



ESTUDIOS DE ACTIVIDAD
ANTIINFLAMATORIA,
ANTIOXIDANTE Y CITOTÓXICA DE
COMPUESTOS DE ORIGEN NATURAL



Realizado por Irene Borrero Girón

Departamento de Farmacología

Facultad de Farmacia

Universidad de Sevilla



TRABAJO FIN DE GRADO

Estudios de actividad antiinflamatoria, antioxidante y citotóxica de compuestos de origen natural

Alumna: **Irene Borrero Girón**

Tutora: Elena María Talero Barrientos

Grado en Farmacia

Departamento de Farmacología

Facultad de Farmacia

Universidad de Sevilla

Fecha de presentación: 5 de Julio de 2016

Lugar de presentación: Aula 2.1 de la Facultad de Farmacia

Trabajo de carácter experimental

RESUMEN

Introducción: Actualmente las plantas medicinales constituyen una fuente importante de compuestos para el desarrollo de nuevos fármacos. El género *Garcinia* contiene xantonas, metabolitos secundarios producidos principalmente como mecanismo de defensa, las cuales han demostrado numerosos efectos beneficiosos para la salud que se relacionan con sus propiedades antitumorales, antiinflamatorias y antioxidantes.

Objetivo: Evaluar la actividad citotóxica de la xantona GAG, extraída de *Garcinia achachairu*, sobre las líneas celulares de adenocarcinoma de colon humano HT-29 y de leucemia aguda humana THP-1, así como su actividad antiinflamatoria en macrófagos THP-1 y su acción antioxidante respecto al compuesto ABTS.

Materiales y métodos: En este estudio se utilizó la línea celular monocitaria de leucemia aguda humana THP-1 y línea de adenocarcinoma de colon humano HT-29. Se evaluó la citotoxicidad de la xantona mediante el método de la sulforhodamina B (SRB), la actividad antiinflamatoria mediante la producción de la citocina TNF- α aplicando la técnica ELISA, y la actividad antioxidante mediante la técnica del ABTS con el compuesto Trolox como control positivo.

Resultados y discusión: La xantona en estudio presentó una notable actividad citotóxica sobre las células HT-29, tras 48 y 72 horas de incubación. En cambio, en los macrófagos THP-1 no mostró una citotoxicidad importante. El estudio de la producción de TNF- α evidenció una reducción significativa en los niveles de esta citocina tras el tratamiento con GAG a las dosis de 5 y 10 μ M en macrófagos THP-1 estimulados con LPS. En cuanto a la actividad antioxidante, tras el cálculo de la EC₅₀, se pudo observar una importante actividad para la xantona, en relación al compuesto Trolox.

Conclusiones: Los resultados demostraron la actividad citotóxica, antiinflamatoria y antioxidante de la xantona GAG, sugiriendo el indudable interés de este compuesto como alternativa terapéutica en el tratamiento de patologías inflamatorias y en la prevención del cáncer.

Palabras clave: *Garcinia* spp, *Garcinia achachairu*, inflamación, cáncer de colon, citotoxicidad, antioxidante

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| I. INTRODUCCIÓN..... | 5 |
| 1. El género <i>Garcinia</i> | 5 |
| 1.1. Estudios del género <i>Garcinia</i> en cáncer | 5 |
| 1.2. Estudios del género <i>Garcinia</i> en inflamación | 9 |
| 2. Especie <i>Garcinia achachairu</i> | 10 |
| II. OBJETIVOS..... | 13 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS | 14 |
| 1. Material de estudio..... | 14 |
| 2. Líneas celulares..... | 14 |
| 2.1. Línea monocitaria de leucemia aguda humana, THP-1..... | 14 |
| 2.2. Línea de adenocarcinoma humano, HT29..... | 15 |
| 3. Descongelación de las líneas celulares | 15 |
| 4. Evaluación de la citotoxicidad mediante el ensayo SRB..... | 16 |
| 5. Evaluación de la actividad antiinflamatoria por la técnica ELISA | 17 |
| 6. Evaluación de la actividad antioxidante por el método del ABTS | 20 |
| 7. Análisis estadístico | 20 |
| IV. RESULTADOS | 20 |
| 1. Evaluación de la citotoxicidad..... | 21 |
| 2. Evaluación de la actividad antiinflamatoria..... | 23 |
| 3. Evaluación de la actividad antioxidante | 24 |
| V. DISCUSIÓN | 26 |
| VI. CONCLUSIONES | 30 |
| VII. BIBLIOGRAFÍA | 31 |
| VIII. ABREVIATURAS | 35 |

I.INTRODUCCIÓN

1. El género *Garcinia*

Las plantas pertenecientes a la familia Clusiaceae (Guttiferae) se distribuyen principalmente por las regiones del trópico. Esta familia comprende unos 40 géneros y 1.200 especies, siendo el género *Garcinia* uno de los más numerosos ya que posee alrededor de 400 especies con una amplia distribución en Asia tropical, África, Nueva Caledonia y Polinesia (Niero y cols., 2012; Terrazas y cols., 2013).

La familia Clusiaceae es una fuente muy rica en metabolitos secundarios, entre los que cabe destacar cuatro clases principales de compuestos: xantonas, cumarinas, flavonoides y benzofenonas, producidos principalmente como mecanismo de defensa (De Melo y cols., 2014). El campo de las plantas medicinales juega un papel muy importante en el desarrollo de nuevos fármacos, ya que el uso de sustancias naturales derivadas de plantas atrae mucho la atención para ciertas patologías. Tal es el caso del género *Garcinia*, el cual es conocido por poseer xantonas, tanto oxigenadas como preniladas, benzofenonas y biflavonoides. Este género presenta importantes actividades biológicas, como son actividad antiviral, antiinflamatoria, antitumoral, antimicrobiana, citotóxica y antioxidante (Sun y cols., 2016).

1.1. Estudios del género *Garcinia* en cáncer

Diversos estudios *in vitro* e *in vivo* han evaluado la actividad citotóxica de diferentes especies del género *Garcinia*, los cuales se exponen a continuación y están resumidos en la tabla 1.

La especie ***Garcinia mangostana***, conocida comúnmente como “la reina de las frutas” (Figura 1), es muy utilizada en la medicina tradicional, y por ello ha dado lugar a numerosos estudios destinados al campo de la oncología. Así, datos recientes han demostrado que el α -mangostán, una xantona extraída de la cáscara del fruto de *Garcinia mangostana*, disminuye la viabilidad de la línea celular de cáncer de mama humano T47D, un cáncer agresivo y con diseminación rápida, conocido como “cáncer de mal pronóstico”. El mecanismo de esta xantona consiste en inhibir la proliferación

de esta línea cancerosa por inducción de la apoptosis, mediante la inhibición de las vías de señalización PI3K/Akt y las proteínas cinasas activadas por mitogenos (MAPK) (Kritsanawong y cols., 2016). En cuanto al cáncer de páncreas, α -mangostán ha demostrado que inhibe *in vitro* las líneas tumorales MIAPaCa-2 y BxPC-3, de manera tiempo y dosis dependiente, por fosforilación de cinasas, lo que lleva a la inhibición de las metaloproteinasas de la matriz MMP-2 y MMP-9, enzimas que se encuentran altamente expresadas en este cáncer (Yuan y cols., 2013). Por último, un extracto de *Garcinia mangostana*, que contenía un 81% de α -mangostán y un 16% de γ -mangostán, presentó efectos quimiopreventivos contra la línea celular HCT-116 de carcinoma colorrectal humano, así como en ratones xenógrafos inyectados con dichas células. Estos efectos se debieron a la activación de la apoptosis y la inhibición de la metástasis. En el caso de los ratones, el extracto causó una reducción muy significativa del crecimiento del tumor (Aisha y cols., 2012).



Figura 1. Fruto maduro de *Garcinia mangostana*
(Prathapan y Chaboo, 2009)

En relación a la especie *Garcinia celebica*, se han realizado estudios *in vitro* con su compuesto activo, un triterpenoide tipo lanostano, demostrando que tiene actividad antiproliferativa en una línea celular de adenocarcinoma de mama humano, MCF-7, mediante un mecanismo de activación de la apoptosis por la inhibición de la

proteína oncogénica Akt, involucrada en la supervivencia celular, de manera tiempo y dosis dependiente (Subarnas y cols., 2016)

Un estudio reciente ha evaluado la actividad anticáncer del extracto metanólico del fruto de ***Garcinia Morella*** en el linfoma de Dalton, tanto *in vitro* como *in vivo*. Los resultados muestran que el extracto presenta actividad anticancerosa *in vitro* por inducción de la apoptosis, tanto por activación de las caspasas como por la fragmentación del ADN. Estos datos fueron confirmados en un posterior estudio *in vivo* sobre ratones con linfoma de Dalton que fueron tratados durante diez días con el extracto. En estos animales se observó un aumento en la supervivencia y una disminución del tamaño del tumor, así como la normalización de los parámetros hematológicos y bioquímicos (Choudhury y cols., 2016).

El extracto y las semillas del fruto de ***Garcinia dulcis***, concretamente una acción sinérgica de hidroximetilfurfural y 3-metil-2,5-furanodiona, junto con xantonas y flavonoides, han demostrado propiedades prometedoras en la inducción de la apoptosis en células HepG2 de cáncer de hígado (Bakar y cols., 2015)

En el caso de ***Garcinia cowa***, tanto las xantonas G y H, así como sus 23 análogos aislados de las hojas, indujeron la interrupción del ciclo celular, la apoptosis y la autofagia en diferentes células cancerosas (Xia y cols., 2015).

Tabla 1. Actividad citotóxica de especies del género *Garcinia* en estudios *in vitro* e *in vivo*

| <i>Especie</i> | <i>Compuesto aislado</i> | <i>Modelo</i> | <i>Resultados</i> | <i>Referencia</i> |
|----------------------------|---|--|---|----------------------------|
| <i>Garcinia mangostana</i> | α -mangostán, xantona presente en el pericarpio del fruto | <i>In vitro</i> (línea celular de cáncer de mama humano T47D) | (+) Apoptosis (inhibe señalización PI3K/Akt y las MAPK) | Kritsanawong y cols., 2016 |
| | | <i>In vitro</i> (líneas de cáncer de páncreas: MIAPaCa-2 y BxPC-3) | (-) Expresión de MMP-2 y MMP-9 | Yuan y cols., 2013 |
| | α -mangostán y γ -mangostán, xantonas aisladas del extracto del fruto | <i>In vitro</i> (línea celular HCT-116) / <i>In vivo</i> (ratones xenógrafos) | (+) Apoptosis (-) Metástasis | Aisha y cols., 2012 |
| <i>Garcinia celebica</i> | Triterpenoide tipo lanostano aislado de las hojas | <i>In vitro</i> (MCF-7, línea celular de cáncer de mama humano) | (+) Apoptosis \rightarrow (-) de la proteína oncogénica Akt | Subarnas y cols., 2016 |
| <i>Garcinia morella</i> | Extractos metanólicos de hoja, corteza y fruto | <i>In vitro/ in vivo</i> sobre ratones con linfoma de Dalton | (+) Apoptosis \rightarrow (+) caspasas y fragmentación del ADN | Choudhury y cols., 2016 |
| <i>Garcinia dulcis</i> | Extracto metanólico de las semillas del fruto | <i>In vitro</i> (línea celular HpeG2) | (+) Apoptosis \rightarrow (+) caspasas y fragmentación del ADN | Bakar y cols., 2015 |
| <i>Garcinia cowa</i> | Xantonas (G y H) aisladas del extracto presente en las hojas | <i>In vitro</i> (células cancerígenas: células HeLa, A549, PANC-1 y células de hígado sano: HL-7702) | (+) Apoptosis, y la autofagia (-) Ciclo celular | Xia y cols., 2015 |

1.2. Estudios del género *Garcinia* en inflamación

La inflamación es una respuesta del organismo, el cual responde ante un daño por un agente infeccioso o una lesión celular, donde se producen estados de rubor, calor, dolor y tumor, por ataque de células fagocíticas.

A continuación, se exponen diferentes estudios *in vitro* e *in vivo* que han evaluado la actividad antiinflamatoria de diferentes especies del género *Garcinia* (tabla 2).

En el caso de ***Garcinia mangostana***, se demostró que α -mangostán, además de la actividad citotóxica antes citada, también posee actividad antiinflamatoria, ya que es capaz de disminuir de forma significativa la inflamación a través de la inducción de SIRT-1 (*The Silent Information Regulator-1*). Esta proteína inhibe enzimas proinflamatorias como la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), que activa la producción de óxido nítrico (NO), y la ciclooxigenasa-2 (COX-2), implicada en la síntesis de la prostaglandina E₂ (PGE₂). Así, α -mangostán redujo la expresión de estas enzimas a través de la activación de SIRT-1 en macrófagos estimulados con lipopolisacáridos (LPS) (Franceschelli y cols., 2016).

Los efectos antiinflamatorios del extracto etanólico de ***Garcinia subelliptica*** se evaluaron *in vitro* sobre macrófagos murinos RAW 264 estimulados con LPS, observándose una disminución en los niveles de NO por la modulación de iNOS, al igual que una disminución de la enzima COX-2. Sin embargo, no se observó una disminución notable en la producción del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), de manera que se puede concluir que el extracto etanólico inhibe selectivamente ciertos mediadores proinflamatorios (Cho y Cho, 2016).

La especie ***Garcinia esculenta***, conocida desde hace cientos de años en China por su acción antiinflamatoria, posee una xantona, 1,3,5,7-Tetrahydroxy-8-isoprenylxanthone (TIE), que ha mostrado alta capacidad de inhibición de NO y PGE₂ por una supresión en la expresión de iNOS y COX-2 (Zhang y cols., 2015).

Los efectos antiinflamatorios de las hojas, semillas y la corteza de ***Garcinia gardneriana*** se han evaluado a nivel tópico en un ensayo *in vivo* realizado en ratones a los que se les provocó un edema intenso con aceite de crotón. Este procedimiento da

lugar a la activación de la proteína cinasa C (PKC), y la inducción secundaria de la MAPK y la COX-2, provocando por consiguiente la estimulación de mediadores proinflamatorios responsables del edema. Los datos del estudio mostraron resultados más eficaces y potentes en la reducción del edema, la migración de leucocitos y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) tras el tratamiento con las hojas de esta especie en relación con las semillas y la corteza (Otuki y cols., 2011).

Tabla 2. Actividad antiinflamatoria de especies del género *Garcinia* en estudios *in vitro* e *in vivo*

| Especie | Procedencia del compuesto aislado | Modelo | Resultados | Referencia |
|------------------------------|--|--|---|-----------------------------|
| <i>Garcinia mangostana</i> | α -mangostán aislado del pericarpio | <i>In vitro</i> (monocitos humanos) | (+) SIRT-1 \rightarrow (-) iNOS y COX-2 | Franceschelli y cols., 2016 |
| <i>Garcinia subelliptica</i> | Extracto etanólico | <i>In vitro</i> (macrófagos RAW 264) | (-) iNOS \rightarrow (-) NO | Cho y Cho, 2016 |
| <i>Garcinia esculenta</i> | Xantona TIE | <i>In vitro</i> (macrófagos RAW 264.7) | (-) iNOS \rightarrow (-) NO (-) COX-2 \rightarrow (-) PGE2 | Zhang y cols., 2015 |
| <i>Garcinia gardneriana</i> | Xantonas hidroalcohólicas de hojas, corteza y semillas | <i>In vivo</i> (edemas en ratones) | \downarrow Edema (-) migración de leucocitos (-) ROS | Otuki y cols., 2011 |

2. Especie *Garcinia achachairu*

La especie ***Garcinia achachairu***, conocida en Brasil como "Achachairú", es un arbusto con vistosos frutos que se utiliza en la medicina popular para tratar el reumatismo, la inflamación, el dolor y los trastornos gástricos (Filho y cols., 2013). Esta especie tiene una amplia distribución en la región de Santa Cruz (Bolivia), y está muy adaptada en Brasil donde es fácil de cultivar y cosechar (Niero y cols., 2012; Terrazas y cols., 2013).

Garcinia achachairu contiene distintos compuestos químicos, tales como benzofenonas, xantonas y biflavonoides (Terrazas y cols., 2013), teniendo gran

importancia en la industria farmacéutica por su amplia gama de actividades biológicas (Marques y cols., 2012), incluyendo actividad antioxidante, antiinflamatoria, antimicrobiana y citotóxica. Un estudio previo, que evaluó la composición química de las semillas de los frutos, concluyó que éstas eran la parte más prometedora de la planta en cuanto a componentes se trata (Molin y cols., 2012).

Las benzofenonas son compuestos fenólicos no polares, y son los principales intermediarios en la ruta biosintética de las xantonas, siendo la familia Clusiaceae la única que las produce (Terrazas y cols., 2013).

Las xantonas son metabolitos secundarios naturales que forman una clase importante de heterociclos oxigenados (Figura 2), procedentes de plantas, líquenes, hongos y algunos microorganismos, que tienen gran interés debido a la amplia variedad de actividades biológicas que poseen (Teh y cols., 2013; Xia y cols., 2015). Cabe destacar que existe una relación estructura-actividad; por ejemplo, los derivados de xantonas que llevan sustituyentes tales como diprenil, dipirano y prenil-pirano muestran citotoxicidad en casi todas las líneas celulares de cáncer probadas (Teh y cols., 2013).

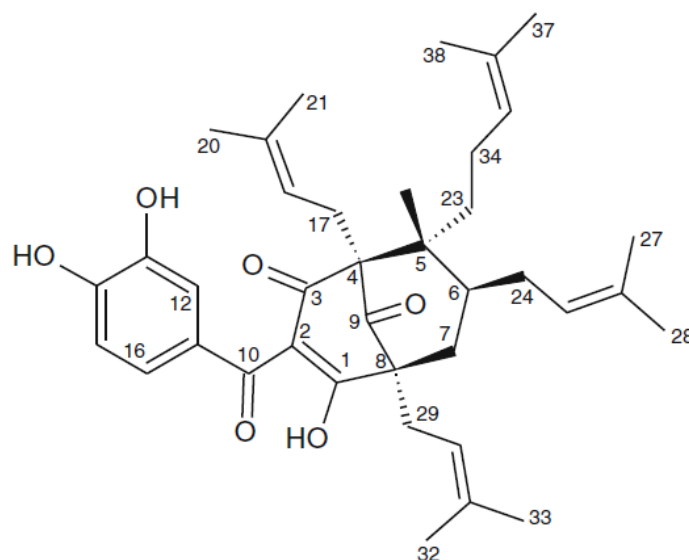


Figura 2. Estructura molecular de gutiferona A aislado de *Garcinia achachairu* Rusby (Terrazas y cols., 2013)

En cuanto a las actividades biológicas de esta especie, cabe destacar un estudio contra la leishmaniosis, en el que se realizó un cribado en busca de moléculas

bioactivas procedentes de plantas brasileñas con múltiples propiedades biológicas entre las que se encontraba *Garcinia achachairu*. Los resultados mostraron que un extracto metanólico de esta especie y un compuesto aislado del mismo, conocido como gutiferona A, procedente de las semillas, hojas y ramas de esta planta presentó una actividad leishmanicida en las formas promastigotes, tanto de *Leishmania amazonensis* como de *Leishmania brasiliensis* (Filho y cols., 2013).

Por otro lado, tanto el extracto metanólico como la gutiferona A, administrados por vía oral e intraduodenalmente, respectivamente, han demostrado una actividad gastroprotectora en ratones con úlceras inducidas por etanol/HCl o indometacina/betanecol. Se observó una mayor actividad en el extracto metanólico de las semillas en relación al componente aislado, siendo la misma dosis-dependiente. Respecto al modelo de secreción gástrica, se apreció una disminución del volumen de jugo gástrico y un incremento del pH gástrico, siendo de nuevo el extracto de semilla el más activo (Niero y cols., 2012).

A pesar de la prometedora actividad de gutiferona A, estudios previos recomiendan precaución en su uso agudo o crónico ya que ha demostrado efectos genotóxicos. En este sentido, la evaluación de la genotoxicidad de gutiferona A aislada de las semillas de *Garcinia achachairu* se realizó en ratones albinos Swiss para determinar los daños en distintas células. Los datos determinaron que dicha benzofenona produce efectos genotóxicos a distintas dosis en leucocitos procedentes de sangre periférica, médula ósea y células testiculares, así como efectos clastogénico/aneugénico en la médula ósea y eritrocitos de ratones (Terrazas y cols., 2013). Sin embargo, el extracto obtenido de la semilla de *Garcinia achachairu* no mostró genotoxicidad ni clastogenicidad en las mismas células (Marques y cols., 2012).

II. OBJETIVOS

El estudio de las plantas medicinales continúa siendo una parte importante en la investigación de nuevos compuestos que puedan dar lugar al desarrollo de fármacos. Entre ellas, cabe destacar el género *Garcinia* y más concretamente, la especie *Garcinia achachairu*, conocida en Brasil como "Achachairú". Esta planta es una rica fuente de xantonas, que presentan una amplia variedad de actividades, incluyendo efectos antioxidantes, antiinflamatorios, antimicrobianos y citotóxicos. Estas propiedades hacen de estos compuestos excelentes candidatos para su uso en el tratamiento de enfermedades de índole inflamatoria, así como en la prevención del cáncer.

Los objetivos específicos planteados en este trabajo son:

1. Evaluar la actividad citotóxica de una xantona extraída de *Garcinia achachairu* sobre la línea celular monocitaria de leucemia aguda humana diferenciada a macrófago THP-1 y sobre la línea de adenocarcinoma de colon humano HT-29, mediante el ensayo de la sulforhodamina B (SRB).
2. Valorar la actividad antiinflamatoria de la xantona en macrófagos THP-1, cuantificando la producción de la citocina proinflamatoria factor de necrosis tumoral- α , mediante la técnica de ELISA.
3. Estudiar la actividad antioxidante de la xantona mediante el método del ABTS, utilizando como control positivo el Trolox, compuesto derivado de la vitamina C.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material de estudio

El material biológico utilizado para la realización de este trabajo se ha obtenido de la especie vegetal *Garcinia achachairu*. Este estudio se encuentra incluido dentro de las actividades desarrolladas dentro del proyecto brasileño RIBECANCER (Red Iberoamericana de Investigación en Cáncer) con el que colabora el grupo FARMOLAP (Farmacología Molecular y Aplicada, Departamento de Farmacología, Universidad de Sevilla). Para la realización de este trabajo experimental se utilizó una xantona, nombrada como GAG, aislada y caracterizada químicamente por el grupo del Dr. Valdir Cechinel (Universidad de Vale do Itajaí, Brasil).

2. Líneas celulares

La investigación se realizó sobre la línea monocitaria de leucemia aguda humana THP-1 (donada desde el Instituto de la Grasa de Sevilla en 2009) y la línea de adenocarcinoma de colon humano HT-29 (obtenida del Banco Europeo de Cultivos Celulares -ECACC- en 2011 en el pase P.143). Ambas líneas se mantuvieron a 37°C y a una atmósfera de CO₂ al 5% en un incubador.

2.1. Línea monocitaria de leucemia aguda humana, THP-1

Para el cultivo y mantenimiento de la línea THP-1 se utilizó medio RPMI 1640 con L-Glutamina 2 mM y HEPES 25 mM (GIBCO, USA), suplementado con suero fetal bovino (PAA, Austria) al 10% y 1% de Penicilina/Estreptomicina (PAA). La línea fue subcultivada en su estado de monocitos (células en suspensión) o bien fueron diferenciados a macrófagos (células adherentes) con porbol-12-miristato-13-acetato (PMA) 0.2 µM durante 72 h (Figura 3).



Figura 3. Monocitos diferenciados a macrófagos vistas al microscopio 40X

2.2. Línea de adenocarcinoma humano, HT29

Para el cultivo de la línea HT-29 se utilizó medio McCoy's 5A (PAA, Austria) suplementado con un 10% de suero fetal bovino y un 1% de Penicilina/Estreptomicina. Esta línea crece de forma adherente, por lo que para su mantenimiento y subcultivo requiere de la individualización de las células mediante un tratamiento con tripsina-EDTA (5 min, 37 °C) (Figura 4).



Figura 4. Línea HT-29 vista al microscopio 40X

3. Descongelación de las líneas celulares

En primer lugar, se procedió a la descongelación parcial de los viales de THP-1 y HT-29, conservados en nitrógeno líquido. A continuación, se añadió el contenido celular a un tubo falcon que contenía el medio de cultivo requerido para cada línea

celular. Posteriormente, se centrifugaron los tubos (1000 rpm, 3 min) para eliminar el dimetilsulfóxido (DMSO), vehículo en el que se habían congelado las células. Tras este paso, se eliminó el sobrenadante y se añadió nuevo medio de cultivo a cada tubo falcon (10-12 ml aproximadamente), asegurándose que el contenido estaba correctamente resuspendido. Finalmente, las células se colocaron en frascos de cultivo, se visualizaron al microscopio para asegurar su correcta morfología y se incubaron a 37°C y a una atmósfera de CO₂ al 5%.

4. Evaluación de la citotoxicidad mediante el ensayo de la sulforhodamina B (SRB)

Para la determinación de la actividad citotóxica del compuesto GAG sobre las líneas celulares THP-1 y HT-29 se utilizó el método de la sulforhodamina B (SRB), compuesto de color violeta, capaz de teñir de forma rápida y específica las proteínas de las células vivas.

Para las células HT-29, se partió de 5.000 células/pocillo (10.000 células/pocillo en caso de la línea THP-1) sembradas en placas NUNC estériles de 96 pocillos, a las que se adicionaron dosis crecientes de la xantona en estudio (desde 100 µM a 6,25 µM) o del vehículo utilizado (DMSO), durante 24, 48 y 72 horas para establecer aquellas concentraciones no tóxicas para las distintas líneas (Figura 5).

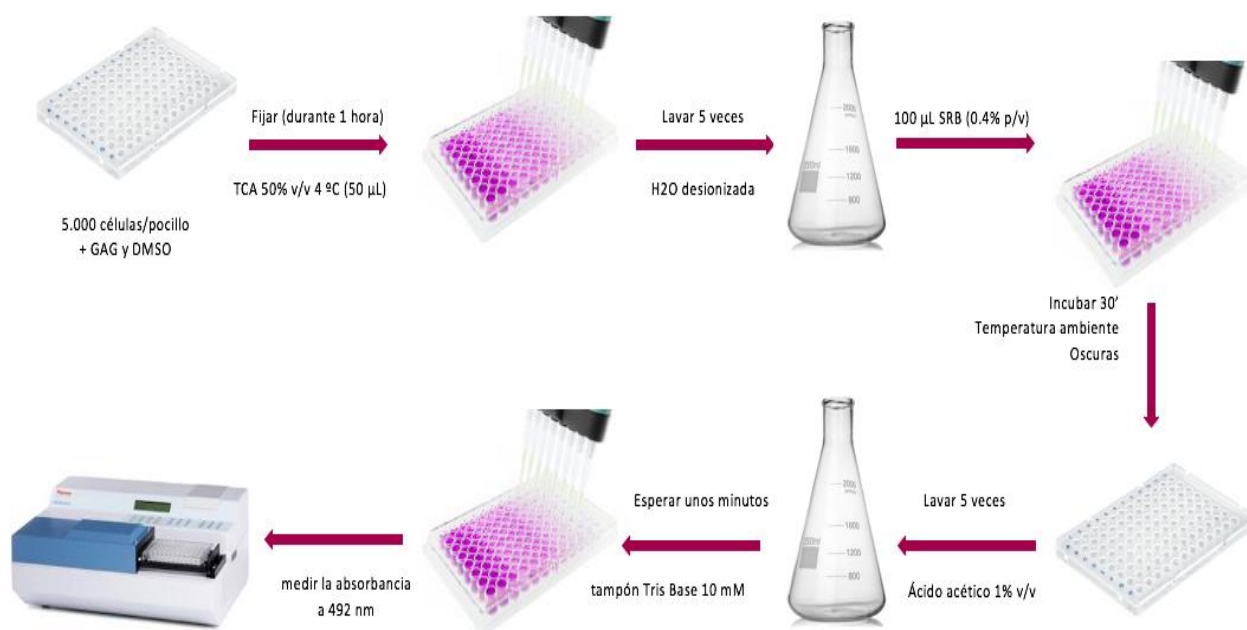


Figura 5. Esquema del método de la Sulforhodamina B (SRB)

Transcurrido el tiempo de incubación, las células se fijaron con ácido tricloroacético (TCA) al 50% v/v a 4 °C. Tras una hora de incubación, las placas se lavaron 5 veces con agua desionizada, se adicionaron 100 µL de SRB (0.4% p/v) en una solución de ácido acético al 1% v/v, y se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente, se lavaron de nuevo 5 veces con ácido acético al 1% v/v y se dejaron secar unos minutos antes de añadir tampón Tris Base 10 mM, para finalmente medir la absorbancia a 492 nm con un espectrofotómetro Labsystems Multiskan EX (Helsinki, Finlandia) (Figura 6). Una vez realizado el ensayo, los resultados se expresaron según el índice de inhibición 50 (IC₅₀), que se define como la dosis que produce la muerte del 50% de las células en cultivo en un tiempo determinado.

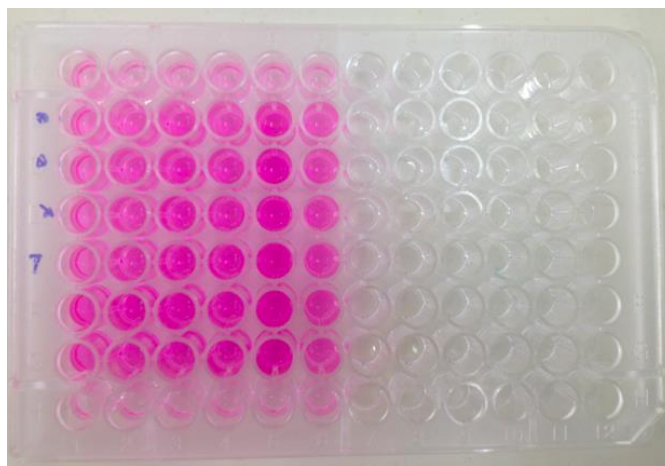


Figura 6. Placa NUNC de 96 pocillos sembrada con macrófagos y adicionadas dosis decrecientes de GAG a las 24 horas

5. Evaluación de la actividad antiinflamatoria por el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA)

El estudio de producción de la citocina TNF- α se realizó empleando la línea celular THP-1, diferenciada a macrófagos desde la forma monocítica. Para ello, se sembraron 10.000 células por pocillo en placas estériles NUNC de 96 pocillos, que se trataron con PMA 0.2 µM, durante 72 horas a 37 °C, para inducir su diferenciación a macrófagos. A continuación, las células se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) estéril frío para eliminar los monocitos no transformados y se añadieron 100 µL de medio completo (37 °C) junto con la xantona en estudio a las distintas concentraciones

(1, 5 y 10 μM). Tras 1 hora de incubación con el compuesto, los macrófagos se estimularon con LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 24 horas (Figura 7). Los sobrenadantes de los cultivos celulares, que contenían las citocinas solubles, se recolectaron y almacenaron a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. La cuantificación de TNF- α se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del correspondiente kit comercial (Bionova), que se describe a continuación.

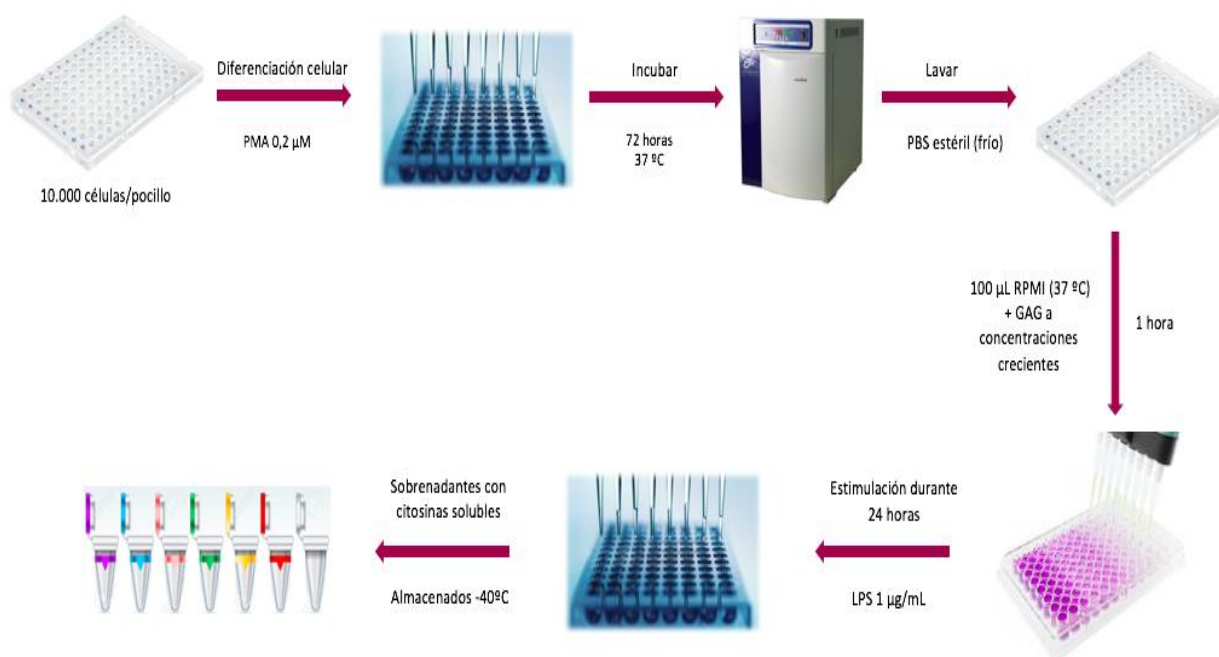


Figura 7. Esquema de la diferenciación a macrófagos desde la forma monocítica y tratamiento con GAG a concentraciones 1, 5 y 10 μM para la posterior medida de TNF- α .

Para la realización de este kit se utilizó una placa de 96 pocillos, donde se pipetearon 100 μL del anticuerpo de captura o anticuerpo primario frente a TNF- α , diluido en PBS 1X. La placa se incubó en el frigorífico, a 4°C durante la noche. Después de 2 lavados con aproximadamente 400 μL de PBS-Tween 0,05% para arrastrar el anticuerpo primario no unido al pocillo, se añadieron 250 μL de tampón de saturación (albúmina bovina sérica al 5% en PBS 1X) y se dejó incubar durante 2 horas a temperatura ambiente. Seguidamente, se pipetearon 100 μL de las muestras diluidas y de la curva patrón a las diferentes concentraciones (800 a 25 pg/ml), así como 50 μL de anticuerpo secundario o biotinilado. Las placas se dejaron incubar durante 3 horas a

temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, se lavaron 3 veces con aproximadamente 400 μL de tampón de lavado y se añadieron 100 μL de una dilución que contenía estreptavidina unida a peroxidasa de rábano (HRP), incubándose durante 30 minutos a temperatura ambiente. Nuevamente, se repitió el proceso de lavado y se añadieron 100 μL de solución sustrato 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Este sustrato da una señal de color azul cuando se une con el conjugado (Figura 8), virando a amarillo cuando se le añade ácido sulfúrico, reactivo de parada en todos los pocillos, siendo el color proporcional a la concentración de TNF- α presente en los pocillos. Finalmente, se procedió a la medida de la absorbancia en un espectrofotómetro a 450 nm con un filtro de referencia fijado a 630 nm o 650 nm. Los resultados se expresaron en pg/ml de TNF- α producidos, calculados a partir de una recta patrón de concentraciones conocidas de esta citocina.

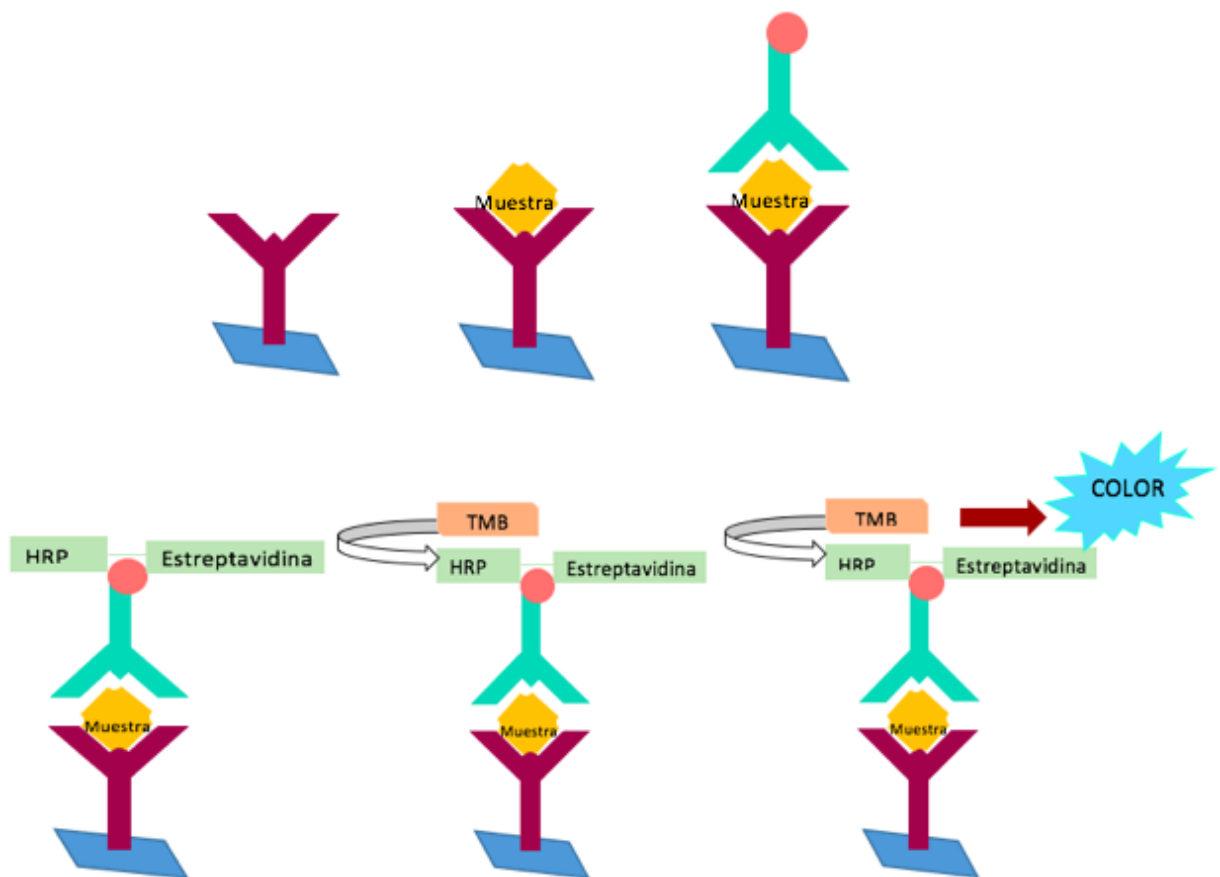


Figura 8. Esquema del fundamento de la técnica ELISA

6. Evaluación de la actividad antioxidante por el método del ABTS

Para este ensayo se empleó el método del ABTS (2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), basado en la degradación o secuestro de los radicales por la interacción con la sustancia antioxidante. Este método monitoriza los cambios de absorbancia del ABTS en el tiempo y permite determinar la capacidad antioxidante en muestras con absorbancia en el visible, ya que las medidas se realizan a 734 nm (rojo lejano). Esta técnica se realizó en placas de 96 pocillos utilizando concentraciones crecientes de la muestra (3,125, 6,25, 12,5, 25, 50, 100 y 200 μM), diluidas en etanol, que se mezclaron con el radical catiónico ABTS. Una vez estabilizada la absorbancia de la reacción a los 6 min, se determinó la absorbancia de cada muestra. Como control positivo se utilizó Trolox (Figura 9), un derivado de la vitamina C, con alta capacidad antioxidante. La absorbancia se midió en un lector de placa Labsystems Multiskan EX a una $\lambda = 734 \text{ nm}$. El cálculo de la actividad antioxidante se expresó como equivalentes de Trolox (EC_{50} del antioxidante/ EC_{50} Trolox), dando valor de 1 a la Concentración Efectiva 50 (EC_{50}) del Trolox (concentración de Trolox capaz de generar una actividad antioxidante del 50 %).

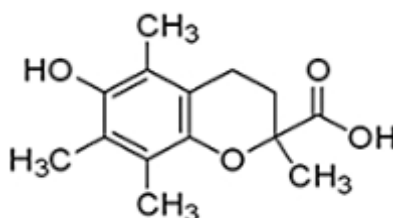


Figura 9. Estructura química del Trolox (Luo y cols., 2009)

7. Análisis estadístico

Los datos que se presentan en el apartado de “Resultados”, se expresan como la media \pm error estándar de las valoraciones obtenidas en las muestras ensayadas. Los datos han sido tratados con el programa GraphPad 5.0. En poblaciones múltiples, con diferentes medias, se analizó la varianza de las mismas mediante el test ANOVA (análisis de varianza) de una rama, comparándose dichas medias mediante un test de Bonferroni. Un valor de p igual o inferior a 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

IV. RESULTADOS

1. Evaluación de la citotoxicidad

La actividad citotóxica de la xantona GAG se ensayó sobre la línea de leucemia monocitaria aguda THP-1 y sobre la línea celular procedente de un adenocarcinoma de colon humano HT-29, tras 24, 48 y 72 horas de incubación, mediante el método de la SRB. En ambos casos, se ensayaron concentraciones desde 6.25 μM hasta 100 μM .

Con esta técnica se busca determinar la concentración del compuesto que causa la muerte del 50% de la población en cultivo (IC_{50}), y así evaluar la posible actividad contra células cancerosas. Como se observa en la figura 10, el compuesto GAG mostró una citotoxicidad notable sobre las células HT-29, tras 48 y 72 horas de incubación. Por el contrario, no se apreció muerte celular en el control sin tratar (control DMSO).

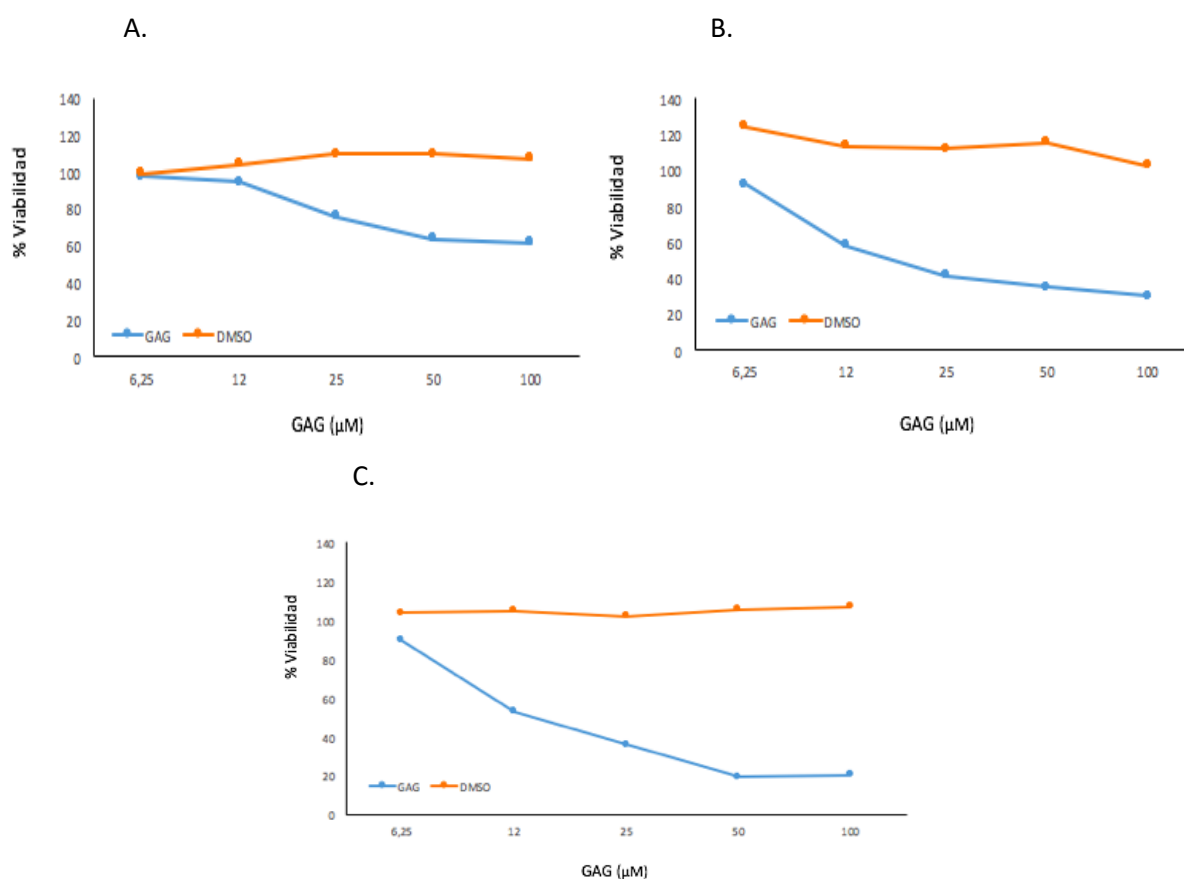


Figura 10. Efecto de la xantona GAG sobre la viabilidad de las células HT-29. La viabilidad se midió a diferentes concentraciones de GAG (desde 6.25 μM hasta 100 μM) mediante el método de la SRB a las 24 (A), 48 (B) y 72 horas (C). Se expresa en porcentaje respecto al control sin tratar (DMSO). Los datos son la media de 2 experimentos independientes.

La actividad citotóxica de la xantona se confirmó tras el cálculo de los valores de IC₅₀ tras 48 y 72 horas de incubación, representados en la tabla 3.

Tabla 3. Representación de los valores de IC₅₀ mostrados por la xantona GAG (μM) sobre la línea celular HT-29 a 24, 48 y 72 horas de incubación

| Compuesto | IC ₅₀ 24h de incubación | IC ₅₀ 48h de incubación | IC ₅₀ 72h de incubación |
|-----------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| GAG | >100 | 16,63 ± 1,98 | 16,72 ± 2,96 |

En el caso de la línea celular THP-1, este ensayo permitió seleccionar concentraciones no letales del compuesto, que mantienen una viabilidad celular del 100% tras 24 horas, para el posterior estudio de la producción de la citocina TNF-α. Como se aprecia en la figura 11 y la tabla 4, los resultados obtenidos tras los experimentos realizados a este tiempo de incubación mostraron valores de IC₅₀ mayores de 100 μM, por lo que se concluyó que la xantona no presentaba citotoxicidad sobre las células THP-1 tras 24h. Como refleja el cálculo de la IC₅₀, la actividad citotóxica de este compuesto aumentó de manera progresiva tras 48 y 72 horas.

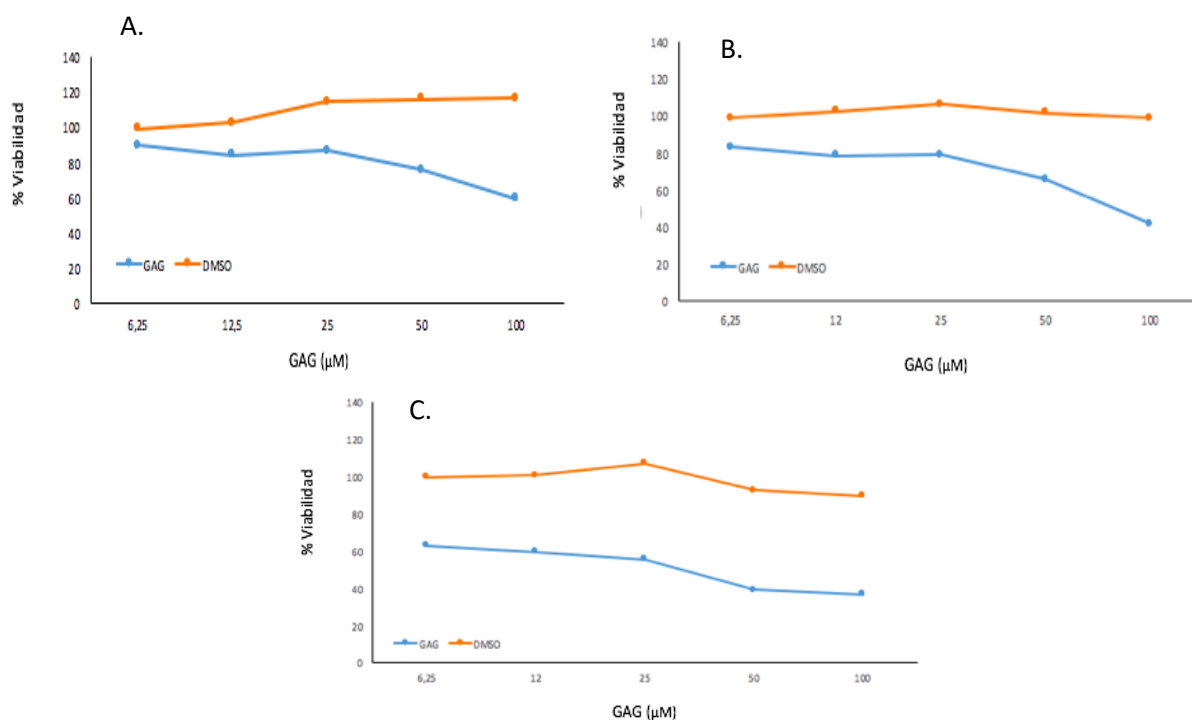


Figura 11. Efecto de la xantona GAG sobre la viabilidad de las células THP-1. La viabilidad se midió a diferentes concentraciones de GAG (desde 6.25 μM hasta 100 μM) mediante el método de la SRB a las 24 (A), 48 (B) y 72 horas (C). Se expresa en porcentaje respecto al control sin tratar (DMSO). Los datos son la media de 2 experimentos independientes.

Tabla 4. Representación de los valores de IC₅₀ mostrados por la xantona GAG (μM) sobre macrófagos THP-1 a 24, 48 y 72 horas de incubación.

| Compuesto | IC ₅₀ 24h de incubación | IC ₅₀ 48h de incubación | IC ₅₀ 72h de incubación |
|-----------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| GAG | >100 | 78,62 ± 7,55 | 46,04 ± 12,55 |

2. Evaluación de la actividad antiinflamatoria

Para conocer la actividad antiinflamatoria de la xantona en estudio, GAG, se evaluó la producción de la citocina TNF-α en células THP-1, diferenciadas a macrófagos desde la forma monocítica. Se conoce que esta citocina juega un papel muy importante en la respuesta inflamatoria del organismo (Toussirof y cols., 2012).

Las concentraciones ensayadas de GAG para determinar la producción de TNF-α producida por los macrófagos fueron 1, 5 y 10 μM. Estas concentraciones se seleccionaron según el método de la SRB, asegurándose que no presentaban citotoxicidad sobre las células THP-1.

Los resultados de la técnica ELISA pusieron de manifiesto un incremento significativo de los niveles de TNF-α en las células estimuladas con LPS en comparación con las no estimuladas (control con DMSO) ($p < 0.001$) (Figura 12). Cabe destacar que no se observaron diferencias significativas entre los controles con y sin DMSO (DMSO y (-)DMSO), por lo que se confirmó que el DMSO no interfiere en la producción de TNF-α.

Como era de esperar, la dexametasona, utilizada como fármaco antiinflamatorio, redujo significativamente la producción de esta citocina ($p < 0,001$). El tratamiento con la xantona durante 24 horas a las concentraciones de 5 y 10 μM indujo una reducción significativa en los niveles de TNF-α respecto al control estimulado con LPS ($p < 0,01$ y $p < 0,001$, respectivamente).

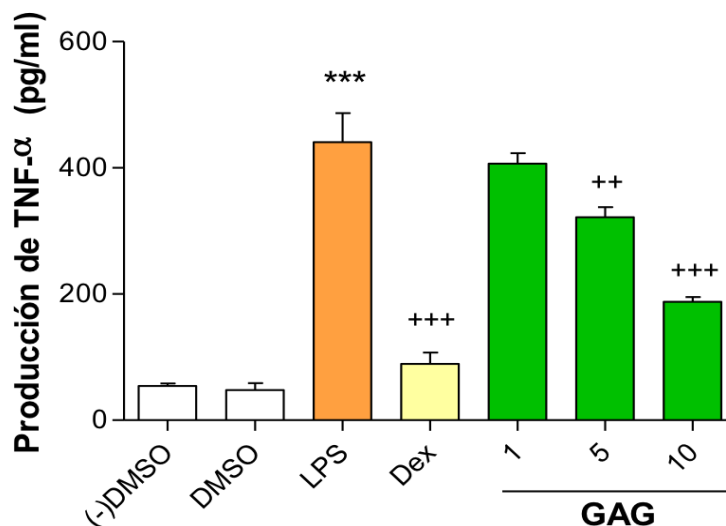


Figura 12. Efecto de la xantona GAG sobre la producción de TNF- α en macrófagos diferenciados a partir de la línea THP-1 (PMA 0,2 μ M, 37°C, 72 h). Las células recibieron un pretratamiento de 1h con la xantona (1, 5 y 10 μ M) o con un control de dexametasona (1 μ M), y seguidamente se estimularon con LPS (1 μ g/mL) durante 24 horas. La producción de TNF- α se midió mediante ELISA.

Los datos corresponden a la medida \pm el error estándar de cuatro experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un test ANOVA – Bonferroni. *** p < 0,001 vs. control DMSO; ++ p < 0,01 y +++ p < 0,001 vs. LPS.

3. Evaluación de la actividad antioxidante

Para la evaluación de la actividad antioxidante de la xantona GAG, se utilizó el método del ABTS, que como se mencionó anteriormente, es un método que registra los cambios de absorbancia mediante el cambio de color del ABTS en el tiempo, que vira de azul a transparente y permite determinar la capacidad antioxidante en muestras mediante absorbancia ($\lambda = 734$ nm), de manera que a mayor absorbancia, menor es la capacidad antioxidante. Como control positivo se usa el Trolox, para demostrar la efectividad del compuesto en función del valor de éste, ya que al ser una sustancia derivada de la vitamina C, es altamente antioxidante.

Para conocer la concentración que ejerce una actividad antioxidante del 50%, fue calculada la concentración efectiva (EC_{50}), mostrada en la tabla 5 junto con el equivalente en Trolox, que mide la concentración de muestra necesaria para tener una actividad antioxidante similar a la del Trolox.

Como se observa en la tabla 5, el compuesto GAG presenta una destacada actividad antioxidante, ya que por cada unidad de Trolox son necesarias únicamente 2,71 unidades de GAG para tener la misma capacidad antioxidante que el Trolox.

Tabla 5. Actividad antioxidante de la xantona GAG, medida por el método del ABTS. Se calculó el EC₅₀ de la muestra y del control positivo Trolox, así como el equivalente de Trolox.

| | EC ₅₀ (μM) | Equivalente en Trolox EC ₅₀ GAG / EC ₅₀ Trolox |
|--------|-----------------------|---|
| Trolox | 24,23 ± 2,97 | 1 |
| GAG | 65,67 ± 0,17 | 2,71 ± 0,01 |

V. DISCUSIÓN

La inflamación aguda es la respuesta del organismo ante estímulos dañinos de un agente agresor para recuperar el estado de homeostasis. Sin embargo, cuando este proceso se cronifica existe una activación persistente de las células del sistema inmune. Durante este proceso, los monocitos y macrófagos activados liberan sustancias pro-inflamatorias, como son las citocinas TNF- α , IL-6 e IL-8, entre otras, que a su vez actúan sobre los neutrófilos y otras células inmunes (Ko y Jeon, 2015). En este punto, es importante la acción de factores de transcripción como el factor nuclear kappa B (NF- κ B) (Vendramini-Costa y Carvalho, 2012). Esta proteína citoplasmática se encuentra generalmente inactiva, esperando señales de ciertos estímulos entre los que se encuentra el TNF- α , dando lugar a su activación y consecuente estimulación de células pro-inflamatorias (Beinke y Ley, 2004). La señalización derivada de la activación del NF- κ B estimula la expresión de múltiples moléculas, como citocinas pro-inflamatorias, y enzimas como la COX-2 e iNOS (Figura 13), que tienen un papel clave en el origen de numerosas patologías inflamatorias y en la evolución del cáncer (Orlando, 2010).

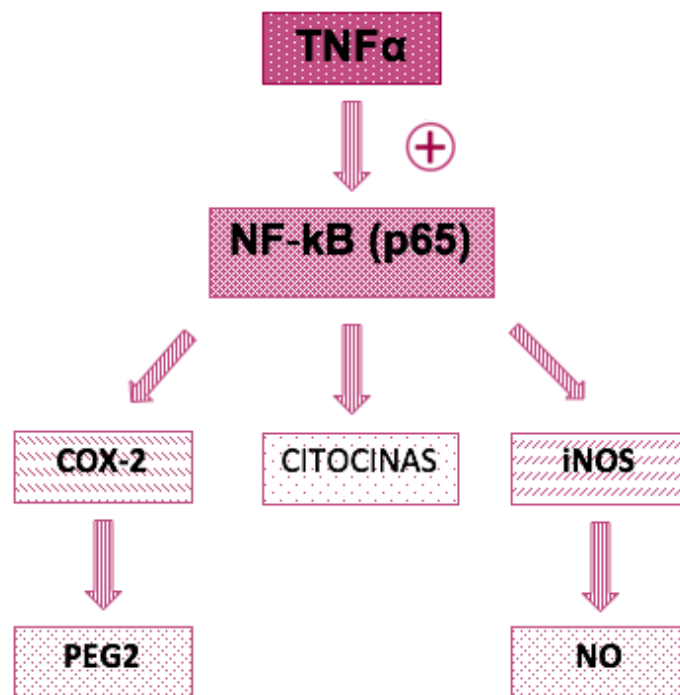


Figura 13. Esquema de la activación de citocinas pro-inflamatorias

Numerosas evidencias han demostrado que un estado inflamatorio crónico constituye la base de muchas patologías como el asma, la diabetes, la aterosclerosis, la artritis reumatoide o el cáncer. En relación al cáncer, estudios epidemiológicos han asociado que hasta un 25% de los tumores diagnosticados tienen en su origen, o en su evolución, un componente inflamatorio importante (Vendramini-Costa y Carvalho, 2012). Entre las enfermedades inflamatorias asociadas al desarrollo de cáncer destaca la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), que puede derivar a cáncer de colon (CCR). Este cáncer es el tercer tipo más común de cáncer y también la segunda causa de muerte relacionada con enfermedad cancerosa en los países industrializados. En su etiología se encuentran factores genéticos y ambientales, con la EII de base.

En la actualidad se están evaluando nuevas alternativas en el tratamiento de enfermedades con base inflamatoria, incluyendo la EII y el CCR. La mirada está puesta en buena medida en los productos de origen natural, que constituyen una fuente importante de compuestos base, útiles para el desarrollo de sustancias con interés terapéutico. En este sentido, cabe destacar las xantonas del género *Garcinia*, que presentan una amplia variedad de actividades biológicas.

En base a estos antecedentes, el objetivo de nuestro estudio fue evaluar la actividad citotóxica de la xantona GAG, extraída de *Garcinia achachairu*, sobre las líneas celulares de adenocarcinoma de colon humano HT-29 y de leucemia aguda humana THP-1, así como su actividad antiinflamatoria en macrófagos THP-1 y su acción antioxidante respecto al compuesto ABTS.

En relación a la citotoxicidad de la xantona GAG, los datos obtenidos en la línea celular de adenocarcinoma de colon HT-29 evidenciaron una notable actividad citotóxica del compuesto a las 48 y 72 horas, que fue mayor que para la línea THP-1. Nuestros resultados concuerdan con datos previos de la literatura que muestran que un extracto de *Garcinia mangostana*, constituido por un 81% de α -mangostán y un 16% de γ -mangostán, presentó una potente actividad citotóxica en las células de cáncer de colon HCT-116. Este efecto fue confirmado en ratones xenógrafos inyectados con dichas células (Aisha y cols., 2012). Asimismo, el α -mangostán también ha demostrado citotoxicidad en una línea celular de cáncer de mama humano

(Kritsanawong y cols., 2016). En la misma línea, un estudio previo reveló la actividad anticáncer del ácido gambogico, procedente de *Garcinia hanburyi*, en la línea de cáncer de colon HCT-15. Estos efectos estuvieron relacionados con la activación de la apoptosis a través de la vía de señalización JNK (Huang y cols., 2015).

En cuanto al estudio de la actividad antiinflamatoria de GAG, se evaluó la producción de la citocina pro-inflamatoria TNF- α , involucrada en la regulación de varios procesos fisiológicos y patológicos, entre los que se incluyen la inflamación y el cáncer (Lü y cols., 2012). Los resultados del presente trabajo pusieron de manifiesto una importante actividad antiinflamatoria para este compuesto, al ser capaz de inhibir la producción de TNF- α en macrófagos THP-1 estimulados con LPS. Estos resultados coinciden con un estudio previo *in vitro*, donde se muestra que una xantona aislada de *Garcinia esculenta* inhibió los niveles de IL-6, IL-12 y TNF- α en macrófagos RAW264.7 estimulados con LPS e interferón γ . Además, este compuesto redujo la expresión de las enzimas iNOS y COX-2, con la consecuente inhibición de la producción de NO y PEG₂. Los autores sugieren que estos efectos antiinflamatorios podrían ser debidos a una acción inhibitoria sobre el NF- κ B (Zhang y cols., 2015). Resultados similares fueron observados con el compuesto β -mangostin, procedente de *Garcinia mangostana* (Syam y cols., 2014) y con un extracto etanólico de *Garcinia subelliptica* en macrófagos estimulados con LPS (Cho y Cho, 2016). Sin embargo, a diferencia de lo observado en nuestro estudio, este extracto no fue capaz de reducir los niveles de TNF- α . La actividad antiinflamatoria de diferentes xantonas del género *Garcinia* también se ha demostrado en diferentes modelos *in vivo*. En este sentido, el ácido gambogico mostró actividad antipsoriásica cuando se administró por vía tópica en un modelo de ratones transgénicos con psoriasis moderada (Wen y cols., 2014). De manera similar, el β -mangostin redujo el infiltrado inflamatorio en un modelo de peritonitis inducida por carragenina en ratones (Syam y cols., 2014).

Por otro lado, se sabe que la capacidad antioxidante que poseen algunos compuestos vegetales depende de su estructura química, concretamente del heterociclo que contiene oxígeno, el cual se encuentra también en las xantonas (Ahmad, 2016). Así, un estudio reciente ha mostrado la actividad antioxidante de una xantona aislada de *Garcinia atroviridis*, evaluada por la técnica del 2,2-difenil-1-

picrylhydrazyl (DPPH) (Tan y cols., 2016). En la misma línea, nuestros resultados de la técnica de ABTS evidenciaron una destacada actividad antioxidante del compuesto GAG, en relación con la actividad del compuesto de referencia Trolox.

Como conclusión, los resultados presentados en este trabajo demostraron la actividad citotóxica de la xantona GAG, aislada de *Garcinia achachairu*, en las células HT-29, así como su acción antiinflamatoria sobre la línea celular THP-1 y su efecto antioxidante. Estos datos sugieren el indudable interés de las xantonas como alternativa terapéutica en el tratamiento de patologías inflamatorias y en la prevención del cáncer.

VI. CONCLUSIONES

1. Los ensayos de citotoxicidad mediante el ensayo de la SRB muestran que la xantona GAG posee una notable actividad citotóxica en la línea de adenocarcinoma de colon humano HT-29, tras 48 y 72 horas de incubación.
2. El compuesto GAG presenta una potente actividad antiinflamatoria *in vitro*, generando una inhibición significativa de la producción de la citocina pro-inflamatoria TNF- α en macrófagos THP-1, a las concentraciones de 5 y 10 μ M.
3. La xantona GAG muestra una importante actividad antioxidante con respecto al compuesto de referencia Trolox.
4. Estos datos sugieren el indudable interés de las xantonas como alternativa terapéutica en el tratamiento de patologías inflamatorias y en la prevención del cáncer.

VII. BIBLIOGRAFÍA

AECC. Asociación Española Contra el Cáncer. Consultado [en línea].[Consultado en Junio 2016]. Disponible en:

<https://www.aecc.es/SobreElCancer/CancerPorLocalizacion/cancerdecolon/Paginas/incidencia.aspx>

Ahmad I. Recent insight into the biological activities of synthetic xanthone derivatives. *Eur J Med Chem.* 2016; 116: 267-80.

Aisha A, Abu-Salah K, Ismail Z, Majid A. In vitro and in vivo anti-colon cancer effects of *Garcinia mangostana* xanthones extract. *BMC Complement Altern Med.* 2012; 12: 104.

Bakar M, Ahmad N, Suleiman M, Rahmat A, Isha A. *Garcinia dulcis* Fruit Extract Induced Cytotoxicity and Apoptosis in HepG2 Liver Cancer Cell Line. *BioMed Res Int.* 2015; 2015.

Beinke S, Ley S. Functions of NF- κ B1 and NF- κ B2 in immune cell biology. *Biochem J.* 2004; 382(2): 393-409.

Cho Y, Cho S. C-Jun N-terminal kinase-mediated anti-inflammatory effects of *Garcinia subelliptica* in macrophages. *Mol Med Rep.* 2016; 13(3): 2293-300.

Choudhury B, Kandimalla R, Bharali R, Monisha J, Kunnumakara A, Kalita K et al. Anticancer Activity of *Garcinia morella* on T-Cell Murine Lymphoma Via Apoptotic Induction. *Front Pharmacol.* 2016; 7: 1-13.

De Melo M, Quintans J, Araújo A, Duarte M, Bonjardim L, Nogueira P et al. A Systematic Review for Anti-Inflammatory Property of Clusiaceae Family: A Preclinical Approach. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2014; 2014: 960258.

Filho V, Meyre-Silva C, Niero R, Bolda L, Gomes F, Vicente I et al. Evaluation of antileishmanial activity of selected brazilian plants and identification of the active principles. *Evid Based Complement Alternant Med.* 2013; 2013.

Franceschelli S, Pesce M, Ferrone A, Patruno A, Pasqualone L, Carlucci G et al. A Novel Biological Role of α -Mangostin in Modulating Inflammatory Response Through the Activation of SIRT-1 Signaling Pathway. *J Cell Physiol*. 2016; 1-13.

Huang G, Sun Y, Ge X, Wan X, Li C. Gambogic acid induces apoptosis and inhibits colorectal tumor growth via mitochondrial pathways. *World J Gastroenterol*. 2015; 21(20): 6194-205.

Ko S, Jeon Y. Anti-inflammatory effect of enzymatic hydrolysates from *Styela clava* flesh tissue in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages and in vivo zebrafish model. *Nutr Res Pract*. 2015; 9(3): 219-26.

Kritsanawong S, Innajak S, Imoto M, Watanapokasin R. Antiproliferative and apoptosis induction of α -mangostin in T47D breast cancer cells. *Int J Oncol*. 2016; 48(5):2155-65.

Lü L, Tang D, Wang L, Huang L, Jiang G, Xiao X et al. Gambogic acid inhibits TNF- α -induced invasion of human prostate cancer PC3 cells in vitro through PI3K/Akt and NF- κ B signaling pathways. *Acta pharmacol Sin*. 2012; 33(4): 531-41.

Luo Z, Chen Y, Chen S, Welch W, Andresen B, Jose, P et al. Comparison of inhibitors of superoxide generation in vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*. 2009; 157(6): 935-43.

Marques E, Silva S, Niero R, Andrade S, Rosa P, Perazzo F et al. Genotoxicity assessment of *Garcinia achachairu* Rusby (Clusiaceae) extract in mammalian cells in vivo. *J Ethnopharmacol*. 2012; 142(2): 362-6.

Molin M, Silva S, Alves D, Quintão N, Monache F, Filho V et al. Phytochemical analysis and antinociceptive properties of the seeds of *Garcinia achachairu*. *Arch Pharm Res*. 2012; 35(4): 623-31.

Niero R, Molin M, Silva S, Damian N, Maia L, Monache F et al. Gastroprotective effects of extracts and guttiferone A isolated from *Garcinia achachairu* Rusby (Clusiaceae) against experimentally induced gastric lesions in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2012; 385(11): 1103-09.

Orlando R. The transcription factor NF-kappaB in human diseases. *Rev Med Insti Mex Seguro Soc.* 2010; 48(1): 55-60.

Otuki M, Bernardi C, Prudente A, Laskoski K, Gomig F, Horinouchi C et al. *Garcinia gardneriana* (Planchon & Triana) Zappi. (Clusiaceae) as a topical anti-inflammatory alternative for cutaneous inflammation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2011; 109(1): 56-62.

Prathapan K, Chaboo C. Biology of Blepharida-group flea beetles with first notes on natural history of *Podontia congregata* Baly, 1865 an endemic flea beetle from southern India (Coleoptera, Chrysomelidae, Galerucinae, Alticini). *ZooKeys.* 2011; 157: 95-130

Subarnas A, Diantini A, Abdullah R, Zuhrotun A, Nugraha P, Hadisaputri Y et al. Apoptosis-mediated antiproliferative activity of friedolanostane triterpenoid isolated from the leaves of *Garcinia celebica* against MCF-7 human breast cancer cell lines. *Biomed Rep.* 2016; 4(1): 79-82.

Sun Y, Li D, Jia C, Xue C, Bai J, Li Z et al. Three new xanthenes from the leaves of *Garcinia lancilimba*. *J Nat Med.* 2016; 70(2): 173-8.

Syam S, Bustamam A, Abdullah R, Sukari MA, Hashim NM, Mohan S et al. β Mangostin suppress LPS-induced inflammatory response in RAW 264.7 macrophages in vitro and carrageenan-induced peritonitis in vivo. *J Ethnopharmacol.* 2014;153(2):435-45.

Tan W, Khairuddean M, Wong K, Tong W, Ibrahim D. Antioxidant compounds from the stem bark of *Garcinia atroviridis*. *J Asian Nat Prod Res.* 2016; 21: 1-8.

Teh S, Ee G, Mah S, Lim Y, Ahmad Z. Cytotoxicity and structure-activity relationships of xanthone derivatives from *Mesua beccariana*, *Mesua ferrea* and *Mesua congestiflora* towards nine human cancer cell lines. *Molecules.* 2013; 18(2): 1985-94.

Terrazas P, De Marques E, Mariano L, Filho V, Niero R, Andrade S et al. Benzophenone guttiferone A from *Garcinia achachairu* rusby (Clusiaceae) presents

genotoxic effects in different cells of mice. PLoS One. 2013; 8(11): 1-6.

Toussirot E, Houvenagel E, Goeb V, Fouache D, Martin A, Le Dantec P et al. Development of inflammatory bowel disease during anti-TNF-(alpha) therapy for inflammatory rheumatic disease: A nationwide series. Joint Bone Spine. 2012; 79(5): 457-63.

Vendramini-Costa D, Carvalho, J. Molecular link mechanisms between inflammation and cancer. Curr Pharm Des. 2012; 18(26): 3831-52.

Wen J, Pei H, Wang X, Xie C, Li S, Huang L et al. Gambogic acid exhibits anti-psoriatic efficacy through inhibition of angiogenesis and inflammation. J Dermatol Sci. 2014;74(3):242-50.

Xia Z, Zhang H, Xu D, Lao Y, Fu W, Tan H et al. Xanthones from the Leaves of *Garcinia cowa* Induce Cell Cycle Arrest, Apoptosis, and Autophagy in Cancer Cells. Molecules. 2015; 20(6): 11387-99.

Yuan J, Wu J, Lu G. α -Mangostin suppresses lipopolysaccharide-induced invasion by inhibiting matrix metalloproteinase-2/9 and increasing E-cadherin expression through extracellular signal-regulated kinase signaling in pancreatic cancer cells. Oncol Lett. 2013; 5(6): 1958-64.

Zhang D, Zhang H, Lao Y, Wu R, Xu J, Murad, F et al. Anti-Inflammatory Effect of 1,3,5,7-Tetrahydroxy-8-isoprenylxanthone Isolated from Twigs of *Garcinia esculenta* on Stimulated Macrophage. Mediators Inflamm. 2015; 2015.

VIII.ABREVIATURAS

ABTS: 2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid

CCR: Cáncer de colon

COX-2: Ciclooxygenasa-2

DEX: Dexametasona

DMSO: Dimetilsulfóxido

EC₅₀: Concentración Efectiva 50

EII: Enfermedad inflamatoria intestinal

ECACC: Banco Europeo de Cultivos Celulares

ELISA: Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima

FARMOLAP: Farmacología Molecular y Aplicada

HRP: Peroxidasa de rábano

HT-29: Línea de adenocarcinoma de colon humano

IC₅₀: Índice de inhibición 50

iNOS: Óxido Nítrico Sintasa Inducible

LPS: Lipopolisacárido

MAPK: Proteínas cinasas activadas por mitógenos

MMP-2 / MMP-9: Metaloproteinasas de la matriz-2/9

NF-κB: Factor nuclear Kappa B

NO: Óxido Nítrico

PBS: Tampón fosfato salino

PGE2: Prostaglandina E2

PKC: Proteína cinasa C

PMA: porbol-12-miristato-13-acetato

RIBECANCER: Red Iberoamericana de Investigación en Cáncer

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SIRT-1: *The Silent Information Regulator-1*

SRB: Sulforhodamina B

TCA: Ácido tricloroacético

THP-1: Línea monocitaria de leucemia aguda humana

TIE: 1,3,5,7-Tetrahydroxy-8-isoprenylxanthone

TMB: 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α