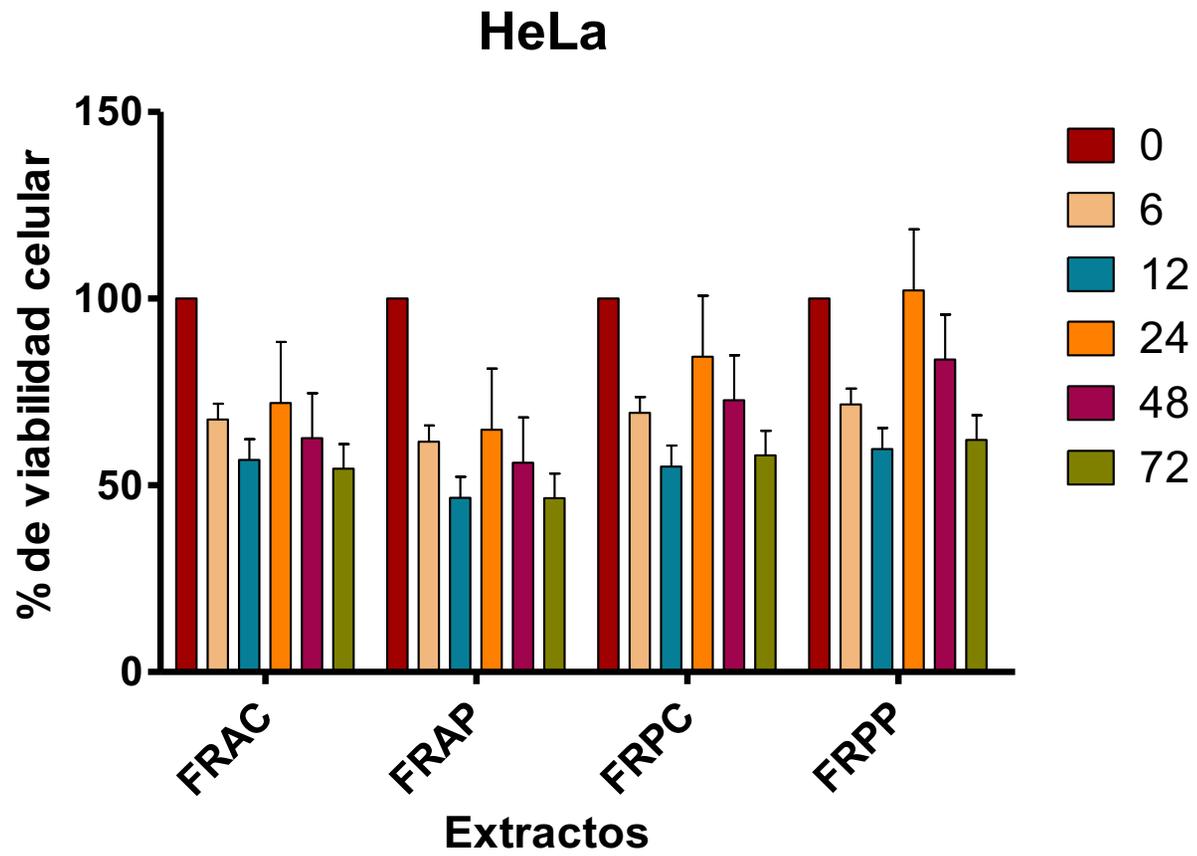


Figura 18. Porcentaje de viabilidad celular en líneas HeLa.

De acuerdo con los resultados obtenidos se observó que para los diferentes tratamientos de exposición, los tiempos de 12 y 72 horas mostrarán un menor porcentaje de viabilidad celular (**Figura 18**).

3 Cáncer de Colon (SW-480)

En la **Figura 19**, se puede observar los resultados obtenidos de la viabilidad celular para células de cáncer de colon (SW-480) tratadas con las fracciones de FRPC, FRPP, FRAC y FRAP a una concentración de 2 mg/mL de extracto y una confluencia de 93 a 98% durante el tratamiento por 6, 12, 24, 48 y 72 horas de exposición. Como control negativo se usó células neoplásicas sin tratamiento.

Para la línea celular SW-480 de cáncer de colon se observaron variaciones en el porcentaje de proliferación celular diferentes a las de Daoy y HeLa. Al tiempo de 6 horas de exposición con los diferentes extractos purificados se obtuvieron porcentajes de 77.84 % para FRPC, 84.16 % para FRPP, 73.13 % para FRAC y 68.58 % para FRAP, respectivamente.

Por otro lado, se observó un ligero aumento de la viabilidad celular a las 12 horas de tratamiento para los extractos de FRPP (89.96%), FRAC (84.6%), y FRAP (82.6%). Caso contrario fue observado para la FRPC (72.4), donde se mostró una disminución. El comportamiento para este tipo de célula fue diferente en comparación con las líneas de Daoy y HeLa. Sin embargo, de manera interesante se observó que el porcentaje de proliferación que había sido aumentado en los 3 extractos anteriores a las 12 horas, a las 24 horas vuelven a disminuir a 79.36 % para FRPP, 73.84 % para FRAC y 73.07 % para FRAP, mientras que para FRPC muestra un aumento a 79.23 %.

A las 48 horas de exposición del extracto con las células, se observa un aumento en la viabilidad celular de 87.74 % para FRPC y 85.23 % para FRPP, mientras en las fracciones ricas en antocianinas en grano de maíz y tortilla se

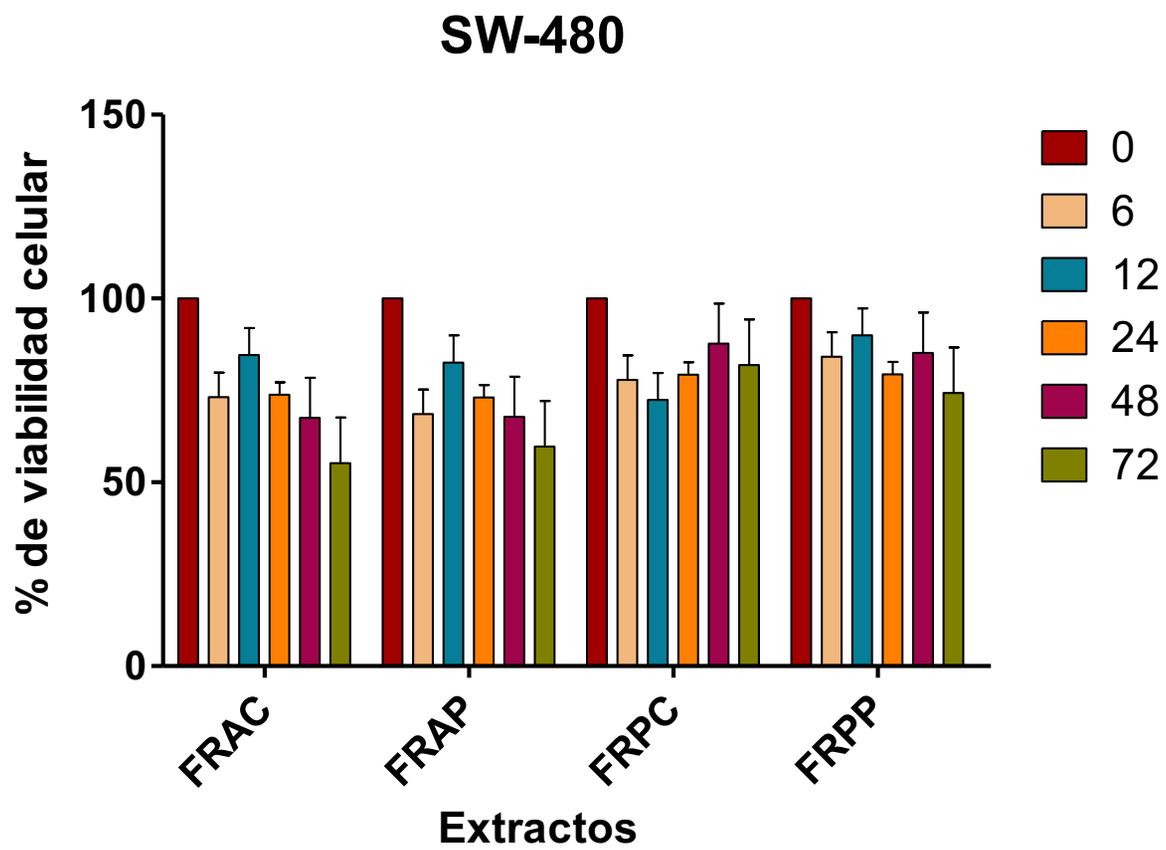


Figura 19. Porcentaje de viabilidad celular en líneas SW-480.

observa una disminución en la viabilidad de 67.54 % para FRAC y 67.77 % para FRAP. Luego de las 72 horas de exposición (extracto + células), se observa un decremento de la viabilidad celular para las fracciones ricas en polifenoles y antocianinas en grano de maíz y tortilla de 81.86 % para FRPC, 74.30 % para FRPP, 55.22 % para FRAC, y 59.72 % en FRAP, respectivamente (**Figura 19**).

d Proliferación Celular

El colorante de formazan se cuantificó usando un espectrofotómetro de exploración múltiple (lector de ELISA), de donde se obtuvieron las unidades de absorbancia (Densidades Ópticas) para cada una de las líneas celulares a diferentes tiempos de exposición a los tratamientos y con base a cada tipo de tratamiento.

1 Meduloblastoma (Daoy)

Tras la aplicación del colorante de formazan (XTT) se obtuvieron absorbancias o densidades ópticas, tanto de células tratadas como no tratadas, tomando éstas últimas como control negativo. Para determinar la proliferación celular se tomaron los tiempos 0, 6, 12, 24, 48 y 72 horas. Los datos fueron analizados con el programa estadístico SPSS con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$.

Cuando se comparan unidades de absorbancia del control negativo en la línea celular Daoy en relación con el tiempo, no se observaron diferencias ($p > 0.05$), lo que indica que con base al tiempo la proliferación celular fue la misma, es decir, no se encontraron diferencias entre un tiempo y otro (**Figura 20**). Sin embargo, se observó que en el tratamiento por 12 horas se da la menor concentración de absorbancia, indicando que durante las primeras horas de aplicación de los diferentes extractos purificados ocurre la mayor disminución en la proliferación celular, para una posterior recuperación de la proliferación celular en la línea Daoy de Meduloblastoma.

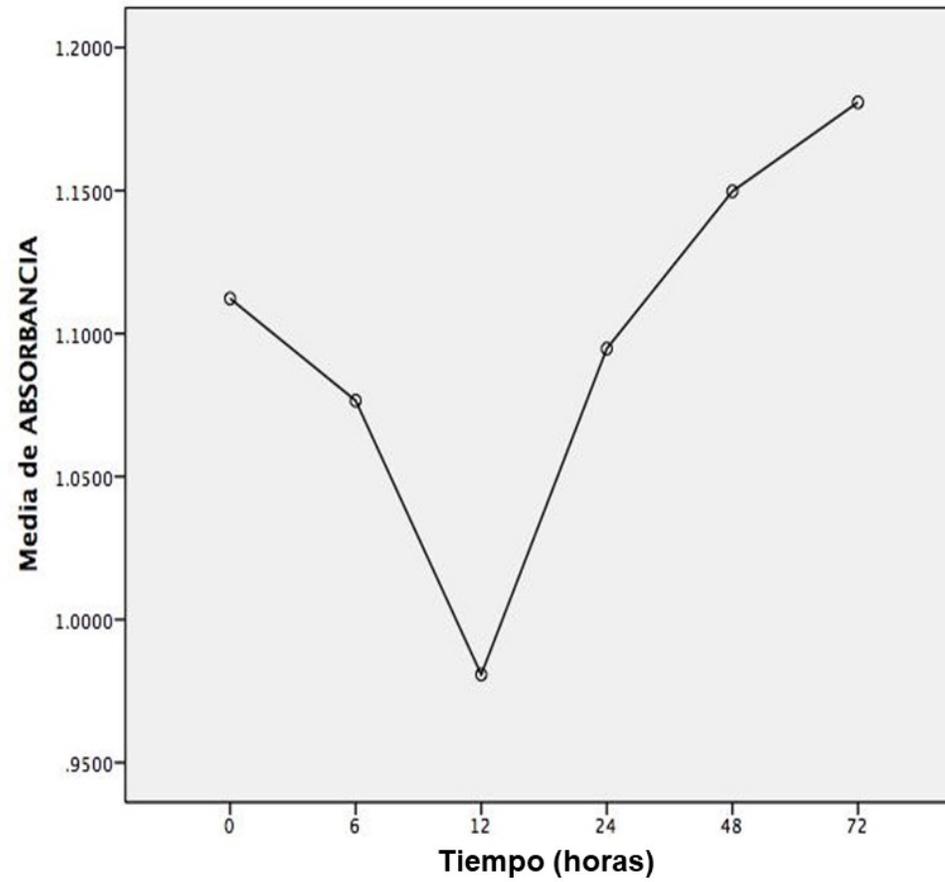


Figura 20. Proliferación celular en líneas Daoy *versus* tiempo.

Por otro lado, cuando se analiza la proliferación celular en relación a los diferentes tratamientos aplicados (FRAC, FRAP, FRPC y FRPP), si se observaron diferencias ($p < 0.001$), lo que indica que existe diferencia entre aplicar o no el tratamiento, tomando como control negativo el tiempo 0 horas (**Figura 21**). Esto demuestra que tras el efecto de los diferentes tipos de tratamientos ocurre una disminución significativa en la proliferación celular de Daoy, permitiendo la muerte celular. Asimismo, se observó que el mayor efecto en la disminución de la proliferación celular fue dado por la fracción rica en antocianinas de tortilla con respecto al tiempo de 0 horas (**Figura 21**).

Al analizar la proliferación celular con base al tiempo de aplicación del extracto y el tipo de extracto, se lograron observar diferencias ($p < 0.001$). Esto nos indica que el aplicar o no los extractos ricos en polifenoles y antocianinas de grano de maíz y tortillas con respecto al control (0 horas), existe una disminución significativa en la proliferación celular de Daoy (**Figura 22**). Además, durante las primeras horas de proliferación celular, los tratamientos de antocianinas y polifenoles de grano de maíz crudo (FRAC y FRPC) muestran una mayor disminución, mientras que después de las 24 horas de exposición a los tratamientos, la FRAP mostró una mayor disminución en la proliferación celular, sin embargo, esta disminución no fue significativa.

2 Cáncer Cervicouterino (HeLa)

Después de obtener las unidades de absorbancia o densidades ópticas tras el efecto de los diferentes tratamientos, y una vez determinado los tiempos para medir proliferación celular (0, 6, 12, 24, 48 y 72 horas), se tomaron los datos de las células tratadas, como de las células no tratadas, éstas últimas tomadas como control negativo a las 0 horas. Los datos fueron analizados con el programa estadístico SPSS con un nivel significativo de $p \leq 0.05$.

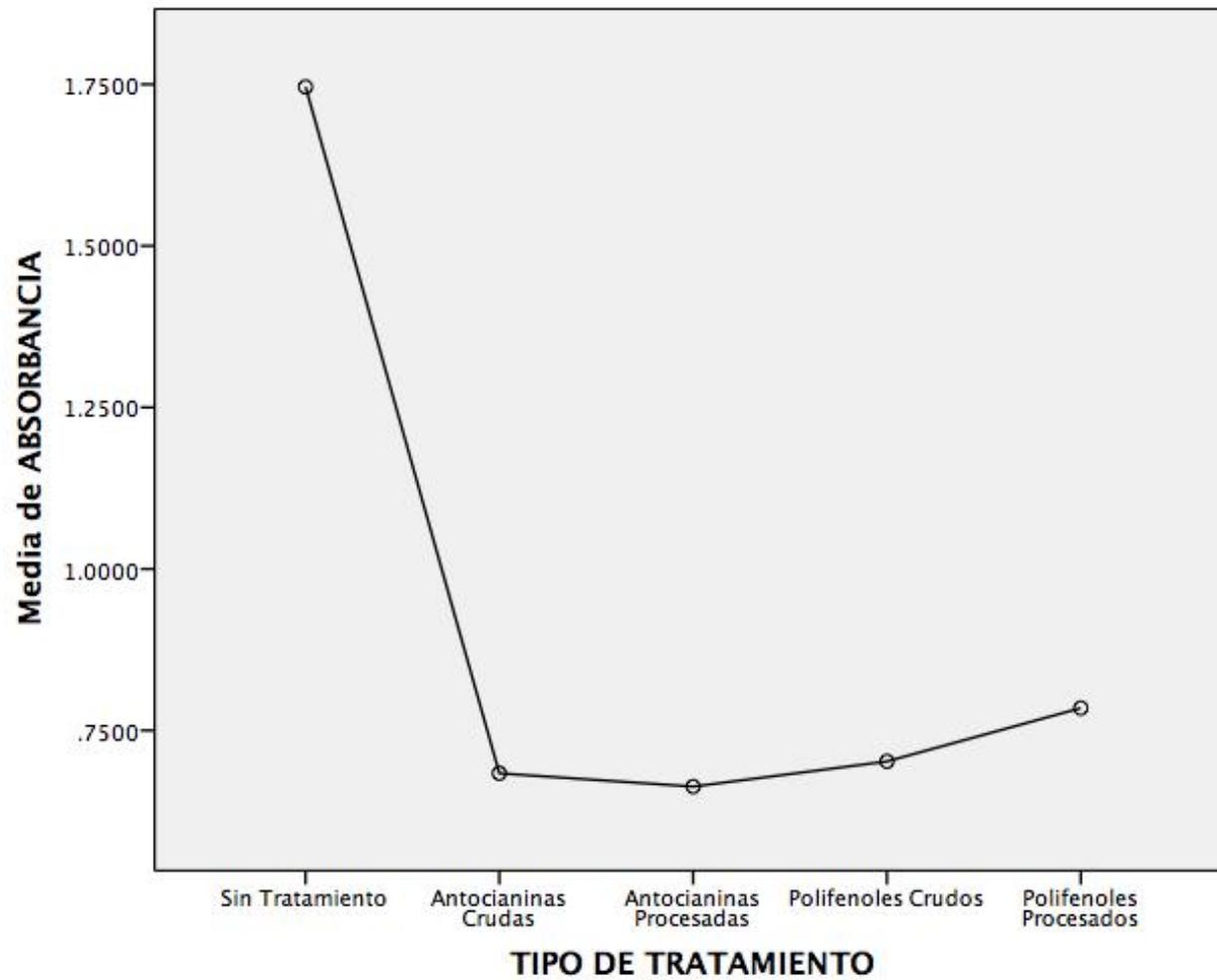


Figura 21. Proliferación celular en líneas Daoy *versus* tratamiento.

La proliferación celular de HeLa en relación con el tiempo de exposición al tratamiento fue diferente ($p < 0.05$). Esto nos indica que existe diferencia entre los tiempos de aplicación de los tratamientos, es decir que la proliferación es significativamente menor antes de 24 horas (**Figura 23**).

Al igual que en la línea celular Daoy, en células HeLa se observó una mayor disminución en la proliferación antes de las 12 horas, siendo los tiempos de 6 y 12 horas diferentes ($p < 0.001$) con respecto a 24, 48 y 72 horas, más no diferentes del control negativo (tiempo 0 horas).

La proliferación celular con relación al tipo de tratamiento (FRAC, FRAP, FRPC y FRPP) mostró diferencias ($p < 0.001$) respecto al control negativo (tiempo 0 horas), es decir, existe diferencia entre aplicar o no el tratamiento en la línea celular HeLa. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre cada uno de los diferentes tratamientos aplicados, lo que indica que tanto las antocianinas y polifenoles del grano de maíz y tortillas muestran el mismo efecto en células neoplásicas (**Figura 24**).

De manera interesante se observa que una vez más los extractos ricos en antocianinas de tortilla (FRAP) presentan una mayor disminución en la proliferación celular, aunque estadísticamente no sea significativo respecto a las otras fracciones purificadas. Esto nos demuestra que el proceso de nixtamalización biotransforma la estructura de la antocianina para hacerla más efectiva frente a este tipo de ensayos.

Tras la medición de las unidades de absorbancia analizadas con relación al tiempo de exposición (6, 12, 24, 48 y 72 horas), y al tipo de extracto aplicado (FRAC, FRAP, FRPC y FRPP) se encontró diferencia ($p < 0.05$) entre extractos (**Figura 25**), indicando diferencias entre el tiempo de aplicación y el tipo de extracto utilizado.

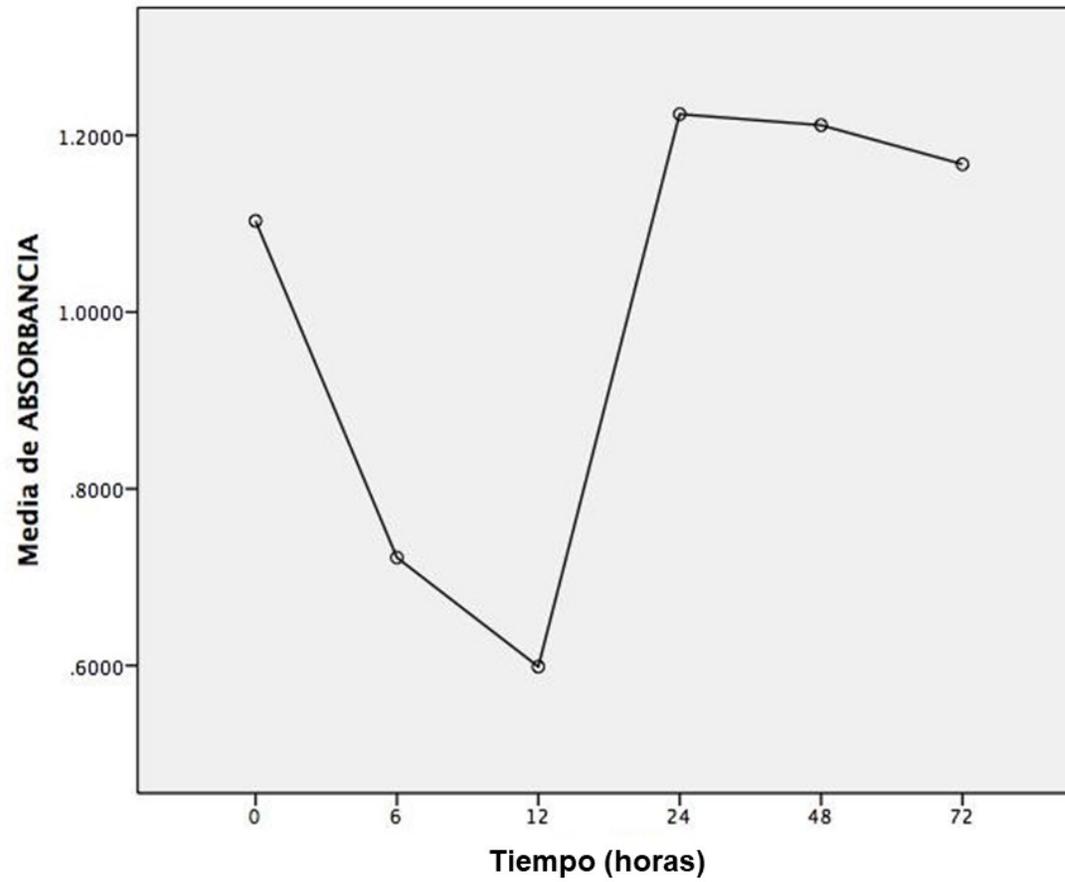


Figura 23. Proliferación celular en líneas HeLa *versus* tiempo.

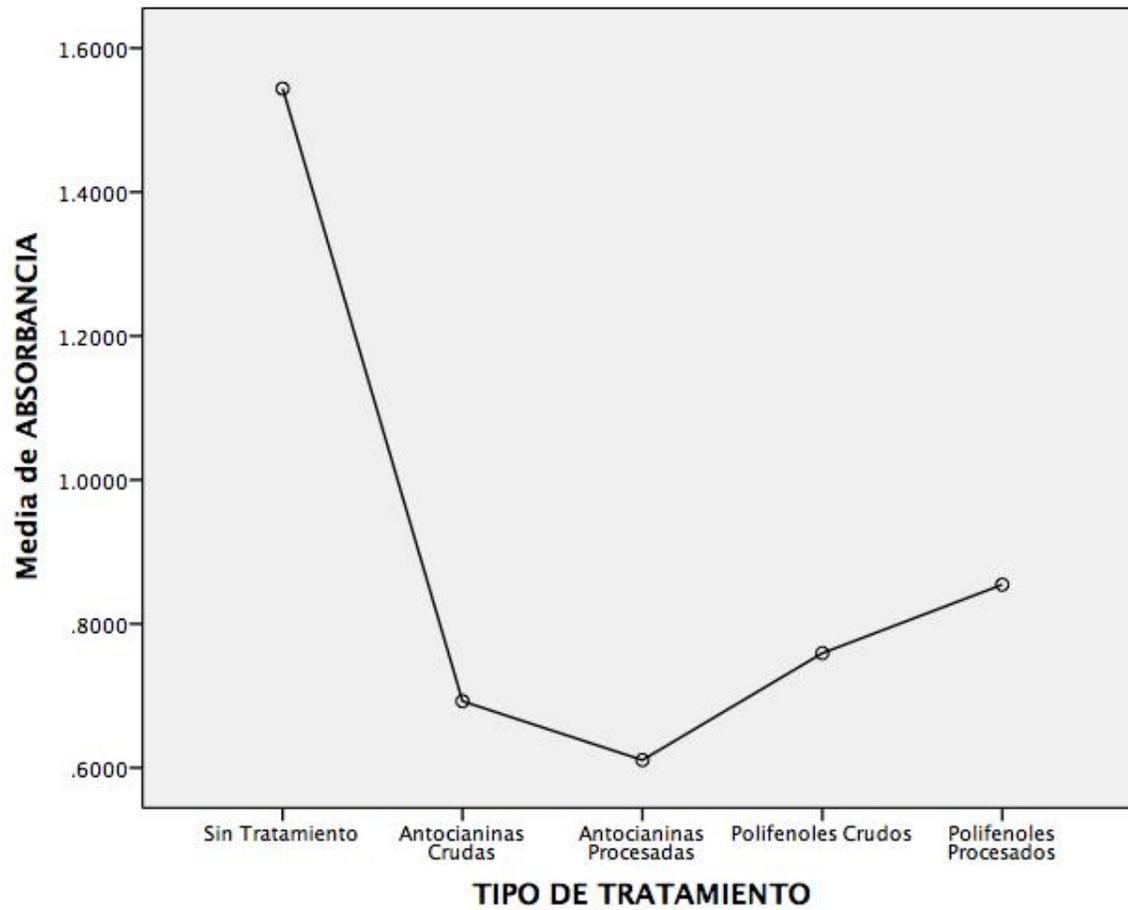


Figura 24. Proliferación celular en líneas HeLa *versus* tratamiento.

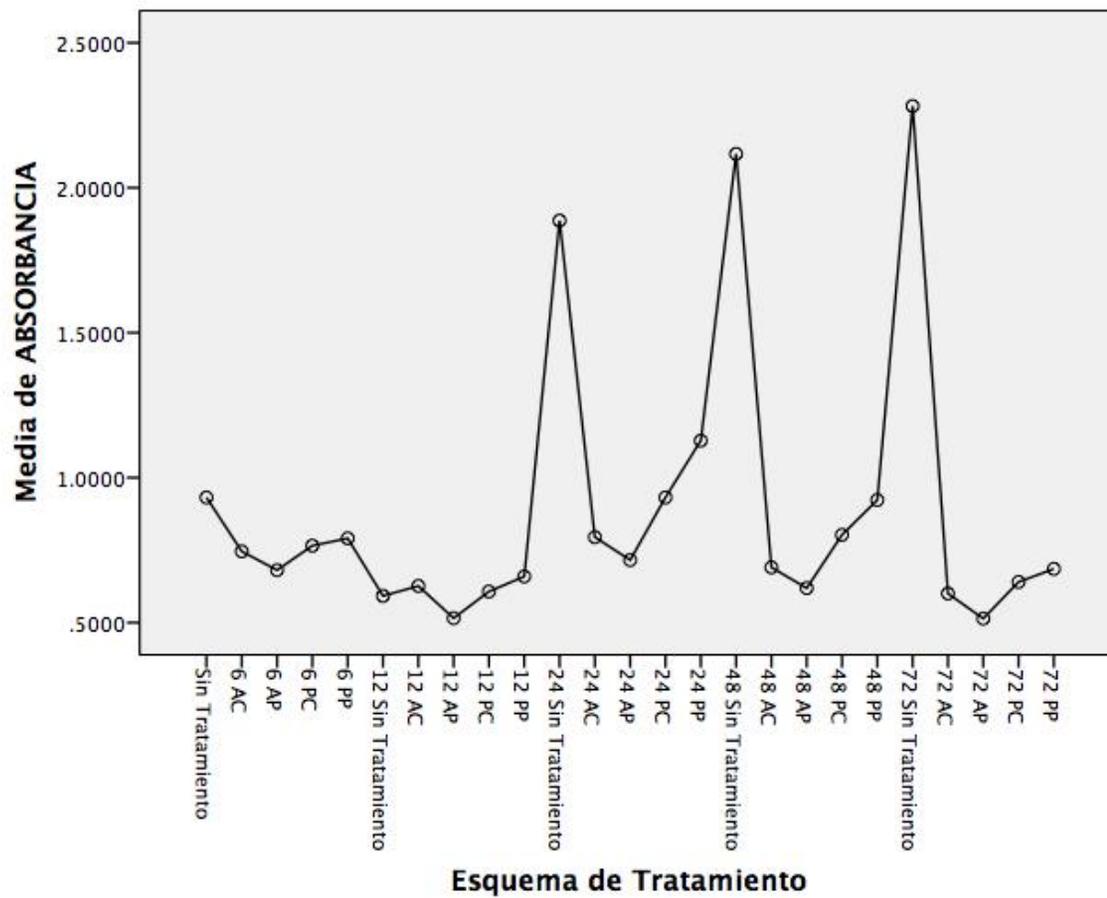


Figura 25. Proliferación celular en líneas HeLa *versus* tiempo y tratamiento.

Se logró observar un menor porcentaje de proliferación a tiempos tempranos (6 y 12 horas) con respecto al control negativo (tiempo 0 horas), para una recuperación posterior a las 24 horas hasta llegar a las 72 horas. A pesar de no encontrar diferencias significativas entre un tipo de tratamiento y otro, se pudo observar a los diferentes tiempos que las antocianinas de tortilla de maíz criollo azul nixtamalizado mostraron una mayor disminución de la proliferación celular en HeLa. Esto demuestra de nuevo el gran efecto que tiene el nixtamalizar el grano de maíz azul para la biotransformación de la estructura de las antocianinas.

3 Cáncer de Colon (SW-480)

Una vez obtenidas las unidades de absorbancia o densidades ópticas de cada uno de los diferentes tiempos de tratamiento para cada uno de los tratamientos aplicados (antocianinas y polifenoles) en las líneas celulares SW-480 de Cáncer de Colon, se procedió al análisis estadístico con el paquete SPSS con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

La proliferación celular en relación al tiempo de exposición al tratamiento (6, 12, 24, 48 y 72 horas) fue significativa ($p < 0.05$) respecto al control negativo (tiempo 0 horas). Esto nos indica que la proliferación se ve afectada a diferentes tiempos de aplicación del tratamiento. Se encontraron diferencias entre el tratamiento de 6 horas con respecto a 48 y 72 horas. A las 6 horas de tratamiento fue donde se observó la mayor disminución de la proliferación celular en SW-480, respecto a los demás tiempos ($p = 0.002$) (**Figura 26**). Además, se pudo observar como después del tratamiento a las 12 horas la proliferación celular siguió aumentando en horas posteriores.

Al igual que en las líneas celulares Daoy y HeLa, SW-480 también mostró diferencias ($p < 0.001$) con base al tipo de tratamiento (**Figura 27 y 28**). Sin embargo, el aplicar o no el tratamiento se encontraron diferencias significativas en 0 horas. De manera interesante, el tipo de extracto utilizado no mostró diferencia significativa.

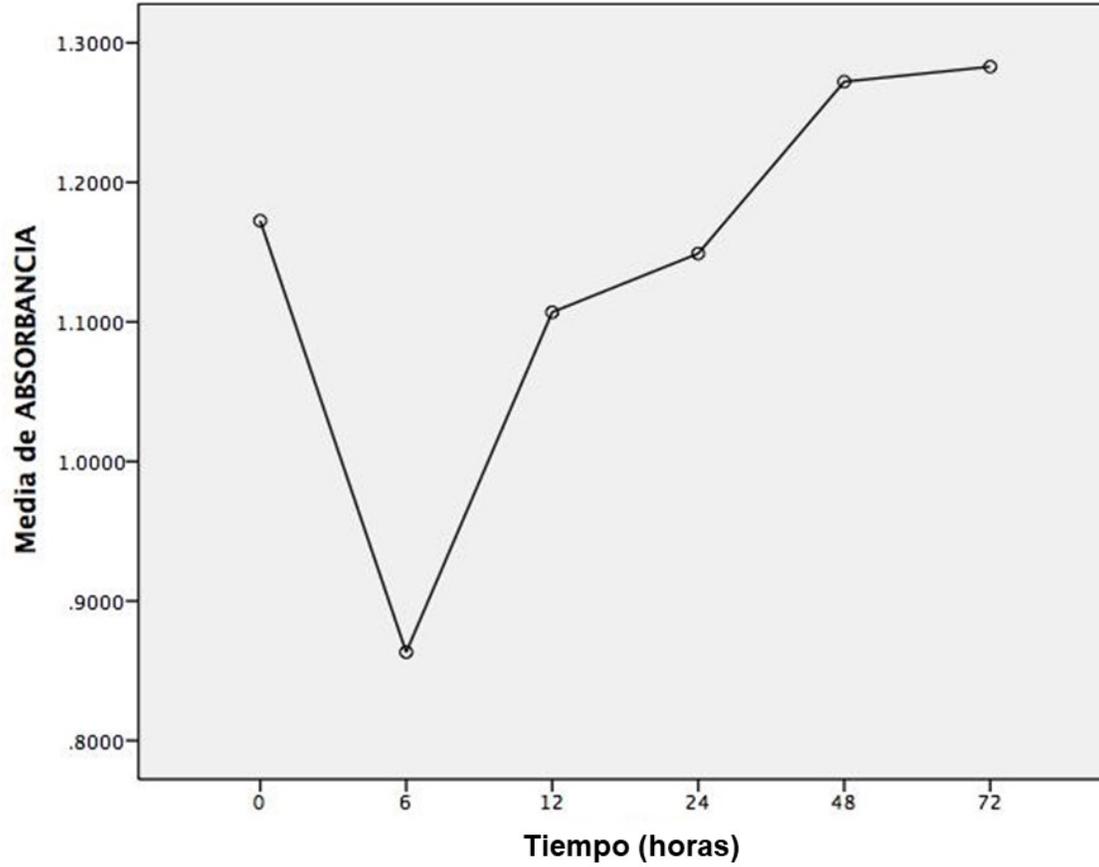


Figura 26. Proliferación celular en líneas SW-480 *versus* tiempo.

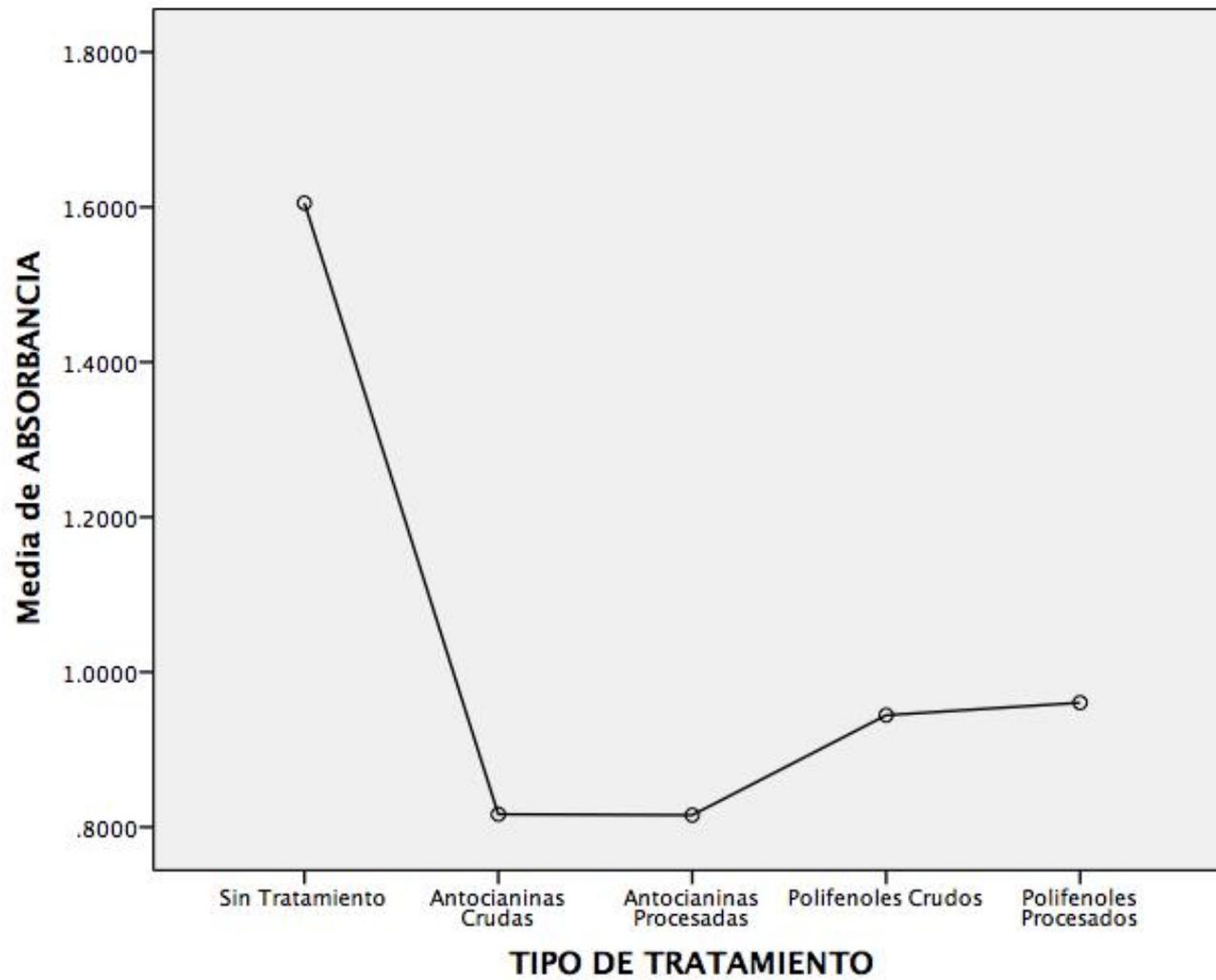


Figura 27. Proliferación celular en líneas SW-480 *versus* tratamiento.

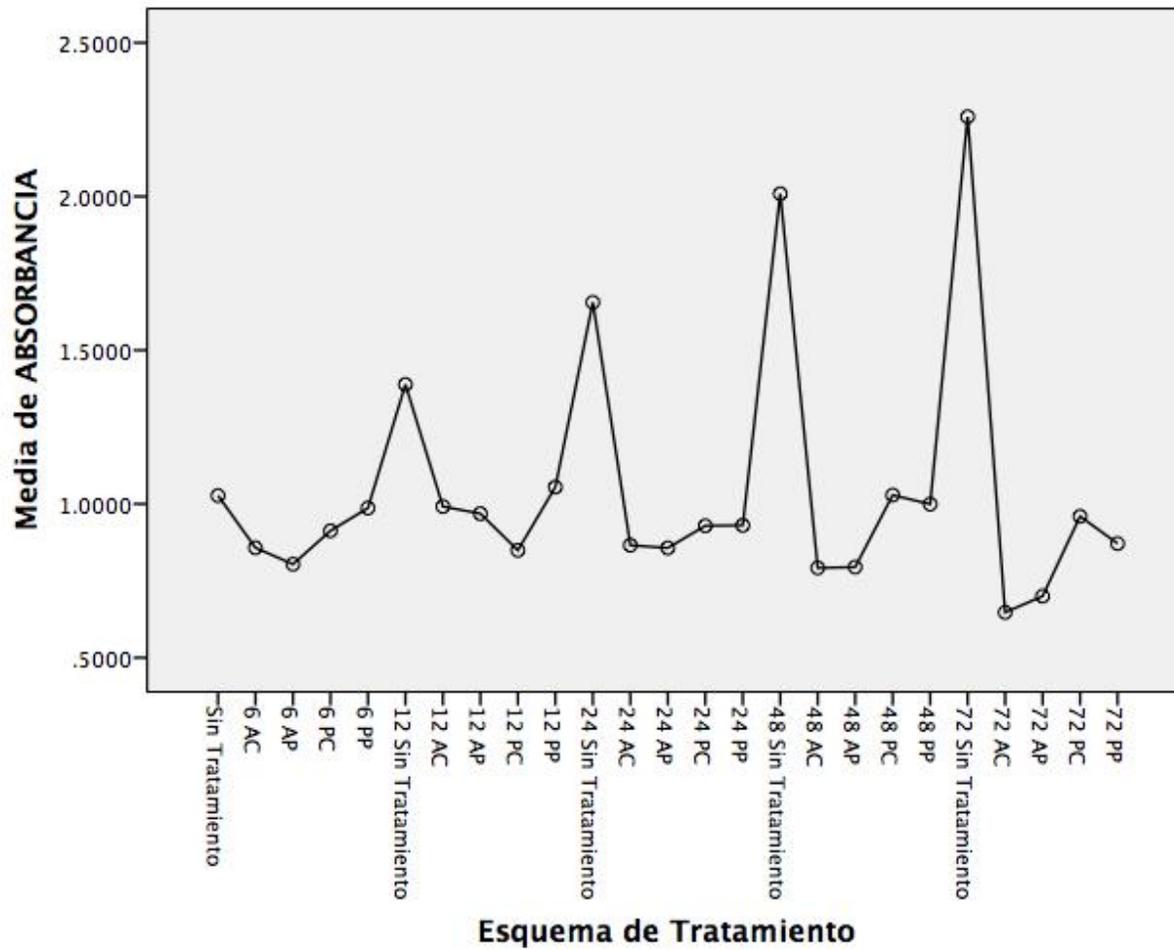


Figura 28. Proliferación celular en líneas SW-480 *versus* tiempo y tratamiento.

De la misma manera se evaluaron las unidades de absorbancia en relación al tiempo de exposición al tratamiento, y a los diferentes tipos de extractos, donde se encontró diferencia ($p < 0.05$) con respecto al control negativo (0 horas) (**Figura 28**).

De acuerdo con el estadístico aplicado (Tukey, $p < 0.001$), entre los tiempos sin tratamientos y el tiempo de 72 horas se encontró diferencia con los extractos de FRAC y FRAP.

La viabilidad y proliferación celular en las líneas de cáncer de meduloblastoma (Daoy), cáncer cervicouterino (HeLa) y cáncer de colon (SW-480) se vio disminuida de forma significativa para los cuatro extractos que probamos a diferentes tiempos. Sin embargo, a la fecha no se tienen suficientes estudios en células Daoy que nos indiquen algún tipo de efecto contrario a los reportados en esta investigación.

En la línea celular HeLa se encontró el 65 % de viabilidad celular en la FRAP, estos resultados coinciden con lo reportado por Dianconasea y col., (2015), quienes encontraron una viabilidad celular cerca del 56 %. Por otro lado, en un estudio con ratones donde se les indujo cáncer de colon (SW-480), se encontró una inhibición dosis-dependiente con antocianinas (especialmente, Peonidina-3-glucósido y un extracto rico de antocianinas obtenido del camote púrpura). Se cree que las antocianinas participan en la modulación del estado antioxidante, y a su vez a la inducción de apoptosis, y la reducción de la proliferación celular (Lim-Souyoung, 2012). Los resultados obtenidos por estos autores coinciden con los obtenidos en esta investigación para la línea celular SW-480 de cáncer de colon.

Existen escasos o nulos estudios sobre los efectos inhibitorios de las antocianinas de maíz azul criollo y tortilla nixtamalizada en el crecimiento de células de cáncer, sin embargo, existen estudios de antocianinas derivadas de otras fuentes con potencial antiproliferativo en células cancerígenas.

Antocianinas de cereza redujeron significativamente la proliferación de líneas celulares HT29 y HCT-116 de cáncer de colon de humanos (Kang y col., 2003; Marko y col., 2004). Por otro lado, el potencial antiproliferativo y anticancerígeno de extractos de varias bayas que contienen diferentes perfiles de compuestos fenólicos (antocianinas, flavonoles y eligataninos) se estudiaron en células de cáncer de colon humano HT-29. Todos los extractos de bayas estudiados disminuyeron la proliferación y el número de células HT-29 en la fase G0/G1 del ciclo celular. Esto se correlacionó con la concentración de antocianinas, lo que apoya el hecho de que el efecto inhibitorio de los extractos de bayas se basa en la concentración, más que en la composición de antocianinas (Coates y col., 2007, Wu y col., 2007, Johnson y col., 2011; Tramer y col., 2012).

Numerosos estudios han demostrado la actividad antiproliferativa de antocianinas en células cancerosas humanas derivadas de tejidos malignos de diversos orígenes, como mama, pulmón, útero, estómago, sistema nervioso central, vulva, próstata, entre otros (Lazze y col., 2004; Meiers y col., 2001; Olsson y col., 2004; Zhang y col., 2005; Tramer y col., 2012). Por otro lado, en otros estudios se pudo demostrar que las antocianinas fueron potentes y selectivas para inhibir también la proliferación de células de leucemia promielocítica humana (Feng y col., 2007; Hou y col., 2003; Katsube y col., 2003; Tramer y col., 2012).

En nuestro estudio encontramos una disminución de la proliferación celular mayor al 50 % en las líneas celulares Daoy, HeLa y SW-480 durante las primeras horas de exponerlas a fracciones ricas de polifenoles y antocianinas de granos de maíz criollo azul y tortilla nixtamalizada con 2 mg/mL de EL (IC50), destacando un mayor efecto en la fracción de antocianinas derivada de la tortilla nixtamalizada (mayor actividad antiproliferativa), por lo que es conveniente mencionar, que aunque el proceso de nixtamalización afecta la concentración de

ciertos biocompuestos en el maíz criollo azul, también incurre en la biotransformación de componentes con alto potencial antiproliferativo, como lo son las antocianinas de tortilla de maíz criollo azul nixtamalizado.

e Muerte Celular: Apoptosis

Para dar seguimiento fotográfico a los resultados obtenidos para cada línea celular tratada y no tratada, se llevó a cabo la toma de imágenes en microscopio de fluorescencia en el laboratorio de Citogenética del Instituto Nacional de Pediatría en la Ciudad de México.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se pudo observar que existe inducción del mecanismo de muerte celular programada, al menos en la mitad de las células muertas después de la suplementación del tratamiento a una concentración de 2 mg/mL (FRAC, FRAP, FRPC y FRPP), destacando una mayor población de células muertas en la línea celular Daoy de Meduloblastoma que en HeLa de Cáncer Cervicouterino y SW-480 de Cáncer de Colon, por el mecanismo de apoptosis, sin embargo, de acuerdo con la imagen obtenida se pudo observar que existe la presencia de apoptosis en las 3 líneas tratadas. Esto nos permite sugerir que los extractos utilizados en esta investigación inducen el mecanismo de apoptosis (**Figura 29**).

Diversos estudios han probado la actividad antiproliferativa y anticancerígena de antocianinas. La mayoría de estos estudios se han realizado en frutos, hortalizas, leguminosas o cereales, dentro de los cuales destacan los arándanos, frijol negro de soya, papa púrpura, arroz negro (Malik y col., 2003; Lim-Souyoung, 2012; Alhosin y col., 2015; Diaconeasa y col., 2015; Fantini y col., 2015; Ha y col., 2015; Jing y col., 2015; Ko y col., 2015; Lu y col., 2015; Yan-Chen y col., 2015; Chaperalli y col., 2016). Sin embargo, son pocos los estudios que se han encontrado en la literatura, donde se utilizan maíces azules sobre el efecto en alguna línea celular. Reynoso-Camacho (2015) reportó extractos derivados de granos de maíz azul, rojo, amarillo y blanco sobre líneas celulares

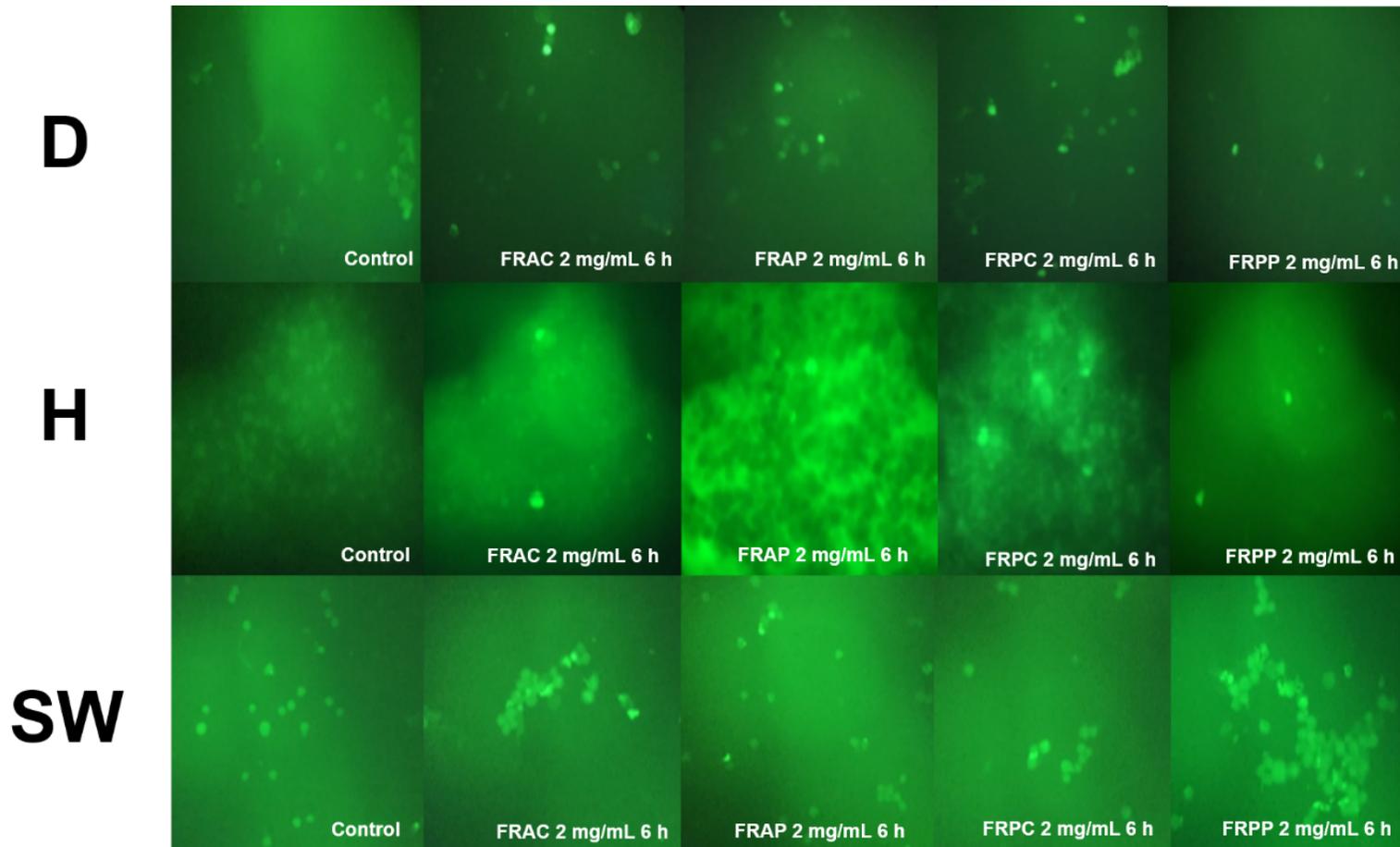


Figura 29. Prueba TUNEL para células Daoy (D), HeLa (H) y SW-480 (SW) *versus* tratamiento.

de carcinoma de colon, encontrando que los polifenoles inducen apoptosis, y esto lo comprobaron observando un menor índice de carcinomas colónicos, después de alimentar modelos murinos con tortillas de maíz ricas en ácidos fenólicos y antocianinas (1.10 a 13.10 mg Cyanidina-3-Glucósido).

Urias-Lugo y col. (2015) utilizó extractos de maíz azul sobre células CaCo, estos autores encontraron inhibiciones del 50 % de la proliferación celular. Solo dos estudios presentan resultados de antocianinas derivadas del maíz azul con efecto antiproliferativo y anticarcinogénico en células de algún tipo de cáncer (Reynoso-Camacho y col., 2015; Urías-Lugo y col., 2015). Esto limita la comparación de los resultados encontrados en esta investigación, pero esto hace que se sigan generando mas información de los efectos que pudieran encontrarse en extractos de maíz azul, sobre todo en tortilla.

Estudios ya reportados revelan que a mayores concentraciones en sus curvas dosis-respuesta, existe un mayor efecto antiproliferativo y anticancerígeno en líneas celulares, como HT-29 y HCT-116 de cáncer de colon, por efecto de ciertos polifenoles y antocianinas derivadas de la delfinidina [delfinidina-3-glucósido, 3-sambubiósido o 3-rutinósido (100 $\mu\text{mol/L}$)] después de 1 hora de incubación (Lim-Souyoung, 2012; Fantini y col., 2015; Ha y col., 2015; Jing y col., 2015; Urías-Lugo y col., 2015; Diaconeasa y col., 2015; Ko y col., 2015; Lu y col., 2015; Lee y col., 2016; 2016; Asadi y col., 2017; Cui y col., 2017; de Sousa y col., 2017; Lippert y col., 2017; Chen y col., 2018 y Fernández y col., 2018).

Alhosin y col. (2015), evaluaron el efecto pro-apoptótico de un extracto de arándanos rico en antocianinas (Antho 50) en células B de pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica (CLL), y sobre células mononucleares de sangre periférica (PBMC), destacando la presencia de delfinidina-3-O-glucósido y la delfinidina-3-O-rutinósido como principales compuestos fenólicos que indujeron un efecto pro-apoptótico. Los autores concluyeron que la apoptosis inducida por Antho 50 está asociada con activación de la caspasa 3, la regulación baja de UHRF1, una rápida desfosforilación de las proteínas reguladoras de Bcl-2, Akt y Bad, y la baja regulación de la proteína Bcl-2, misma que en condiciones de sobreexpresión tiene

un papel central en los defectos de la apoptosis y supervivencia celular (Alhosin y col., 2015). En el mismo contexto, se ha comprobado que el té verde y su componente activo de galato de epigallocatequina (EGCG) inducen apoptosis en células B leucémicas aisladas de pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica (CLL). A bajas concentraciones, el EGCG aumentó significativamente la apoptosis en células de la LLC que implican la regulación negativa de la proteína Bcl-2, la activación de caspasa 3 y la desfosforilación del receptor VEGF (Lee y col., 2004). Por otro lado, la inhibición de la vía endógena del óxido nítrico causando la activación de la caspasa 3 durante la apoptosis se ha sugerido que contribuye a los efectos pro-apoptóticos de los compuestos polifenólicos tales como los derivados del resveratrol y viniferina (Quiney y col., 2004).

De acuerdo con la literatura se han propuesto mecanismos de señalización, en donde se cree que intervienen las antocianinas para desarrollar efectos pro-apoptóticos y de apoptosis (Alhosin y col., 2015; Yan-Chen y col., 2015). Sin embargo, en nuestro estudio no se propuso un mecanismo de acción de los polifenoles y antocianinas. Faltaría por realizar estudios *in vivo* o en tejidos primarios de humanos que corroboren los mecanismos en los cuales se ven implicadas las antocianinas de maíz azul.

Existen escasos o nulos estudios sobre los efectos antiapoptóticos de las antocianinas de maíz azul criollo y tortilla nixtamalizada en el crecimiento de células de cáncer. Sin embargo, extractos ricos de antocianinas de otros frutos y frutillas, como uvas, arándanos y chocoberries han mostrado inhibir el crecimiento de células malignas HT-29 de cáncer de colon (Zhao y col., 2004; Tramer y col., 2012). Efectos similares fueron observados en líneas celulares de cáncer de colon muy alto y bajo de tumor, LoVo/Adr y LoVo. Mientras delphinidina y cianidina fueron citotóxicas y mostraron inducción de apoptosis por parte de la primera, sin embargo no se mostró tal mecanismo (Cvorovic y col., 2010; Tramer y col., 2012).

Otro estudio, *in vivo* en ratones que se les indujo cáncer de próstata fueron tratados con antocianinas de la soya negra de forma oral (8 mg/kg) durante 14 semanas antes de la inoculación. Después de las 2 semanas de tratamiento se

inocularon células de próstata (DU-145) por vía subcutánea para establecer los xenoinjertos tumorales (Ha y col., 2015). Se encontró un aumento significativo de la apoptosis de forma dependiente de la dosis, y una disminución significativa de las expresiones de p53 y Bcl-2 (con un aumento de expresión de Bax) y una disminución significativa del Antígeno Prostático específico (PSA) y las expresiones del Receptor de Andrógenos (AR). Por lo tanto, en el modelo de xenoinjerto, el tratamiento con antocianinas inhibe significativamente el crecimiento del tumor, sugiriendo que las antocianinas de la soya negra inhiben la progresión del cáncer de próstata *in vitro* y en un modelo de xenoinjerto conduciendo directamente a la apoptosis (Ha y col., 2015).

En nuestro estudio encontramos la CI₅₀ % de 2 mg/mL, concentración que permitía la disminución de la viabilidad y proliferación celular en al menos el 50 % de la población celular y una inducción de apoptosis, considerando así, que la curva dosis-dependiente es un parteaguas para próximos estudios.

A pesar de que en nuestro estudio no fue dilucidado el mecanismo de acción de nuestros extractos, cabe destacar que se realizaron todos los ensayos en 3 líneas celulares, meduloblastoma (Daoy), cáncer cervicouterino (HeLa) y cáncer de colon (SW-480) mostrando un comportamiento similar al inducir el mecanismo de apoptosis en las 3 líneas celulares, esto hace pensar que nuestros extractos presentan actividad antiproliferativa y antiapoptótica, presentando un mayor efecto la tortilla de maíz nixtamalizada.

Una de las bondades de nuestro estudio es que se llevó a cabo la estandarización de una curva dosis-respuesta para encontrar la CI₅₀ (2 mg/mL), que permitió asegurar al menos el 50 % de la muerte celular de la población utilizada, así como la estandarización del número de células utilizadas, y los tiempos de medición. Por otro lado, también se llevó a cabo la estandarización del tiempo de incubación (6 horas) para encontrar la mayor población posible de células a la hora de la exposición al tratamiento.

Sin duda alguna, los resultados encontrados en esta investigación abren un camino para otros estudios donde se puede proponer realizar ensayos *in vivo* o en

tejidos primarios para corroborar el efecto de las antocianinas de maíz azul tras el proceso de nixtamalización.

IX. CONCLUSIONES

1. El proceso de nixtamalización es una tecnología aplicada para la obtención de tortillas de maíz azul que a pesar de que influye en la pérdida de componentes, también permite retener ciertos compuestos bioactivos, entre ellos, polifenoles y antocianinas.
2. El contenido de fenólicos totales en la fracción de polifenoles y antocianinas en maíz criollo azul y tortilla nixtamalizada, fue de 15.9 y 51.2, vs 30.42 y 60.1 mg EAG/100 g EL, respectivamente. La transformación del grano crudo en tortilla por nixtamalización tradicional logró incrementar el contenido de fenólicos totales en la tortilla nixtamalizada (90 y 17 %).
3. El contenido de antocianinas totales en la fracción rica en polifenoles y antocianinas en maíz criollo azul y tortilla nixtamalizada, fue de 8.02 y 2.42 vs 6.94 y 3.92 mg EqCy-3-Glu/100 g, EL, respectivamente. La transformación del grano crudo a tortilla, mostró una retención del 86% en el contenido de antocianinas totales para los polifenoles de la tortilla. Efecto contrario fue observado para antocianinas de tortilla, donde se observó un incremento mayor al 60%.
4. La antocianina mayoritaria presente en granos de maíz y tortilla nixtamalizada es la Cianidina-3-Glucósido. Sin embargo, existe una disminución de este biocompuesto tras la cocción por nixtamalización.
5. El proceso de nixtamalización tradicional generó disminución en la capacidad antioxidante por los diferentes métodos químicos (ORAC y ABTS) (75 y 51 %, respectivamente). Sin embargo, la fracción rica en polifenoles mostró incrementos (8.7 y 7.5%) de esta propiedad en tortilla.
6. Se encontró la Cl_{50} (2 mg/mL) de extractos de polifenoles y antocianinas en granos de maíz azul y tortilla nixtamalizada en líneas celulares Daoy, HeLa y SW-480, lo que sugiere actividad anticancerígena.
7. Se observaron disminuciones en la viabilidad y proliferación celular por debajo del 50 % en concentraciones de 2 mg/mL de granos de maíz y tortilla en Daoy y SW-480 a diferencia de HeLa. La tortilla nixtamalizada logró el mayor porcentaje de inhibición.

8. El mayor porcentaje de disminución de la proliferación celular se da en el cambio del tiempo 0 a 6 hrs. La línea celular que presenta mayor disminución en la proliferación celular es Daoy de Meduloblastoma. Las fracciones ricas en antocianinas de tortilla nixtamalizada son las que presentan mayor porcentaje de disminución de la proliferación celular.
9. Existe inducción del mecanismo de muerte celular programada (Apoptosis) al menos en la mitad (50 %) de las células muertas tratadas con fracciones ricas en polifenoles y antocianinas de granos de maíz azul y tortilla nixtamalizada, siendo la tortilla nixtamalizada la que presenta mayor porcentaje de muerte celular (+ 50 %).
10. Los resultados obtenidos en la presente investigación demuestran que los extractos ricos de polifenoles y antocianinas de granos de maíz azul y tortilla nixtamalizada son fuente viable de compuestos bioactivos que inhiben el crecimiento celular, así como, la inducción de apoptosis en líneas celulares de meduloblastoma, cáncer cervicouterino y cáncer de colon, lo que demuestra su actividad anticancerígena.

X PERSPECTIVAS

- ✓ Aumentar la producción de Maíz Criollo Azul en Sinaloa, así como, promover el consumo mayor por la población a manera de prevención de ciertas enfermedades crónicas degenerativas, como lo es el Cáncer.
- ✓ Mejorar el proceso de extracción de las Antocianinas de Maíz Criollo Azul, para aumentar la cantidad obtenida y así asegurar un mejor stock de trabajo.
- ✓ Comprobar que existe una disminución de la Viabilidad Celular, la Proliferación Celular y la Apoptosis *in vivo* en modelos murinos o bien en tejidos primarios de humanos.
- ✓ Crear un suplemento rico en fracciones de Antocianinas que pueda beneficiar la salud de las personas con Cáncer Cervicouterino, Meduloblastoma y Cáncer de Colon.
- ✓ Crear nanopartículas en donde podamos introducir de forma segura un tratamiento terapéutico rico en fracciones de antocianinas de maíz criollo azul como tratamiento paliativo en el proceso cancerígeno de las personas, especialmente en cáncer de niños.

XI BIBLIOGRAFÍA

- A. A. Anton** & F. B. Luciano. INSTRUMENTAL TEXTURE EVALUATION OF EXTRUDED SNACK FOODS: A REVIEW EVALUACIÓN INSTRUMENTAL DE TEXTURA EN ALIMENTOS EXTRUIDOS: UNA REVISIÓN, *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 2007, 5:4, 245-251.
- Adom**, K.F., Liu, R.H. Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, 50, 6182-6187.
- Aguayo**, R.J.; Mora, R.A.; Cuevas, R.E.O.; Serna S.S.O.; Gutiérrez U.J.A.; Reyes, M.C.; Millán C.J. Phytochemicals and Antioxidant Capacity of Tortillas Obtained After Lime-Cooking Extrusion Process of Whole Pigmented Mexican Maize. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2012, 67, 178-185.
- Alberts**, B. *Biología molecular de la célula*; Quinta edición; Ediciones Omega; Cap. 20: 1205-1268; 2010.
- Alhosin**, M.; León-González, A. J.; Dandache, I.; Lelay, A.; Rashid S. K.; Kevers, C.; Pincemail, J.; Fornecker, L-M.; Mauvieux, L.; Herbrecht, R.; Schini-Kerth, V. B.; Bilberry extract (Antho 50) selectively induces redox-sensitive caspase 3-related apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells by targeting the Bcl-2/Bad pathway; *Scientific Reports*. 2015.
- Asaid**, K.; Ferguson, L. R.; Philpott, M.; Karunasinghe, N.; Cancer-preventie properties of an Anthocyanin-enriched sweet potato in the APC^{MIN} Mouse Model; *Journal of Cancer Prevention*. 2017, Vol. 22, No. 3, 2288-3657.
- Ávila**, A. Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). "La Bomba de Obesidad en México". *Ciencia y Tecnología*. 2008, BBC Mundo, Enero.
- Báez-Alvarado**, M. A. Análisis de polimorfismos de un solo nucleótido en el codón 72 de p53; XII jornadas de investigación: *Revista investigación científica*, vol. 4, no. 2, nueva época; Mayo - agosto 2008.
- Barquera**, C. S.; Campos-Nonato, I.; Rojas, R.; Rivera, J. Obesidad en México: epidemiología y políticas de salud para su control y prevención. *Gac Méd de Méx*. 2010; 146: 397-407.

- Barquera, S.;** Campos-Nonato, I.; Hernández-Barrera, L.; Rivera Dommarco, J. Obesidad en adultos. Los retos de la cuesta abajo. Instituto Nacional de Salud Pública, Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, México, 2012.
- Barquera, S.;** Rivera, J.; Campos-Nonato, I. Bases técnicas del Acuerdo Nacional para la Salud Alimentaria. Estrategia contra el sobrepeso y la obesidad. México, DF: Secretaría de salud; 2010.
- Barroso-Mercado, C. E.;** Estado actual del tratamiento en cáncer de pulmón: revisión sistemática de la literatura; Universidad Autónoma del Estado de México; 2014.
- Baublis, E. C.;** Spomer, A.; Berber-Jimenez, M. Anthocyanin pigments: comparison of extract stability. *J. Food Sci.* 1994, 59, 1219-1233.
- Beetstra, S.** Methionine-Dependence Phenotype in the de novo Pathway in BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers with and without Breast Cancer; American Association for Cancer Research; Australia; 2008.
- Bhat, P. L.;** Krishna, K. I.; Pezzuto, M. J. Biological effects of resveratrol. *Antiox. Redox. Sign.* 2001, 3, 1041-1064.
- Birch, J.M.;** Mardsen, H.B.; Morris Jones, P.H.; Pearson, B.; Blair, V. Improvements in survival from childhood cancer: results of a population based survey over 30 years. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1988; 296 (6633):1372-6.
- Boschomar, M. G.;** Alvarez, Y. G.; García, A. M.; Soto, T. N.; Roger, M. C.; Garrote, L. F. Childhood cancer survival. in Cuba. *Eur J Epidemiol.* 2000; 16(8):763-7.
- Boucher, F.** Los productos nutraceuticos. Oportunidades para los recursos naturales autóctonos. El papel de los investigadores. *Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura Centro Regional Andino.* 1999, Fascículo técnico No. 18.
- Bowen, F. C. S.;** Zhang, Y.; Nair, M. G.; Anthocyanin content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties of blackberry and raspberry fruits; *Journal of Food Composition and Analysis.* 2010, 23, 554-560.

- Bressani, R.**, Turcios, J.C. y Reyes, L. Caracterización física y química de harinas industriales nixtamalizadas de maíz de consumo humano en América Central. *Archeology Lat Nutr.* 2001, 51,309-313.
- Burge, R.M.**; Duensing, W.J. Processing and dietary fiber ingredient applications of corn bran. *Cereal Foods World.* 1989, 34, 535-538.
- Campa, D.** The INSIG2 rs7566605 polymorphism is not associated with body mass index and breast cancer risk; BioMed Central; 2010.
- Castillo, L.**; Fluchel, M.; Dabezies, A.; Pieri, D.; Brockhorst, N.; Barr, R. Childhood cancer in Uruguay: 1992- 1994: incidence and mortality. *Med Pediatr Oncol.* 2001; 37(4):400-4.
- Charepalli, V.**; Reddivari, L.; Vadde, R.; Walia, S.; Radhakrishnan, S.; Vanamala, J. K. P. *Eugenia jambolana* (Java Plum) Fruits Extract Exhibits Anti-Cancer Activity against Early Stage Human HCT-116 Colon Cancer Cells and Colon Cancer Stem Cells. *Cancers* 2016, 8, 29.
- Chen, L.**; Jiang, B.; Zhong, C.; Guo, J.; Zhang, L.; Mu, T.; Zhang, Q.; Bi, X.; Chemoprevention of colorectal cancer by black raspberry anthocyanins involved the modulation of gut microbiota and SFRP2 demethylation; *Accepted Manuscript, Royal University.* 2018.
- Chen, X. Y.**; Zhou, J.; Luo, L. P.; Han, B.; Li, F.; Chen, J. Y.; Zhu, Y. F.; Chen, W.; Yu, X. P.; Black Rice Anthocyanins Suppress Metastasis of Breast Cancer Cells by Targeting RAS/RAF/MAPK Pathway; *BioMed Research International.* 2015, 11 pages.
- Cho, J. J.**; Cho, C-L.; Kao, C-L.; Chen, C-M.; Tseng, C-N.; Lee, Y-Z.; Liao, L-J; Hong, Y-R.; Crude aqueous extracts of *Pluchea indica* (L.) Less. Inhibit proliferation and migration of cancer cells through induction of p53-dependent cell death; *BMC Complementary and Alternative Medicine.* 2012, 12:265, 1472.6882.
- Chow, H. H.**; Hakim, I. A.; Vining, D. R.; Crowell, J. A.; Ranger-Moore, J.; Chew, W. M.; Celaya, C. A.; Rodney, S. R.; Hara, Y.; Alberts, D. S. Effects of dosing condition on the oral bioavailability of green tea catechins after single-dose

administration of polyphenon E in healthy individuals. *Clin. Cancer Res.* 2005, 11, 4627-4633.

Clifford, M. N. Anthocyanins: nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* 2000, 80, 1063-1072.

Clifford, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates: nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* 1999, 79, 362-372.

Coates, E. M.; Popa, G.; IR, G. C.; McCann, M. J.; McDougall, G. J.; Stewart, D.; Rowland, I.; Colon-available raspberry polyphenols exhibit anti-cancer effects on *in vitro* models of colon cancer; *Journal of Carcinogenesis.* 2007, 6:4, 1477-3163.

Cook, N.; Samman, S. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *J. Nutr. Biochem.* 1999, 7, 66-76.

Corrales, B.A.B.; Cuevas, R.E.O.; Gutiérrez, U.J.A.; Milán, N.E.M.; Reyes, M.C.; Milán, C.J.; Mora, R.S. Carotenoid composition and antioxidant activity of tortillas elaborated from pigmented maize landrace by traditional nixtamalization or lime cooking extrusion process. *Journal of Cereal Science.* 2016, 69, 64-70.

Coté, J.; Caillet, S.; Doyon, G.; Sylvain, J. F.; Lacroix, M. Analyzing cranberry bioactive compounds. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2010, 50, 872-888.

Creasy, L. L.; Coffe, M. Phytoalexin production potential of grape berries. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 1997, 113, 230-234.

Cuevas-Rodríguez, E. O.; Lila, M. A.; Paredes-López, O. Antocianinas y proantocianidinas de zarzamoras silvestres mexicanas: extracción, caracterización y bioactividad; *Publicia*; 2014.

Cuevas-Rodríguez, E. O.; Dia, V. P.; Yousef, G. G.; García-Saucedo, P. A.; López-Medina, J.; Paredes-López, O.; Inhibition of Pro-inflammatory responses and antioxidant capacity of Mexican blackberry (*Rubus* spp.) extracts; *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58, 9542-9548.

Cui, J.; Chisti, Y. Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: physiological activity, uses and production. *Biotechnol. Adv.* 2003, 21, 109-122.

- D.Crew**, K. Genetic polymorphisms in the apoptosis-associated genes FAS and FASL and breast cancer risk; Department of Medicine and the Herbert Irving Comprehensive Cancer Center; USA; 2007; vol.28 no.12 pp.2548–2551.
- Dai, J.**; Gupte, A.; Gates, L.; Mumper, R. J.; A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: Extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms; *Food and Chemical Toxicology*. 2009, 47, 837-847.
- Dao**, L.; Takeoka, G.; Edwards, R.; Berrios, J. Improved method for the stabilization of anthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46, 3564-3569.
- De Ancos**, B.; Gonzales, E.; Cano, M. Differentiation of raspberry varieties according to anthocyanin composition. *Food Res. Technol.* 1999, 208, 33-38.
- De Bruyne**, T.; Pieters, L.; Deelstra, H.; Vlietinck, A. Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. *Biochem. Sys. Ecol.* 1999, 27, 445-249.
- De la Parra**, P.C., Serna, S.S.O., Liu, R.H. Effect of processing on the phytochemical profiles and antioxidant activity of corn for production of masa, tortillas, and tortilla chips. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, 55, 4177–4183.
- De la Parra**, P.C.; Serna, S.S.O.; Liu, R.H. Effect of processing on the phytochemical profiles and antioxidant activity of corn for production of masa, tortillas, and tortilla chips. *J. Agricultural and Food Chemistry*. 2007, 55, 4177–4183.
- Delgado**, V. F.; Paredes-López, O. Natural Colorants for Foods and Nutraceuticals. Uses. 2003, CRC Press, Boca Ratón. pp: 1-57, 167-182.
- Diaconeasa**, Z.; Leopold, L.; Rugina, D.; Huseyin, A.; Socaciu, C.; Antiproliferative and Antioxidant Properties of Anthocyanin Rich Extracts from Blueberry and Blackcurrant Juice; *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 1, 2352-2365.
- DiMarco-Crook**, C.; Xiao, H.; Cancer Chemoprevention: The Role of Combination Regimens Using Dietary Bioactive Components; *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2015, 6: 505-526.
- Dong-Hyun**, K.; Byung-Keun, Y.; Sang-Chul, J.; Jun-Bo, P.; Sung-Pill, Ch.; Surajit, D.; Jong-Won, Y.; Chi-Hyun, S. Production of a hypoglycemic, extracellular

polysaccharide from the submerged culture of the mushroom, *Phellinus linteus*. *Biotechnol. Lett.* 2001, 23, 513-517.

Dossus, L. Polymorphisms of genes coding for ghrelin and its receptor in relation to anthropometry, circulating levels of IGF-I and IGFBP-3, and breast cancer risk: a case–control study nested within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition; Oxford University Press; USA; 2008; vol.29 no.7 pp.1360–1366.

Dragišić, M. J. J.; Milivojević, J. M.; Poledica, M. M.; Nikolić, M. D.; Maksimović, V. M.; Profiling antioxidant activity of two primocane fruiting red raspberry cultivars (Autumn bliss and Polka); *Journal of Food Composition and Analysis.* 2013, 31: 173-179.

Duthie, S.; Berry phytochemicals, genomic stability and cancer: Evidence for chemoprotection at several stages in the carcinogenic process; *Mol. Nutr. Food Res.* 2007, 51, 655-674.

Eckhoff, S. R.; Paulsen, M. R.; Yang, S. C. Maize. En: Caballero B, Trugo L. C., Finglas P. M. (Eds). *Encyclopedia of Food Sci. Nutr.* RU, *Elsevier Sci.* 2003, Ltd 6: 3647-3653.

Fajardo-Gutiérrez, A.; Mejía-Aranguré, J.M.; Hernández-Cruz, L.; Mendoza-Sánchez, H.F.; Garduño-Espinosa, J.; Martínez-García, M.C. Epidemiología descriptiva de las neoplasias malignas en niños. *Rev Panam Salud Pública* 1999; 6:75-88.

Fang, J.; Seki, T.; Maeda, H. Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2009, 61, 290-302.

Fantini, M.; Benvenuto, M.; Masuelli, L.; Frajese, G. V.; Tresoldi, I.; Modesti, A.; Bei, R.; *In Vitro* and *in Vivo* Antitumoral Effects of Combinations of Polyphenols, or Polyphenols and Anticancer Drugs: Perspectives on Cancer Treatment; *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16, 9236-9282.

FAO/WHO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Organización Mundial de la Salud. 2010. <http://www.who.int/topics/cancer/es/index.html>.

- FDA.** Food and Drugs Administration. Overview of dietary supplements. 2011. <http://www.fda.gov/Food/DietarySupplements/ConsumerInformation/ucm110417.html>.
- FERNANDES, A.;** PESCI-FELTRI, A.; GARCÍA F. I.; GUIDA, V.; SALAZAR, J. M.; RODRÍGUEZ, C.; KASR, E.; BLANCH, R.; CORRENTI, M. EVALUACIÓN DE LA INFECCIÓN POR VIRUS DE PAPILOMA HUMANO EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA. *Revista Venezolana de Oncología*. 2015, 22-29.
- Fernandes, I;** Faria, A.; Azevedo, J.; Soares, S.; Calhau, C.; De Freitas, V.; Mateus, N.; Influence of Anthocyanins, Derivative Pigments and Other Catechol and Pyrogallol-Type Phenolics on Breast Cancer Cell Proliferation; *J. Afric. Food Chem*. 2010, 58, 3758-3792.
- Fernández, J.;** García, L.; Monte, J.; Villar, C. J.; Lombo, F.; Functional Anthocyanin-Rich Sausages Diminish Colorectal Cancer in an Animal Model and Reduce Pro-Inflammatory Bacteria in the Intestinal Microbiota; *Genes*. 2018, 9, 133.
- Fernandez-Panchon, M. S.;** Villano, D.; Troncoso, A. M.; Garcia-Parilla, M. C. Antioxidant activity of phenolic compounds: from *in vitro* results to *in vivo* evidence. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. 2008, 48, 649-671.
- Grace, M. H.;** Ribnicky, D. M.; Kuhn, P.; Poulev, A.; Logendra, S.; Yousef, anthocyanin-rich formulation from lowbush blueberry, *Vaccinium angustifolium* Aiton. *Phytomedicine*. 2009, 16, 406-415.
- Guerrero, V. M. G.;** Loarca-Piña, M.G. F.; Mendoza, D. S. O.; Ramos, G. M.; Reinoso, C. R.; Figueroa, C. J. de D.; Efecto del consume de tortilla de maíz pigmentado (*Zea mays* L.) en indicadores de riesgo de cancer de colon; *Rev Electrónica de Divulgación de la Invest. Universidad del SABES*. 2012, Vol. 02, 2007-3542.
- Gutiérrez, J.P.;** Rivera-Dommarco, J.; Shamah-Levy, T.; Villalpando-Hernández, S.; Franco, A.; Cuevas-Nasu, L.; Romero-Martínez, M.; Hernández-Ávila, M. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: *Inst Nac de Salud Pub (MX)*, 2012.

- Gutiérrez, U.J.A., Rojas, G.C., Garcia, L.S., Serna, S.S.O.** Phytochemical analysis of wastewater (nejayote) obtained after lime-cooking of different types of maize kernels processed into masa for tortillas. *J. Cereal Sci.* 2010, 52: 3, 410–416.
- Gutiérrez, U.J.A.; Rojas, G.C.; Garcia, L.S.; Serna, S.S.O.** Phytochemical analysis of wastewater (nejayote) obtained after lime-cooking of different types of maize kernels processed into masa for tortillas. *J. Cereal Sci.* 2010, 52(3): 410–416.
- Guzmán-Maldonado, S. H. y Paredes-López, O.** Biotechnology for the improvement of nutritional quality of food crop plants. En: Paredes-López O (ed). *Molecular Biotechnology for Plant Food Production*. 1999. CRC, Press, Boca Ratón. pp: 553-620.
- Ha, U-S.; Jin, B. W.; Jin, K. S.; Il, Y. B.; Hoo, H. S.; Youl, L. J.; Hwang, T-K.; Wang, S.; Woong, K. S.;** Anthocyaning induces apoptosis of DU-145 Cells *In Vitro* and inhibits Xenograft growth of Prostate Cancer; *Yonsei Med J.* 2015, 56 (1): 16-23.
- Han, J.; Ye, M.; Xu, M.; Sun, J.; Wang, B.; Guo, D.** Characterization of flavonoids in the traditional Chinese herbal medicine by liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chrom. B.* 2007a, 848, 355-362.
- Han, X.; Shen, T.; Lou, H.** Dietary polyphenols and their biological significance. *Int. J. Mol. Sci.* 2007b, 8, 950-988.
- Hannum, M. S.;** Potential impact of strawberries on human health: a review of the science. *Crit. Review Food Sci. Nutr.* 2004, 44, 1-17.
- Harborne, J.** Plant polyphenols. XI. Structure of acylated anthocyanins. *Phytochemistry.* 1964, 3, 151-160.
- Haslam, E.** Plant polyphenols: vegetable tannins revisited. Cambridge University Press, Cambridge, U. K. 1989, pp 230.
- Hou, D-X.; Fujii, M.; Terahara, N.; Yoshimoto, M.;** Molecular mechanism behind the chemopreventive effects of anthocyanidins; *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2004, 2004:5, 321-325.
- IMSS.** Instituto Mexicano del Seguro Social. 2013. <http://www.imss.gob.mx>.

- INCan.** Instituto Nacional de Cancerología. Cancer de colon. 2010. <http://www.incan.gob.mx>.
- Informe sobre el cancer,** WHO, 2014.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática,** 2015.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática.** “ Mujeres y Hombres, México, 2014. <http://www.inegi.gob.mx>.
- Jackman,** R. L.; Yada, R. Y.; Tung, M. A. Speers, R. A. Anthocyanins as food colorants-a review. *J. Food Biochem. Soc.* 1987, 11, 201-270.
- Jing,** P.; Qian, B.; Zhao, S.; Qi, X.; Ye, L.; Giusti, M. M.; Wang, X.; Effect of glycosylation patterns of Chinese eggplant anthocyanins and other derivatives on antioxidant effectiveness in human colon cell lines; *Food Chemistry.* 2015, 172, 183-189.
- Joe,** B.; Vijaykumar, M.; Lokesh, R. Biological properties of curcumin-cellular and molecular mechanisms of action. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2004, 44, 97-111.
- Juranić,** Z.; Žižak, Ž.; Biological activities of berries: From antioxidant capacity to anti-cancer effects; *BioFactors.* 2005, 23, 207-211.
- Jurd,** L. Some advances in the chemistry of anthocyanin-type plant pigments. *Advances Food Res. Suppl.* 1972, 3, 123-142.
- Kader,** F.; Irmouli, M.; Nicolas, J.; Metche, M. Proposed mechanism for the degradation of perlargonidin 3-glucoside by caffeic acid o-quinone. *Food Chem.* 2001, 75, 139-144.
- Kaneno,** R.; Fontanari, L. M.; Santos, S. A.; Di-Stasi, L. C.; Rodrigues-Filho, E.; Eira, A. F. Effects of extracts from Brazilian sun-mushroom (*Agaricus blazei*) on the NK activity and lymphoproliferative responsiveness of Ehrlich tumor-bearing mice. *Food Chem. Toxicol.* 2004, 42, 909-916.
- Ko,** H.; Jeong, M-H.; Jeon, H.; Sung, G-J.; So, Y.; Kim, I.; Son, J.; Lee, S-W.; Yoon, H-G.; Choi, J-C.; Delphinidin sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis, by inducing DR5 and causing caspase-mediated HDAC3 cleavage; *Oncotarget.* 2015, Vol. 6, No. 12.

- Kong, F.** Association of interleukin-10 gene polymorphisms with breast cancer in a Chinese population; *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*; China; 2010.
- Krifi, B.; Chouteau, F.; Boudrant, J.; Metche, M.** Degradation of anthocyanins from blood orange juices. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2000, 35, 275-283.
- La Vechia, C.; Altieri, A.; Tavani, A.** Vegetables, fruits, antioxidant and cancer: a review of Italian studies. *Eur. J. Nutr.* 2001, 40, 261-267.
- Laurence, H. K.; Meyer, K. A.; Jacobs, D. R.** Cereals, legumes and chronic disease risk reduction: evidence from epidemiologic studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 1999, 70, 451S-458S.
- Le, Bourvellec, C.; Guyot, S., Renard, C. M. G.** Non-covalent interactions between procyanidins and apple cell wall material. Part I: Effect of some environmental parameters. *Biochim. Biophys. Acta.* 2004, 1672, 192-202.
- Lee, J.;** Rosaceas products: Anthocyanin quality and comparisons between dietary supplements and foods; *NFS Journal.* 20016, 4, 1-8.
- Lee, S. A.** Cruciferous vegetables, the GSTP1 Ile¹⁰⁵Val genetic polymorphism, and breast cancer risk; *The American Journal of Clinical Nutrition*; 2008; 87:753-70.
- Lim, S.;** Anthocyanin-Enriched purple sweet potato for Colon Cancer prevention; *Department of Human Nutrition, College of Human Ecology*; 2012.
- Lin, B.; Gong, C. C.; Song, H. F.; Cui, Y. Y.;** Effects of anthocyanins on the prevention and treatment of cancer; *British Journal of Pharmacology.* 2017, 174: 1226-1243.
- Lin, K. J.; Weng, S. M.** Chapter 8 "Flavonoids as Nutraceuticals" in *The Science of Flavonoids.* 2006. Groteworld, Ed. Springer, New York, NY. pp 213-238.
- Lippert, E.; Ruemmele, P.; Obermeier, F.; Goelder, S.; Kunst, C.; Rogler, G.; Dunger, N.; Messmann, H.; Hartmann, A.; Endlicher, E.;** *Digestion.* 2017, 95: 275-280.
- Liu, w.; Xu, J.; Liu, Y.; Yu, X.; Tang, X.; Wang, Z.; Li, X.;** Anthocyanins potentiate the activity of trastuzumab in human epidermal growth factor receptor 2-

positive breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*; *Molecular Medicine Reports*. 2014, 10: 1921-192.

Lozano, J. A. *Bioquímica y biología molecular para ciencias de la salud*; Mc Graw Hill; 3ª edición; 2005.

Ma, E. Dietary intake of folate, vitamin B6, and vitamin B12, genetic polymorphism of related enzymes, and risk of breast cancer: a case-control study in Brazilian women; Brazil; 2009.

Maccarone, E.; Maccarone, A.; Rapisarda, P. Stabilization of anthocyanins of blood orange fruit juice. *J. Food Sci.* 1985, 50, 901-904.

Malik, M.; Zhao, C.; Schoene, N.; Guisti, M. M.; Moyer, M. P.; Magnuson, B. A.; Anthocyanin-Rich Extract From *Aronia melanocarpa* E. Induces a Cell Cycle Block in Colon Cancer but Not Normal Colon Cells; *Nutrition and Cancer*. 2003, 46 (2), 186-196.

Markakis, P. Anthocyanins and their stability in food. *Crit. Rev. Food Technol.* 1974, 4, 437-456.

Martínez, J.; Moreno, J. Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochem. Pharmacol.* 2000, 59, 865-870.

Maruti, S. S. MTHFR C677T and postmenopausal breast cancer risk by intakes of one-carbon metabolism nutrients: a nested case-control study; USA; 2009.

Matsuoka, Y., Vigouroux, Y., Goodman, M.M., Sánchez, G.J.J., Buckler, E., y Doebley, J. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceeding of the National Academy of Sciences*. 2002, 99 (6), 6080-6084.

Matthew, E. M. Assessment of Clinical Validity of a Breast Cancer Risk Model Combining Genetic and Clinical Information; *J Natl Cancer Inst* 2010; 102:1618-1627.

Mc Ghie, K. T.; Walton C. M. The bioavailability and absorption of anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* 2005b, 53, 2760-2766.

- McCullough, M. L.** Vitamin D pathway gene polymorphisms, diet, and risk of postmenopausal breast cancer: a nested case-control study; American Cancer Society; USA; 2007; Vol 9 No 1.
- Mendoza-Nuñez, V.M., y Retana-Ugalde, R. 2009.** Estrés oxidativo e inflamación. Primera edición. Universidad Nacional Autónoma de México, 390 pag.
- Milán, C.J., Gutiérrez, D.R., Cuevas, R.E.O., Garzón, T.J.A. y Reyes, M. C.** Nixtamalized flour from quality protein maize (*Zea mays* L). Optimization of alkaline processing. *Plant Foods Human Nutr.* 2004, 59(1), 35-44.
- Milán, C.J., Gutiérrez, D.R., Perales, S.J.X.K., Cuevas, R.E.O., Ramírez, W.B. y Reyes, M.C.** The optimization of the extrusion process when using maize flour with a modified amino acid profile for making tortillas. *Intern J. Food Sci and Technol.* 2006, 41(7), 727-736.
- Milán, C.J., Reyes, M.C., Armienta, R.E., Cárabez, T.A., Mora, E. R.** Psychochemical and nutritional characteristics of extruded flours from fresh and hardened chickpea (*Cicer arietinum* L). *Lebensm Wiss u-Technol.* 2002, 33(3), 117-223.
- Milán, C.J., Reyes, M.C., Camacho, H.I.L., y Rouzaud, S.O.** Optimisation of extrusion process to transform hardened chickpeas (*Cicer arietinum* L) into a useful product. *J. Sci Food Agric.* 2002, 82, 1718-1728.
- Milán-Carrillo, J., Montoya-Rodríguez, A., Gutiérrez-Dorado, R., Perales-Sánchez, X., Reyes-Moreno, C.** Optimization of extrusion process for producing high antioxidant instant amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) flour using response surface methodology. *Appl Math.* 2012a, 3, 1516-1525.
- Mora, R.S, Gutiérrez, U.J.A., Serna, S.S.O., Sánchez, P.P., Reyes, M. C., Milán, C.J.** Phenolic content and antioxidant activity of tortillas produced from pigmented maize processed by conventional nixtamalization or extrusion cooking. *Journal of Cereal Science.* 2010, 52, 502-508.
- Mora, R.S.; Gutiérrez, U.J.A.; Serna, S.S.O.; Sánchez, P.P.; Reyes, M. C.; Milán, C.J.** Phenolic content and antioxidant activity of tortillas produced from pigmented maize processed by conventional nixtamalization or extrusion cooking. *J. Cereal Sci.* 2010, 52, 502-508.

- Mora, R.S.;** Gaxiola, C.N.; Gutiérrez, U.J.A.; Milán, C.J.; Milán, N.E.M.; Reyes, M.C.; Serna, S.S.O.; Cuevas, R.E.O. Effect of traditional nixtamalization on anthocyanin content and profile in Mexican blue maize (*Zea mays* L.) landraces. *LWT- Food Science and Technology*. 2016, 68, 563-569.
- Murias, N.;** Pérez, L.; Corzo, L. Evaluación nutricional antropométrica y hábitos obesogénicos en adolescentes que asisten a un colegio del partido de San Fernando. Instituto Universitario de Ciencias de la Salud Fundación H. A. Barceló, Facultad de Medicina, Licenciatura en Nutrición. 2011; 1-79.
- Naczk, M.;** Shahidi, F. Extraction and analysis of phenolics in foods. *Review. J. Chromatography A*. 2004, 1054, 95-111.
- Nandakumar, V.;** Sing, T.; Katiyar, K. S.; Multi-targeted prevention and therapy of cancer by proanthocyanidins. Mini-review. *Cancer Letters*. 2008, 269, 378-387.
- Nan, L. J.;** Sup, L. W; Nagappan, A.; Chang, S-H.; Hyun, C.Y.; Jung, K. H.; Sup, K. G.; Ho, R. C.; Chul, S. S.; Jung, J-M.; Chan, H. S.; Anthocyanins from the fruit of *Vitis coignetiae* pulliat potentiate the cisplatin activity by inhibiting PI3K/Akt signaling pathways in human Gastric Cancer cells; *Journal of Cancer Prevention*. 2015, Vol. 20, No. 1, 2288-3649.
- Nichenametla, S. S.;** Taruscio, G. T. A review of the effects and mechanism of polyphenolics in cancer. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. 2006, 46, 161-183.
- Osuna-Gallardo, E. I.;** Morá-Rochín, S.; Montoya-Rodríguez, A. Perfiles y niveles de fitoquímicos en maíces (*Zea mays* L.) criollos Amarillo y rojo. Efecto del procesamiento sobre su capacidad antioxidante. 2015.
- Paredes-López, O.;** Guevara-Lara, F.; Bello-Pérez, L. Los alimentos mágicos de las culturas indígenas mesoamericanas. Capítulo II. Fondo de la Cultura Económica. ISBN 968-16-7567-3. Primera edición. La ciencia para todos. 2006, pp 16-53.
- Pérez, U.J.H.;** Mora, R.S.; Gutiérrez, D.R. Optimización del Proceso de Extrusión sobre la Capacidad Antioxidante de Tortillas de Maíz Criollo Azul del Estado de Sinaloa. Tesis de licenciatura ya publicada. Universidad Autónoma de Sinaloa. 2014.

- Poei-Langoston, M.;** Wrolstad, R. Color degradation of ascorbic-anthocyanin-flavanol model system. *J. Food Sci.* 1981, 46, 1218-1222.
- Racette, S. B.;** Deusinger, S. S.; Strube, M. J.; Hightein, G.R.; Deusinger, R. H. Weight changes, exercise, and dietary patterns during Freshman and sophomore years of college. *J Am Coll Health.* 2005, 53(6): 245-251.
- Raskin, I.;** Ribnicky D. M.; Komarnytsky, S.; Nebojsa, I.; Poulev, A.; Borisjuk, N.; Brinker, A.; Moreno, D. A.; Ripoll, Ch.; Yakoby, N.; O'Neal, J. M.; Cornwell, T.; Pastor, I.; Fridlender, B. Plants and human health in the twenty-first century. *TRENDS Biotechnol.* 2002, 20, 522-531.
- Redondo, B. S.;** "Modulación de la apoptosis en líneas celulares de cancer de colon mediante compuestos bioactivos"; *Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias.* Trabajo Fin de Máster, Julio 2014.
- Renis, M.;** Calandra, L.; Scifo, C.; Tomasello, B.; Cardile, V.; Vanella, L. Response of cell cycle/stress-related protein expression and DNA damage upon treatment of CaCo2 cells with anthocyanins. *Br. J. Nutr.* 2007. III, 1-9.
- Reuter, S.;** Gupta, Carwal, S.; Chaturvedi, M. M.; Aggarwal, B. B. Oxidative stress, inflammation and cancer: How are they linked?. *Free Radic. Biol. Med.* 2010, 49, 1603-1616.
- Reynoso, C. R.;** Ríos, U. M. C.; Torres, P. I.; Acosta, G. J. A.; Palomino, S. C.; Ramos, G. M.; González, J. E.; Guzmán, M. S. H.; El consumo de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y su efecto sobre el Cáncer de Colon en ratas Sprague-Dawley*; *Agricultura Técnica en México.* 2007, Vol. 33, Núm. 1, p. 43-52.
- Reynoso, C. R.;** Guerrero, V. G.; Figueroa, J. D.; Gallegos, C. M. A.; Mendoza, S.; Loarca, P. G.; Ramos, G. M.; Anticarcinogenic Effect of Corn Tortilla Against 1,2-Dimethylhydrazine (DMH)-Induced Colon Carcinogenesis in Sprague-Dawley Rats; *Plant Foods Hum Nutr.* 2014, Vol. 69 (4), 291-398.
- Rice-Evans, C. A.;** Miller, N. J.; Paganga, G. Structure –antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 1996, 20, 933-956.

- Riles, L. W.;** Sanjay, N. J.; Atten, M. J.; Attar, B. M.; Holian, O. Resveratrol engages selective apoptotic signal in gastric adenocarcinoma cell. *World J. Gastroent*, 2006, 21, 5628-5634.
- Rodriguez-Espitia, S. A.;** Cuevas-Rodríguez, E. O.; Reyes-Moreno, C. Transformación de Maíces (*Zea mays* L) Criollos Rojos en Tortillas. Efecto del Proceso sobre Fitoquímicos. Actividad Antioxidante y Ácidos Grasos. Universidad Autónoma de Sinaloa, Facultad de Ciencias Químico Biológicas. 2014.
- Rodríguez-Saona, L.;** Guisti, M.; Wroslstad, R. Color and pigment stability of red radish and red fleshed potato anthocyanins in juice model systems. *J. Food Sci.* 1999, 64, 451-456.
- Rodríguez-Téllez, M.;** Arguelles, F.; Herrerias, M. J.; Ledro, D. Antiinflammatory agents less dangerous for gastrointestinal tract. *Curren. Pharm. Desing.* 2001, 7, 951-976.
- Roginsky, V.;** Lissi, A. E. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chem.* 2005, 92, 235-254.
- Saad, I.** Cuadernos de Vigilancia Biotecnológica 6. Cereales. Sollerio JL, Castañón R (Eds). CambioTec, México, DF. 1999, pp 15-23.
- SAGARPA.** Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Anuario: 2009. <http://www.sagarpa.gob.mx>.
- Sailendra, N. N.;** Todd, G. T. A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2006, 46, 161-183.
- Sakineh Abbasi;** Estrogen Receptor-Beta Gene Polymorphism in women with Breast Cancer at the Iman Khomeini Hospital Complex, Iran; Abbasi *BMC Medical Genetics* 2010, 11:109.
- Sandstead, H. H.;** Muñoz, J. M.; Jacob R. A.; Kelvay, L. M.; Reck, S. J.; Logan, G. M.; Dintzis F. R.; Inglett G. E.; Shvey, W. C. Influence of dietary fiber on trace element balance. *American J. Clin. Nutr.* 1978, 31, 5180-5184.
- Saura-Calixto, F.** Dietary fiber complex in a sample rich in condensed tannins and uronic acids. *Food Chem.* 1987, 23, 95-103.

- Schafer**, S.; Podstawa, M.; Visioli, F.; Bogani, P.; Muller, W. E.; Eckert, G. P. Hydroxytyrosol-rich olive mill wastewater extract protects brain cells in vitro and in vivo. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 6433-6442.
- Schreckinger**, M. E.; Lotton, J.; Lila, M. A.; Gonzalez de Mejia, E. Berries from South America: a comprehensive review of chemistry, health potential and commercialization. *J. Med. Food.* 2010, 13, 233-246.
- Serrano**, C.; Puupponen-Pimiä, R.; Dauer, A.; Aura, Anna-Marja.; Saura-Calixto, F. Tannins: current knowledge of foods sources, intake bioavalilability and biological effects. *Mol. Nutr. Food Res.* 2009, 53, S310-S329.
- Serratos**, H.J. El origen y la diversidad del maíz en el continente Americano. Segunda Edición Greenpeace. 2012, Pag. 4.
- Silalahi**, J. Anticancer and health protective properties of citrus fruit components. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 2002, 11, 79-89.
- Sishu**, I.; Kaur P. Antimutagenicity of curcumin and related compounds against genotoxic heterocyclic amines from cooked food: the structural requirement. *Food Chem.* 2008, 111, 573-579.
- Sousa**, M. L. F.; Sun, X.; Gouveia, P. M. C.; Zhu, M-J.; Anthocyanins/Anthocyanidins and Colorectal Cancer: What Is Behind the Scenes?; Food Science and Nutrition. 2017, 1549-7852.
- Spada**, D. S.; Nunes de Souza, G.; Bortonoli, V. G.; Henriques, P. A.; Salvador, M. Antioxidant, mutagenic and antimutagenic activity of frozen fruits. *J. Med. Food.* 2008, 11, 144-151.
- SSA**. Secretaria de Salud México. Estadísticas en Salud. 2014. <http://www.salud.gob.mx>.
- SSA**. Secretaria de Salud y Asistencia. Mortalidad de Cáncer en Infantes. 2015.
- Stintzing**, F. C.; Stintzing, A. S.; Carle, R.; Wrolstad, R. E. A novel zwitterionic anthocyanin from evergreen blackberry (*Rubus laciniatus* Wild). *J. Agric. Food Chem.* 2002b, 50, 396-399.
- Surh**, Y. J.; Kundu, J. K.; Na, H. K.; Lee, J. S.; Redox-sensitive transcription factors as prime targets for chemoprevention with anti-inflammatory and antioxidative phytochemicals. *J. Nutr.* 2005, 135, 2993S-3001S.

- Tramer, F.;** Moze, S.; Ademosun, A. O.; Passamonti, S.; Cvorovic, J.; Dietary Anthocyanins: Impact on Colorectal Cancer and Mechanisms of Action; Colorectal Cancer- From Prevention to Patient Care. 2012, 538 pages.
- Turker, N.;** Aksay, S.; Ekiz, I. Effects of storage temperature in the stability of anthocyanins of a fermented black carrot (*Daucus carota.*) beverage: Shalgam. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 3807-3813.
- Ulrika, C. E.** Increased breast cancer risk at high plasma folate concentrations among women with the MTHFR 677T allele; American Society for Nutrition; USA; 2009.
- Urias, L. D. A.;** Heredia, J. B.; Muy, R. M. D.; Valdez, T. J. B.; Serna, S. S. O.; Gutiérrez, U. J. A.; Anthocyanins and Phenolic Acids of Hybrid and Native Blue Maize (*Zea mays* L.) Extracts and Their Antiproliferative Activity in Mammary (MCF7), Liver (HepG2), Colon (Caco2 and HT29) and Prostate (PC3) Cancer Cells; *Plant Foods Hum Nutr.* 2015, Vol. 70 (1), 1-104.
- Urias, P.M.,** Gutiérrez, U.J.A., Preciado, O.R.E., Cruz, M.A., Serna, S.S.O., García, L.S. Nutraceutical profiles of improved blue maize (*Zea mays*) hybrids for subtropical regions. *Journal of Field Crops Research.* 2013, 141,69-79.
- Urias, P.M.;** Gutiérrez, U.J.A.; Preciado, O.R.E.; Cruz, M.A.; Serna, S.S.O.; García, L.S. Nutraceutical profiles of improved blue maize (*Zea mays*) hybrids for subtropical regions. *Journal of Field Crops Research.* 2013, 141, 69-79.
- Vanamala, J.;** Radhakrishnan, S.; Reddivari, L.; Massey, A.; Anthocyanins as Apoptotic Regulators; *Department of Food Science and Human Nutrition.* 2012.
- Velant-Vetschera, K. M.;** Wallenweber, E. Flavones and flavonols. En: Anderson, O. M.; Markham, K. R. Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. Boca Ratón, FL: CRC Press/Taylor & Francis Group. 2006, pp. 618-748.
- Velmerries, W.;** Nicholson, R. Phenolic compounds biochemistry. *Springer* Editorial, Netherlands, UK. 2006, pp 58-62, 235-248.
- Vidal-Millán, S.** Cáncer de Mama Hereditario: Identificación y Elección de Pacientes para Estudio Molecular de los Genes BRCA; Instituto Nacional de Cancerología; México DF; 2008.

- Virgili, F.;** Marino, M. Regulation of cellular signals from nutritional molecules: a specific role for phytochemicals, beyond antioxidant activity. *Free Radic. Biol. Med.* 2008, 45, 1205-1216.
- Visioli, F.;** Borsani, L.; Galli, C. Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of phytochemicals. *Cardiovascular Res.* 2000, 47, 419-425.
- Walter, C. Willett;** Diet and Cancer: One View at the Start of the Millennium; The Ninth AACR American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention; *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* January 2001; Vol.10, 3-8.
- Wang, J.** 5-Lipoxygenase and 5-Lipoxygenase-Activating Protein Gene Polymorphisms, Dietary Linoleic Acid, and Risk for Breast Cancer; *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; Vol 17 (10):2748-54.
- Wang, L-S.;** Stoner, G. D.; Anthocyanins and their role in cancer prevention; *Cancer Lett.*; 2008, 269 (2): 281-290.
- Watson, S.A.** The yellow carotenoid pigments of corn. En W. Hechendorf y J.J. Sutherland, eds. *Proc. Corn. Res. Conf.* 17th. Washington, D.C., Am. Seed Trade Assoc. 1962.
- Whiting, D.** Natural phenolic compounds 1900-2000: a bird's eye view of a century's chemistry. *Natural Prod. Report.* 2001, 18, 583-606.
- Wildman, E. C. R.;** Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods. 2001. CRC Press Boca Ratón. pp 8-25.
- Wildman, E. C. R.;** Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods. Second edition. 2006. CRC Press Boca Ratón. pp 15-62.
- Williams, C. A.;** Flavone and flavonol O-glycosides. En: Anderson, O. M.; Markham, K. R. (edi). *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications.* 2006. CRC Press/Taylor & Francis Group, Boca Ratón, FL. pp. 749-856.
- World Health Organization, WHO,** 2013.
- World Health Organization, WHO,** 2015.

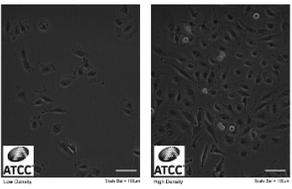
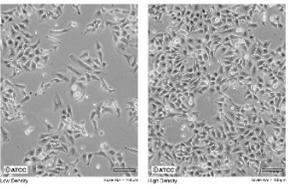
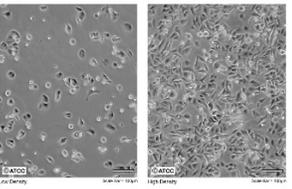
- Wursch, P.;** Saito, M.; Kataoka, S.; Kikuchi, M. Safety evaluation of protoanthocyanidins-rich extract from grape seeds. *Food Chem. Toxicol.* 2002, 40, 499-607.
- Wu-Yang, H.;** Yi-Zhong, C. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutr. Cancer.* 2010, 62, 1-10.
- Xinran Xu t.** A functional 19-base pair deletion polymorphism of dihydrofolate reductase (*DHFR*) and risk of breast cancer in multivitamin users; *American Societ Nutr*; 2007, 85, 1098.
- Ya Jun Hu** and Alan M. Diamond; Role of Glutathione Peroxidase 1 in Breast Cancer: Loss of Heterozygosity and Allelic Differences in the Response to Selenium; Department of Human Nutrition, University of Illinois at Chicago, Chicago, Illinois; 2003.
- Yen-Ling Low.** Implications of Gene-Environment Interaction in Studies of Gene Variants in Breast Cancer: An Example of Dietary Isoflavones and the D356N Polymorphism in the Sex Hormone-Binding Globulin Gene; Medical Research Council Dunn Human Nutrition Unit; United Kingdom; 2006.
- Yi-Ping Fu.** NOTCH2 in breast cancer: association of SNP rs11249433 with gene expression in ER-positive breast tumors without TP53 mutations; Laboratory of Translational Genomics, Division of Cancer Epidemiology and Genetics, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA; 2010.
- Yulin Li.** Oxidative stress-related genotypes, fruit and vegetable consumption and breast cancer risk; Department of Cancer Prevention and Control; USA; 2009.
- Yun, J.M.;** Afaq, F.; Khan, N.; Mukhtar, H. Delphinidin, an anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables, induces apoptosis and cell cycle arrest in human colon cancer HCT116 cells. *Mol. Carcinog.* 2009, 48, 260–270.
- Zakány, J.;** Chihara, G.; Facht, J. Effect of lentinan on the production of migration inhibitory factor induced by syngeneic tumor in mice. *Int. J. Cancer.* 1980, 26, 783-788.

Zhao, C.; Giusti, M. M.; Malik, M.; Moyer, M. P.; Magnuson, B. A.; Effects of commercial anthocyanin-rich extracts on colonic cancer and nontumorigenic colonic cell growth; *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 6122-6128.

Zipprich, J. XRCC1 polymorphisms and breast cancer risk from the New York Site of the Breast Cancer Family Registry: A family-based case-control study; Departments of Environmental Health Sciences, and 1Epidemiology; USA; 2010.

XII ANEXOS

Cuadro 9. Características principales de Daoy, HeLa y SW-480.

Características Generales	Daoy (ATCC® HTB-186™)	HeLa (ATCC® CCL-2™)	SW-480 [SW-480] (ATCC® CCL-228™)
Organismo	<i>Homo sapiens</i> , humano	<i>Homo sapiens</i> , humano	<i>Homo sapiens</i> , humano
Tejido	Cerebro/Cerebelo	Cervix	Colon
Tipo de célula	Células embrionarias derivadas de cerebro/cerebelo	Células epiteliales	Células epiteliales
Morfología	Poligonal	Epitelial	Epitelial
Propiedades del cultivo	Adherente	Adherente	Adherente
Nivel de Bioseguridad	1	2	1
Enfermedad	Meduloblastoma Desmoplásico Cerebeloso	Adenocarcinoma	Enfermedad de Dukes tipo B, Adenocarcinoma Colorectal
Edad	4 años	31 años adulto	50 años
Género	Masculino	Femenino	Masculino
Etnicidad	Caucásica	Afroamericana	Caucásica
Aplicaciones	Esta línea celular es un anfitrión de transfección adecuada	Esta línea celular es un anfitrión de transfección adecuada. Esta línea se puede utilizar para la detección de cepas de <i>Escherichia coli</i> con potencial invasivo.	Esta línea celular es un anfitrión de transfección adecuada. Esta línea tiene una mutación en el codón 12 del proto-oncogén ras y puede usarse como un control positivo para ensayos de mutación de PCR en este codón.
Almacenamiento	Fase de vapor del nitrógeno líquido	Fase de vapor del nitrógeno líquido	Fase de vapor del nitrógeno líquido
Características de origen	Línea celular humana hipertetraploide. La línea celular Daoy fue establecida en 1985 por P.F. Jacobsen del Royal Perth Hospital en Australia Occidental.	100 % de aneuploidía. Su edad clínica es de 31 años mujer afroamericana.	La línea madre es hipotriploide. SW-480 se estableció a partir de una adenocarcinoma primario del colon.
Vista al microscopio	<p>ATCC Number: HTB-186™ Designation: Daoy</p> 	<p>ATCC Number: CCL-2 Designation: HeLa</p> 	<p>ATCC Number: CCL-228 Designation: SW 480</p> 
Método de cultivo	Completo crecimiento en medio EMEN suplementado con Suero Bovino Fetal al 10%	Completo crecimiento en medio EMEN suplementado con Suero Bovino Fetal al 10%	Completo crecimiento en medio L-15 suplementado con Suero Bovino Fetal al 10 %, en una atmósfera de aire libre de gas.
Proporción de Subcultivos	Se recomienda una proporción de subcultivo de 1:4 a 1:6.	Se recomienda una proporción de subcultivo de 1:2 a 1:6.	Se recomienda una proporción de subcultivo de 1:2 a 1:8.
Renovación de medio	2 a 3 veces por semana	2 a 3 veces por semana	1 a 2 veces por semana
Criopreservación	Medio congelado: Completo crecimiento del medio suplementado con DMSO al 5 % (v/v). Temperatura de almacenamiento: fase de vapor del nitrógeno líquido.	Medio congelado: Completo crecimiento del medio suplementado con DMSO al 5 % (v/v). Temperatura de almacenamiento: fase de vapor del nitrógeno líquido.	Medio congelado: Completo crecimiento del medio suplementado con DMSO al 5 % (v/v). Temperatura de almacenamiento: fase de vapor del nitrógeno líquido.
Condiciones de cultivo	Atmósfera: aire, 95 %; Dióxido de Carbono (CO ₂), 5 %. Temperatura: 37°C.	Atmósfera: aire, 95 %; Dióxido de Carbono (CO ₂), 5 %. Temperatura: 37°C.	Atmósfera: aire, 100 %. Temperatura: 37°C.
Tiempo de duplicación de la población	34 horas.	24 hrs.	

XII ABREVIATURAS

AACC	Asociación Americana de Química Clínica
AAFC	Agricultura y Agroalimentación de Canadá
AAPH	2,2-Azobis (2 amidinopropane) diphydrochoride
ADN	Acido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza
AOAC	Asociación de químico analítico oficial
AUC	Área bajo la curva
bs	Base seca
DCFH	Diclorofluoresceína
DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco's
DS	Densidades ópticas
EC	Extracto Crudo
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
EMEM	Medio esencial mínimo de Eagle
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
ET	Equivalente de Trolox
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FL	Flouresceína
FRA	Fracción rica de antocianinas
FRAC	Fracción Rica de Antocianinas Crudas
FRAP	Fracción Rica de Antocianinas Procesadas
FRP	Fracción rica de polifenoles
FRPC	Fracción Rica de Polifenoles Crudos
FRPP	Fracción Rica de Polifenoles Procesados
IC50	Concentración inhibitoria al 50 %
INEGI	Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Información
OMS	Organización mundial de la salud
ORAC	Capacidad de absorción de radicales de oxígeno
MeOH	Metanol acidificado
MS	Espectrometría de masas
PBS	Solución reguladora de fosfatos
pH	Potencial hidrogeno
PM	Peso molecular
ROO	Radicloro peroxilo
SPSS	Programa estadístico versión 22
TUNEL	Marcado final de corte dUTP de terminal deoxinucleotidil transferasa
XTT	Sal de tetrazolio