



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD IRAPUATO

**Identificación de extractos de plantas con efectos en la  
longevidad de *Saccharomyces cerevisiae***

Tesis que presenta

**L.B.G. Sanjuanita Lizzeth Salazar Martínez**

Para obtener el grado de  
**Maestro en Ciencias**

En la especialidad de  
**Biología de plantas**

**Directores de la Tesis**

Dr. Luis Rafael Herrera Estrella

Dr. Alexander de Luna Fors

Irapuato, Guanajuato

Agosto 2016



**Cinvestav - Irapuato**  
**Langebio**

Este trabajo se realizó en el Laboratorios 5: “Fisiología e ingeniería metabólica de plantas” y el Laboratorio 6: “Biología de Sistemas Genéticos” del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) del CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato, bajo la dirección del Dr. Luis Rafael Herrera Estrella y el Dr. Alexander de Luna Fors, con el apoyo del CONACyT a través del programa de becas para el estudio de posgrado CVU 563854 y del CINVESTAV-IPN a través de la beca de obtención de grado.

## Índice

	Página
- Dedicatoria	i
- Agradecimientos	ii
- Lista de abreviaturas	iv
- Lista de figuras	vi
- Lista de tablas	viii
- Resumen	1
- Abstract	4
1.0 Introducción	7
2.0 Antecedentes	9
2.1 Procesos celulares e intervenciones del medio que promueven la longevidad y retrasan el envejecimiento	9
2.2 Productos naturales que promueven el incremento de la duración de la vida	10
2.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo para el estudio del envejecimiento	13
3.0 Hipótesis	17
4.0 Objetivo general	18
4.1 Objetivos específicos	18
5.0 Materiales y métodos	19
5.1 Elaboración de las bases de datos	19
5.2 Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y medios	19
5.3 Compuestos promotores de la longevidad	20
5.4 Plantas medicinales y preparación de extractos	20
5.5 Cinéticas de crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
5.6 Ensayo de longevidad – Envejecimiento cronológico de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
5.7 Cromatografía en capa fina	25
6.0 Resultados	27
6.1 Bases de datos	27
6.2 Ensayo prueba usando siete compuestos identificados como promotores de longevidad	28

	Página
6.3 Efecto de treinta extractos de plantas medicinales en la supervivencia de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
6.4 Efecto de seis extractos candidatos en la CLS de tres cepas referencia de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	49
6.5 Perfil químico de los extractos que muestran efecto sobre la supervivencia de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	58
6.6 Efecto del extracto de <i>Eriobotrya japonica</i> (níspero) en cepas mutantes de genes relacionados al envejecimiento para identificar mecanismos de acción	62
7.0 Discusión	68
7.1 Los compuestos metformina, espermidina y rapamicina aumentan la CLS de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	68
7.2 Seis extractos de plantas medicinales incrementan significativamente la CLS de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	71
7.3 El efecto de los extractos candidatos sobre la CLS difiere de acuerdo a la cepa de referencia donde se prueba	74
7.4 El extracto de <i>Eriobotrya japonica</i> interactúa con dos genes que están relacionados al envejecimiento en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	75
8.0 Conclusión	80
9.0 Perspectivas	81
10.0 Referencias	82
- Anexo 1. Base de datos de compuestos promotores de la longevidad	89
- Referencias al Anexo 1	93
- Anexo 2. Base de datos de extractos crudos de plantas con efecto en la longevidad	96
- Referencias al Anexo 2	99
- Anexo 3. Base de datos de plantas medicinales	101
- Referencias al Anexo 3	109
- Apéndice. Lista de medios	115

## ***Dedicatoria***

*A mis amados papás, Juany y Esteban, por ser mi todo. Por iluminar y guiar mi camino aún en los momentos más oscuros. Porque ustedes siempre serán mi alma y mi corazón.*

*A mis hermanos, Emmanuel y Eduardo, por caminar siempre juntos. Por darme todo su amor incondicionalmente. Porque ustedes son lo más maravilloso del mundo para mí.*

*A mi segunda mamá, Magda, por dedicarme un lugar especial en tu corazón. Porque sin importar la distancia sé que estás conmigo.*

*A mis abuelitas, Elena y Natalia, porque son el tesoro más grande que tengo. Por tenerme siempre en sus pensamientos y darme sin condición todo su afecto.*

*A la memoria de mis queridos abuelitos, Jesús y Jacinto, porque a pesar de la lejanía corpórea, sé que su corazón está junto al mío y lo estará siempre.*

*Al hombre más increíble que he conocido, Rogelio, por todo tu amor, comprensión y apoyo. Por permitirnos emprender juntos el viaje más fantástico y extraordinario de nuestras vidas. Te amo.*

***“Puedes, deberías, y si eres lo suficientemente valiente para empezar, lo harás”.***

**Stephen King**

## ***Agradecimientos***

*A mis papás, Juany y Esteban, por todo su amor y apoyo. Por permitirme abordar esta aventura lejos de casa. Por secundar mis locuras para cumplir mis sueños y metas. Por acompañarme hasta el fin del mundo. Los amo infinitamente.*

*A mis hermanos, Emmanuel y Eduardo, por nunca dejarme sola y estar al pendiente de mí, ya que lo más duro de estar lejos fue el no poder verlos diariamente. Gracias por hacer de mi estadía algo más llevadero con cada una de sus llamadas y mensajes.*

*A toda mi familia, en especial a mis abuelitas, a mi tía Magda y a Mini, por comprender mis ausencias en momentos familiares importantes. Por recibirme en cada visita con los brazos abiertos y una sonrisa, por volverme hacer sentir en casa.*

*Al doctor Luis Herrera, por darme la oportunidad de trabajar bajo su dirección y darme un espacio en su laboratorio. Por dejarme hacer lo que más me gusta, la investigación, permitiéndome crecer y fomentando mi lado crítico. Por darme un reto de trabajo con un tema totalmente nuevo para mí y hacerme ver todo mi potencial, haciendo esta experiencia invaluable.*

*Al doctor Alex de Luna, por abrirme las puertas de su laboratorio, ha sido una experiencia gratificante trabajar bajo su dirección. Por mostrarme lo increíble que es trabajar con el envejecimiento en levaduras, con el robot y con el análisis de miles de datos. Por estar al tanto de cada extenuante experimento. Por alentarme y confiar en mí.*

*Al doctor Jorge Molina, por sus excelentes comentarios y por enriquecer mi proyecto con nuevas ideas. Por adoptarme unos días en su laboratorio y apoyarme con los experimentos de capa fina. Por entusiasmarse y llevarme en la búsqueda de nuevas muestras por todo el Cinves para complementar mis experimentos.*

*Al doctor José Ruiz por darme la más inolvidable bienvenida al Cinvestav, he de confesar que aún tengo sueños donde dice mi nombre preguntándome por una gráfica y que no sé contestar. Infinitamente gracias por fomentar el siempre cuestionarme todo. Gracias por*

*formar parte de mis tutores y por preguntar aquello que no había pensado y que le da un nuevo giro al proyecto.*

*A mis compañeros y amigos del L5, Ara, Rosy, Sandy, Lolis, Lenin, Thelma, Gera, Javi, Jonathan, Elohim, Félix, Alan y Libia, por siempre tener la disposición de discutir los proyectos. Por las reuniones y la convivencia. Por hacer más amena mi estadía en el laboratorio.*

*A mis amigos y compañeros del L6, Erika Garay, Diana, Sergio, Selene, Abraham, Alex, Adriana, Johny, Erika y Jorge, por acogerme en el laboratorio y hacerme partícipe de él. Por las convivencias dentro y fuera del laboratorio, por las innumerables discusiones en la comida o a la hora del té de los tantos y múltiples temas que nos rondaban por la cabeza. Por simplemente ser ustedes.*

*A las magníficas personas que conocí en el Cinvestav, a mis compañeros de generación, pero sobre todo a las personas que sin buscar nada me entregaron su más sincera amistad y que valoro con todo mi corazón. Muchas gracias por formar parte de mi segunda familia, especialmente a Sara, Arlet y Rosy.*

*Al Conacyt, por brindarme el apoyo económico para poder realizar mi proyecto de maestría. Al Cinvestav Irapuato, por hacerme parte de sus filas de estudiantes con sed de conocimiento. Al Instituto de Biología de la UNAM, especialmente al doctor Javier Caballero, al maestro Francisco Basurto y a Laura Cortés; y al Cicy, en especial a la maestra Clarisa Jiménez y a Verónica Limones, por su apoyo para la adquisición de las especies de plantas medicinales. Al doctor Alfredo Herrera por facilitarme especies de hongos patógenos para un experimento prueba. A Paulina, Marisa, Juan y Mary, del grupo de Fitoquímica, por su apoyo y paciencia en los ensayos de HPTLC.*

*Finalmente, no me bastan las palabras para decirte lo mucho que agradezco todo lo que has hecho por mí y para mí, Rogelio. Gracias por estar conmigo en las extraordinarias, las increíbles, las buenas, las malas, las más malas, las pésimas y las peores. Por darme esa palabra de aliento que tanto necesitaba, por darme lo justo, en el momento exacto, para no desistir y dejarme caer. Por alentarme y estar junto a mí, aún en la distancia, porque yo siempre te sentí cerca. Desde siempre y para siempre.*

## Lista de abreviaturas

<b>%</b>	– Por ciento
<b>/</b>	– Y
<b>:</b>	– A
<b>::</b>	– Sustituido
<b>=</b>	– Igual
<b>&amp;</b>	– Y
<b>°</b>	– Grados
<b>°C</b>	– Grados Celsius
<b><math>\alpha</math></b>	– Alfa
<b><math>\beta</math></b>	– Beta
<b><math>\Delta</math></b>	– Nulo
<b><math>\mu\text{L}</math></b>	– Microlitros
<b><math>\mu\text{m}</math></b>	– Micrómetro
<b><math>\mu\text{M}</math></b>	– Micromolar
<b>ADN</b>	– Ácido desoxirribonucleico
<b>AMP</b>	– Adenosil mono fosfato
<b>ANOVA</b>	– Análisis de varianza
<b>CICY</b>	– Centro de Investigación Científica de Yucatán
<b>cm</b>	– Centímetros
<b><i>et al.</i></b>	– Y colaboradores
<b>FDA</b>	– Food and Drug Administration = Agencia de Drogas y Alimentos
<b>g</b>	– Gramos
<b>g/L</b>	– Gramos por litro
<b>Gto</b>	– Guanajuato
<b>h</b>	– Horas



<b>HPLC</b>	– High Performance Liquid Chromatography = Cromatografía líquida de alta resolución
<b>ln</b>	– Logaritmo natural
<b>mg</b>	– Miligramos
<b>min</b>	– Minutos
<b>mL</b>	– Mililitros
<b>mL/L</b>	– Mililitros por litro
<b>mM</b>	– Milimolar
<b>NAD<sup>+</sup></b>	– Nicotin adenin dinucleótido oxidado
<b>nm</b>	– Nanómetros
<b>nM</b>	– Nanomolar
<b>OD</b>	– Optical Density = Densidad óptica
<b>RF</b>	– Relación de frentes
<b>rpm</b>	– Revoluciones por minuto
<b>SC</b>	– Sintético Completo
<b>sp</b>	– Sin especie
<b>UNAM</b>	– Universidad Nacional Autónoma de México
<b>WT</b>	– Wild Type = Silvestre
<b>X</b>	– Por
<b>YNB</b>	– Yeast Nitrogen Base = Base nitrogenada para levadura
<b>YNB-<i>lf</i></b>	– Yeast Nitrogen Base – low fluorescence = Base nitrogenada para levadura de baja fluorescencia
<b>YPD</b>	– Yeast Extract Peptone Dextrose = Extracto de levadura peptona dextrosa

## Lista de figuras

<i>Figura</i>	<i>Descripción</i>	<i>Página</i>
1	Especies de plantas medicinales ensayadas.	22
2	Arreglos de las placas para cada experimento.	24
3	Ensayo de la longevidad.	26
4	Cinéticas de crecimiento y análisis multivariable de la tasa de duplicación (T) para poblaciones tratadas con compuestos promotores de longevidad.	30
5	Curvas del porcentaje de la supervivencia de las poblaciones con los compuestos que tienen efecto en la CLS de <i>S. cerevisiae</i> , y su análisis estadístico.	33
6	Curvas del porcentaje de la supervivencia de las poblaciones con los compuestos que no presentan efecto en la CLS de <i>S. cerevisiae</i> .	35
7	Curvas del porcentaje de la supervivencia de las poblaciones de levadura incubadas con los extractos de infusiones acuosas.	38
8	Curvas del porcentaje de la supervivencia de las poblaciones de levadura incubadas con los extractos de decocciones acuosas.	42
9	Curvas del porcentaje de la supervivencia de las poblaciones de levadura incubadas con los extractos etanólicos.	46
10	Curvas del porcentaje de la supervivencia de las poblaciones de levadura incubadas con los extractos metanólicos.	48
11	Curvas del porcentaje de supervivencia de tres cepas de referencia incubadas con la infusión de hojas de <i>Bidens pilosa</i> , y su análisis estadístico multivariable.	51
12	Curvas del porcentaje de supervivencia de dos cepas de referencia incubadas con la infusión de flores de <i>Calendula officinalis</i> , y su análisis estadístico multivariable.	52

## Lista de figuras (Continuación)

<i>Figura</i>	<i>Descripción</i>	<i>Página</i>
<b>13</b>	Curvas del porcentaje de supervivencia de tres cepas de referencia incubadas con la infusión de hojas de <i>Lavandula angustifolia</i> , y su análisis estadístico multivariable.	54
<b>14</b>	Curvas del porcentaje de supervivencia de tres cepas de referencia incubadas con la decocción de hojas de <i>Eriobotrya japonica</i> (UNAM), y su análisis estadístico multivariable	55
<b>15</b>	Curvas del porcentaje de supervivencia de tres cepas de referencia incubadas con la decocción de hojas de <i>Eriobotrya japonica</i> (parque), y su análisis estadístico multivariable.	56
<b>16</b>	Curvas del porcentaje de supervivencia de tres cepas de referencia incubadas con extractos metanólicos, y su análisis estadístico multivariable.	57
<b>17</b>	Resultados del análisis por HPTLC de los extractos candidatos para identificar patrones de sus compuestos fenólicos.	61
<b>18</b>	Resultados del análisis por HPTLC de los extractos candidatos para identificar patrones de actividad antioxidante.	61
<b>19</b>	Curvas del porcentaje de decaimiento de las cepas mutadas en genes relacionados con el envejecimiento por aumentar la supervivencia, tratadas con extracto de níspero al 5%, y su análisis estadístico multivariable..	65
<b>20</b>	Curvas del porcentaje de decaimiento de las cepas mutadas para genes relacionados con el envejecimiento por disminuir la supervivencia, tratadas con extracto de níspero al 5%, y su análisis estadístico multivariable.	67
<b>21</b>	Vías regulatorias involucradas en incrementar la duración de la vida cronológica de la levadura (Longo <i>et al.</i> , 2012).	77

## Lista de tablas

<i>Tabla</i>	<i>Descripción</i>	<i>Página</i>
1	Concentración de compuestos promotores de longevidad.	28
2	Composición química reportada previamente para los extractos candidatos.	60

## Resumen

El envejecimiento es un proceso complejo causado por diversas vías moleculares que se ven influenciadas por factores genéticos y ambientales. Éste se define como la disminución de funciones y de la resistencia al estrés a través del tiempo, ocasionando el aumento en la mortalidad. Los efectos están relacionados con la acumulación continua de estresantes, que incrementan el daño a biomoléculas, comprometiendo eventualmente la homeostasis celular (Argyropoulou *et al.*, 2013). Por lo anterior, el envejecimiento es el factor de riesgo más importante en padecimientos crónicos como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, las enfermedades neurodegenerativas y la diabetes, entre otros (Longo *et. al.*, 2012; Masoro, 2009).

La intervención que se ha estudiado por su efecto en extender la longevidad de los organismos es el uso de compuestos naturales. La metformina, el extracto de ginseng y una lista creciente son ejemplos de compuestos obtenidos de plantas medicinales que se usaron originalmente para combatir enfermedades que se desarrollan en la vejez y que posteriormente se identificó que tenían efectos en el retraso del envejecimiento. Esto lleva a pensar que el efecto de las plantas medicinales para combatir una enfermedad es sólo una consecuencia y que el efecto directo del extracto es reducir los daños y activar mecanismos de protección desembocando en un incremento de la salud y en un retraso del envejecimiento, dando como resultado final, retrasar la aparición de enfermedades o combatirlos (Argyropoulou *et al.*, 2013).

Además, los ejemplos antes mencionados nos llevan a considerar otro punto interesante, que la extensión del tiempo de vida mediante la interacción con compuestos provenientes de plantas es un fenómeno común y que se podrían identificar otros mediante rastreos a gran escala. Cabe resaltar que el efecto de muchos de los compuestos ya conocidos se identificó originalmente en los organismos modelo más simples, como la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Kaeberlein, 2010).

Es por ello que el objetivo del presente trabajo fue identificar extractos de plantas medicinales que extendieran la longevidad usando un método automatizado para el análisis masivo del tiempo de vida cronológica (CLS) de *S. cerevisiae*.

Para cumplir con el objetivo general, primeramente se elaboró una base de datos de compuestos promotores de longevidad, enfocándose principalmente en aquellos compuestos aislados de plantas. Se recopiló información de 40 compuestos, 35 de ellos provenientes de plantas; se describieron sus mecanismos de acción, así como los organismos modelo donde se han probado y la información relacionada con sus efectos en el envejecimiento. También se elaboró una base de datos con más de 30 extractos crudos de plantas promotoras de longevidad, describiendo la especie y parte de la planta usada para obtener el extracto, el tipo de extracto y los organismos modelo donde se probaron, y la información que se tienen del efecto del extracto en el envejecimiento. Además, se elaboró una base de datos de especies de plantas medicinales usadas en la cultura popular mexicana y las más usadas en general para tratar enfermedades relacionadas con la vejez, formada por 100 especies con efecto documentado para tratarlas.

A partir de la base de datos de los compuestos promotores de la longevidad se eligieron siete para realizar un ensayo prueba. El ensayo mostró que tres compuestos, metformina, espermidina y rapamicina, incrementan significativamente la CLS de la levadura, lo cual concuerda con los resultados descritos por otros grupos. Nuestro ensayo automatizado de densidad óptica demostró que es capaz de identificar compuestos o extractos que extienden la longevidad en el modelo del envejecimiento cronológico de la levadura *S. cerevisiae*.

Posteriormente, la base de datos de plantas medicinales se usó como referencia para la recolección de las 30 especies (36 muestras), y para la preparación de los extractos. Se realizó un rastreo a gran escala de extractos de plantas medicinales que fueran capaces de extender la longevidad en el envejecimiento cronológico de la levadura *S. cerevisiae*, revelando que extractos de seis plantas: *Acrocomia mexicana*, *Bidens pilosa*, *Calendula officinalis*, *Eriobotrya japonica* (dos muestras biológicas), *Lavandula angustifolia*, *Sedum dendroideum*, incrementaban significativamente la CLS de la levadura. Los seis extractos candidatos se probaron en tres cepas de referencia, mostrando que todas tenían efecto en incrementar la CLS de la cepa diploide S288c, pero muestran una variación en el efecto hacia las cepas haploides S288c y YEG01.

Además, para los seis extractos se caracterizó su perfil de compuestos fenólicos y el efecto antioxidante, identificando al ácido 3,4 dimetoxicinámico en el extracto de *L. angustifolia*, la rutina y el ácido clorogénico en *C. officinalis* y el ácido clorogénico en *E. japonica*; y un efecto antioxidante en los extractos de *L. angustifolia* y *E. japonica*.

Finalmente, se identificó el mecanismo de acción del extracto de *E. japonica* usando algunas cepas mutantes para genes relacionados con el envejecimiento. Se determinó que el efecto del extracto de *E. japonica* depende de Ras2 y Swr1 para incrementar la CLS de la levadura; que el extracto potencia el efecto de la ausencia de Ald6, pero sin interactuar directamente con ella; que compensa la falta del gen *STE12*; y que además de compensar, mejora la CLS en mutantes en el gen *HAP3*.

Con estos datos se concluyó que el ensayo automatizado es efectivo para identificar extractos y/o compuestos que incrementan la CLS de la levadura; que a través de este ensayo se identificaron seis extractos de plantas medicinales que extienden la vida cronológica de *S. cerevisiae*; y que se identificó el mecanismo de acción para uno de ellos, el extracto de *E. japonica*. Esto nos permite plantearnos nuevas perspectivas, como probar los seis extractos con diversos aislados naturales de *S. cerevisiae*, identificar los compuestos individuales de los extractos que son los responsables del efecto, identificar el mecanismo de acción de los cinco extractos restantes, probar el efecto de los extractos en otros organismos modelo, y, por supuesto, probar las 70 especies de plantas medicinales restantes, propuestas en la base de datos.

## Abstract

Aging is a complex process caused alterations in diverse molecular pathways that are influenced by genetic and environmental factors. Aging is defined as the diminishment of functions and stress resistance of an individual through the time; causing a reduction in life expectancy. These effects are related to the continuous accumulation of stressors; increasing the damage to biomolecules, and compromising eventually the cellular homeostasis (Argyropoulou *et al.*, 2013). Therefore, aging is the most important risk factor in chronic diseases such as cancer, cardiovascular diseases, neurodegenerative diseases, and diabetes, among others (Longo *et. al.*, 2012; Masoro, 2009).

Environment interventions are being studied to extend longevity in organisms; one of them is the use of natural compounds. Metformin, ginseng extract, and an increasing list of plant extracts are examples that were firstly used against age-related diseases. Afterwards, it was noticed an effect in delaying the aging process. An alternative explanation for the effect of medicinal plants against diseases is that it was just a consequence of the direct effect to reduce the damage and delay the aging process. The final result would be in either case a delay in the appearance of age-related diseases or an opposition against them (Argyropoulou *et al.*, 2013).

The previous examples allowed us to consider that the lifespan increment given by the use of plant compounds is a common phenomenon, and that more could be identified by high throughput screenings. Worth to mention is that there are several anti-aging compounds that were identified within the simplest model organisms, for example the *Saccharomyces cerevisiae* yeast (Kaeberlein, 2010).

Thereby, the main objective in this project was to identify medicinal plant extracts that increase the longevity, by means of an automatized massive analyzing method, measuring their effect on the chronological lifespan (CLS) of *S. cerevisiae*.

In order to accomplish this objective, it was firstly necessary to elaborate a database of known anti-aging compounds, focusing primarily in isolated plant compounds. This database holds information for 40 compounds from which 35 were isolated from plants; their anti-aging related information, their action mechanisms, and



the model organisms where they were tested. Further on, a database for 30 longevity promoting plant crude extracts was elaborated; the database holds descriptions for the plant species, the plant used part, the extract type, the tested model organisms used for each extract, and the anti-aging related information for each extract. Furthermore, a database for medicinal plants species used in Mexican popular culture and the most used in general to treat age-related diseases was elaborated; this database holds 100 species with documented effect.

Starting from the longevity promoting compound database, seven anti-aging compounds were chosen in order to perform a testing assay. The testing assay proved that three compounds; metformin, spermidine and rapamycin, significantly increased the yeast CLS, which matches other group's results. Our optic density automatized assay was capable to identify compounds or extracts that do extend longevity in the chronological aging model for *S. cerevisiae*.

Afterwards, the medicinal plant database was used as a reference in order to gather 30 species (36 samples) and later on to prepare the extracts. A massive medicinal plant extract screening was performed, considering their capacity to extend longevity in the chronological aging model for *S. cerevisiae*. This screening revealed that extracts from six plants: *Acrocomia mexicana*, *Bidens pilosa*, *Calendula officinalis*, *Eriobotrya japonica* (two biological samples), *Lavandula angustifolia*, and *Sedum dendroideum*, were capable to significantly increase the yeast CLS. The six candidate extracts were tested on three reference yeast strains, demonstrating that all of them had a visible effect in the CLS increment for diploid strain S288c, but there was an appreciable variation in the effect on haploid strains S288c and YEG01. Additionally, the phenolic compounds profile and their antioxidant effect were characterized for the six extracts; identifying 3,4 dimetoxycinnamic acid in *L. angustifolia* extract, rutin and chlorogenic acid in *C. officinalis* extract, chlorogenic acid in *E. japonica* extract, and antioxidant effect in the *L. angustifolia* and *E. japonica* extracts.

Finally, the mode of action of *E. japonica* extract was identified using aging related gene mutant. It was determined that the yeast CLS increment by effect of *E. japonica* extract depended on Ras2 and Swr1; the extract improved the effect of Ald6

absence, and that although the active compound of the extract does not interact directly with it; the extract compensated the *STE12* gene absence; and it improved the CLS in *HAP3* mutants.

From this study it was concluded that extracts and/or compounds that increase yeast CLS can be effectively identified by the automatized assay; that six medicinal plant extracts that increase the chronological lifespan for *S. cerevisiae*, were identified through this assay; and that the action mechanism from one of them (*E. japonica* extract) was identified. These results allow us to propose new perspectives for this research; to test the six extracts on different natural isolates of *S. cerevisiae*, to identify individual extract compounds responsible for the anti-aging effect, to identify the action mechanism for the non-tested five extracts, to test the extract effect in other model organisms and, of course, to test the 70 remaining medicinal plant species from the database.

## 1.0 Introducción

El envejecimiento puede definirse como un desequilibrio entre el daño celular y sus mecanismos de reparación. Los organismos están expuestos constantemente a estresantes internos, relacionados con el metabolismo, y externos, relacionados con el ambiente y la dieta, que producen daño en las biomoléculas celulares. Sin embargo, los organismos cuentan con mecanismos de reparación, como neutralización de los estresantes, identificación y reparación del daño, eliminación de biomoléculas disfuncionales, que les permiten mantener bajos los niveles del daño. Sin embargo, una vez que el organismo empieza a envejecer, estos mecanismos se ven gradualmente comprometidos, y eventualmente se deterioran las funciones celulares produciendo la acumulación de altos niveles de estresantes, incrementando la discapacidad y la morbilidad, y llegando inevitablemente a la muerte (Argyropoulou *et al.*, 2013).

Por lo anterior, el envejecimiento es el factor de riesgo más importante en padecimientos crónicos como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, las enfermedades neurodegenerativas y la diabetes, entre otros. Esto ha llevado a incrementar el interés en estudiar las bases biológicas del envejecimiento y de la extensión de la duración de la vida, convirtiéndose en un tema de suma importancia para los humanos (Longo *et al.*, 2012; Masoro, 2009).

El estudio del envejecimiento en humanos es muy complejo porque está dado por la interacción entre factores genéticos, epigenéticos, ambientales e incluso culturales (Capri *et al.*, 2006). Por lo tanto, se han buscado organismos modelo apropiados para el estudio del envejecimiento. Entre éstos se encuentran las levaduras, los gusanos, las moscas y los roedores, porque conservan vías y genes relacionados al envejecimiento en los humanos (Kenyon, 2010).

De estos organismos, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es uno de los mejores candidatos por la relativa facilidad y rapidez con que la longevidad se puede cuantificar. Esto ha permitido un rápido progreso para definir mecanismos moleculares del envejecimiento e identificar factores que modifican su longevidad, tal como el efecto de sustancias anti-envejecimiento (Kaeberlein, 2010; Longo *et al.*, 2012).

Los compuestos naturales, por sus diversas estructuras, pueden ser candidatos químicos para aumentar la salud e incrementar la duración de la vida o retrasar el envejecimiento. Una parte de los compuestos naturales, que pueden estar como moléculas puras o en extractos crudos, se han encontrado que retrasan la senescencia celular o el envejecimiento *in vivo*. Es interesante recalcar que un gran número de estos compuestos naturales son metabolitos provenientes de plantas que se han usado como medicinales (Argyropoulou *et al.*, 2013).

Existe un gran número de plantas con propiedades terapéuticas ampliamente usadas por el hombre en la medicina tradicional. A pesar de su uso para combatir diabetes, artritis, desórdenes cardíacos, desórdenes neurodegenerativos, y diversos tipos de cáncer, entre otras, se sabe poco sobre los metabolitos responsables de sus efectos y de sus mecanismos de acción. Es probable, por lo tanto, que sus blancos puedan tener efectos benéficos o adversos en la longevidad de las células.

En este trabajo se propuso identificar extractos de plantas medicinales que tuvieran efecto sobre el envejecimiento de la levadura *S. cerevisiae*. En particular, se planteó probar aquellos extractos que han sido usados tradicionalmente para tratar enfermedades típicas en la vejez y proponerlos como candidatos a compuestos naturales anti-envejecimiento que permitan, a largo plazo, retrasar el envejecimiento en otros organismos, incluyendo el humano, y aumentar el tiempo de vida sana.

## 2.0 Antecedentes

### 2.1 Procesos celulares e intervenciones que promueven la longevidad y retrasan el envejecimiento

Ya se mencionaron los efectos asociados al envejecimiento, su definición y sus causas (Argyropoulou *et al.*, 2013). Cabe señalar que se ha encontrado que existen mutaciones que atrasan el envejecimiento, retrasando la aparición de las enfermedades relacionadas con la vejez y promoviendo la extensión de la duración de la vida. Este vínculo abre la posibilidad de combatir muchas enfermedades como un solo fenómeno, el envejecimiento (Kenyon, 2010).

Muchas de las mutaciones que extienden la duración de la vida afectan genes de respuesta a estrés o a sensores de nutrientes. Entre éstos está TOR (kinase target of rapamycin = cinasa blanco de rapamicina), insulina/IGF-1 (insulin/insulin-like growth factor = insulina/insulina como factor de crecimiento), AMPK (AMP-activated protein kinase = proteína cinasa activada por AMP) y sirtuinas (deacetilasas de proteínas dependientes de NAD<sup>+</sup>) (Greer *et al.*, 2007; Kaeberlein *et al.*, 2005; Kenyon, 2010; Rogina & Helfand, 2004).

Se ha observado que al inhibir la vía de señalización por insulina, insulina/IGF-1, se incrementa la duración de la vida; activando factores de transcripción de respuesta a estrés (FOXO, heat shock, respuesta a xenobióticos), que a su vez activan genes de respuesta a estrés (catalasas y SOD2) y la autofagia. Por su parte, al inhibir TOR, que es el mayor sensor de aminoácidos y nutrientes, se observa un incremento en la longevidad; se activan factores de transcripción de respuesta a estrés que promueven la autofagia, así como la inhibición de la S6 cinasa que produce una inhibición de la traducción. Las AMPK's son nutrientes y sensores de energía; su sobreexpresión extiende la duración de la vida, activando factores de transcripción de respuesta al estrés. Estas tres respuestas se han conservado desde las levaduras hasta los mamíferos. Finalmente, el sobreexpresar las sirtuinas extiende la longevidad en levaduras, gusanos y moscas, activando factores de transcripción de respuesta al estrés (Kenyon, 2010).

El bloquear por completo alguna vía puede tener consecuencias importantes sobre el tiempo de la vida. Por ejemplo, en ratones, el eliminar la vía insulina/IGF-1 causa el desarrollo de la diabetes (Selman *et al.*, 2008). Sin embargo, se puede fomentar pequeñas perturbaciones en su expresión para aumentar la duración de la vida, incluso se cree que el efecto puede incrementar la duración de la vida en humanos. Es por ello que se buscan intervenciones del medio que interactúen con los genes relacionados con el envejecimiento, fomentando un efecto similar a las mutaciones y que aumenten la duración de vida del organismo.

La intervención que más se ha descrito que extiende la longevidad en los diversos organismos modelo, desde levaduras hasta primates, es la restricción calórica o dietética. Ésta se refiere al consumo reducido de calorías totales en una dieta, sin llegar a la malnutrición. La restricción calórica incrementa la longevidad, pero también reduce el riesgo de un gran número de las enfermedades relacionadas con la edad (Argyropoulou *et al.*, 2013; Bioshop & Guarente, 2007). El efecto de la restricción calórica de aumentar la duración de la vida y retrasar el envejecimiento se ha relacionado con la inhibición de las vías insulina/IGF-1 y TOR (Kenyon, 2010).

Otra de las intervenciones del medio que se ha estudiado es el uso de los compuestos naturales; su amplio rango de actividades biológicas y su diverso número de estructuras son una fuente para buscar nuevos candidatos que retrasen el envejecimiento. Se ha demostrado que los compuestos naturales pueden ser usados como moduladores de vías involucradas en la regulación del envejecimiento, por ejemplo, cuando se mimetiza el efecto de la restricción calórica al atenuar señales de vías de censado de nutrientes; también pueden actuar como protección a biomoléculas, neutralizando estresantes o activando sutilmente vías de respuesta al estrés (Argyropoulou *et al.*, 2013; Lutchman *et al.*, 2016).

## 2.2 *Productos naturales que promueven el incremento en la duración de la vida*

Los compuestos naturales que retrasan el envejecimiento a nivel de organismo se han clasificado principalmente en aislados de microorganismos y aislados de plantas, por su

procedencia. La rapamicina es un compuesto proveniente de la bacteria *Streptomyces hygroscopicus* que tiene uso médico como un inmunosupresor. Organismos como levaduras, gusanos, moscas y ratones han sido tratados con rapamicina mostrando una extensión en la duración de la vida en comparación con los organismos no tratados. En los ratones se observó el efecto incluso cuando se inicia el tratamiento en una etapa de edad tardía, hasta 600 días, el equivalente a 60 años humanos. El aumento en la longevidad de los organismos cuando se tratan con rapamicina se da a través de la inhibición directa de la proteína Tor, así como el incremento en la autofagia (Alvers *et al.*, 2009; Argyropoulou *et al.*, 2013; Laplante & Sabatini, 2012; Rallis *et al.*, 2013).

Un ejemplo de un compuesto natural que se aisló de una planta es el resveratrol, el cual es un polifenol que se encuentra en las uvas y el vino tinto. En las levaduras, el resveratrol actúa como un mimetizador de la restricción calórica estimulando a *SIR2* e incrementando la duración de la vida hasta en un 70% (Howitz *et al.*, 2003). En gusanos y moscas también extiende la longevidad a través de *SIR2*; para el caso de ratones con dietas altamente calóricas mejora la salud y supervivencia, y en ratones sanos retarda el deterioro causado por la edad (Baur *et al.*, 2006; Pearson *et al.*, 2008).

Otro caso interesante es la metformina, que es una biguanida proveniente de la planta medicinal *Galega officinalis* y que ha sido usada comúnmente para combatir la diabetes tipo 2 en humanos. Además de su efecto antidiabético, en estudios más recientes se observó que en gusanos tratados con metformina incrementaban su salud y locomoción, y extendían su longevidad (Onkel & Driscoll, 2010). Y en hembras de ratón que fueron tratadas con metformina retrasaba el envejecimiento y aumentaba la duración de la vida (Anisimov *et al.*, 2008). Actualmente se ha identificado a la metformina como un mimetizador de la restricción calórica que activa AMPK, siendo esta regulación la que incrementa la duración de la vida en los organismos (Kalra *et al.*, 2016).

Además de probar moléculas provenientes de plantas como las antes mencionadas, se han probado extractos crudos por representar una fuente valiosa de compuestos bioactivos naturales con potencial para retrasar el envejecimiento en organismos modelo. Cabe mencionar que los efectos biológicos en la extensión de la longevidad pueden ser atribuidos a un número reducido de fitoquímicos o incluso estar

mediado por una sola molécula bioactiva. Es por ello que el objetivo final de trabajar con extractos crudos es identificar los ingredientes bioactivos; sin embargo, no hay que perder de vista que para un gran número de casos el efecto puede resultar de la sinergia de la acción de muchos compuestos que al ser probados individualmente pierden su efecto (Argyropoulou *et al.*, 2013).

El extracto crudo de ginseng (*Panax ginseng*) ha sido usado en la medicina hebolaria tradicional de Asia por más de 2,000 años. Estudios clínicos han mostrado que mejora las funciones fisiológicas, las funciones inmunes y condiciones asociadas con la diabetes. Actualmente se encuentra en pruebas clínicas para identificar su potencial para reducir los riesgos en enfermedades cardiovasculares y en un futuro convertirse en un apoyo para el control de la presión vascular (Komishon *et al.*, 2015). Además de estos beneficios, la decocción de la raíz extiende la duración de la vida de *Caenorhabditis elegans*, incrementando la expresión de proteínas pequeñas de choque térmico y atenuando los niveles intracelulares de peróxido de hidrógeno (Yu *et al.*, 2010).

La metformina, el extracto de ginseng y una lista creciente son ejemplos donde una planta medicinal se usó originalmente para combatir una enfermedad que se desarrolla en la vejez y que posteriormente se identificó que tenía efecto en el retraso del envejecimiento. Esto nos lleva a pensar que el efecto de las plantas medicinales de combatir la enfermedad sea sólo una consecuencia y que el efecto directo del extracto sea reducir los daños y activar mecanismos de protección desembocando en un incremento de la salud y en un retraso del envejecimiento, dando como resultado final, retrasar la aparición de enfermedades o combatirlas (Argyropoulou *et al.*, 2013).

Además, los ejemplos antes mencionados nos llevan a considerar otro punto interesante, que la extensión del tiempo de vida mediante la interacción con compuestos provenientes de plantas es un fenómeno común y que se podrían identificar otros mediante rastreos a gran escala. Cabe resaltar que muchos de los compuestos ya conocidos se identificaron originalmente en los organismos modelo más simples, como la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Kaeberlein, 2010).



### 2.3 *Saccharomyces cerevisiae* como modelo para el estudio del envejecimiento

Estudios en organismos modelo como *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster* han revelado que muchos procesos biológicos están altamente conservados. Uno de dichos fenómenos es el envejecimiento. Indicio de esto es que en muchos eucariontes se observa un decaimiento exponencial en el estado físico y la fecundidad a través del tiempo, pero se vuelve más evidente después de la fase reproductiva (Sinclair *et al.*, 1998).

La levadura *S. cerevisiae* es uno de los organismos modelo más importantes en la investigación relacionada con el envejecimiento. No solo porque fue el primer organismo eucariótico en tener secuenciado su genoma completo y fue el primer organismo que se estudió a nivel transcriptómico, sino que además en comparación con otros sistemas, la facilidad y rapidez con la cual la longevidad puede ser cuantificada ha permitido un progreso rápido para definir procesos moleculares involucrados con su envejecimiento, además de la identificación de factores que pueden modificar su longevidad. Otras ventajas son las diversas colecciones de cepas con genes eliminados individualmente, lo que nos permite un mayor entendimiento y su comparación con otros organismos como los humanos, ya que aproximadamente el 45% de los genes de *S. cerevisiae* son homólogos con los genes de mamíferos y cientos de genes que han sido relacionados con enfermedades en humanos tienen un ortólogo en la levadura. Incluso, recientemente, se remplazaron 414 genes esenciales de la levadura con genes ortólogos humanos mostrando que 47% de los genes de la levadura (176 genes) pueden ser “humanizados” exitosamente (Huges, 2002; Kachroo *at al.*, 2015; Kaeberlyn, 2010).

Lo que hemos llegado a entender sobre el envejecimiento en la levadura nos ha llevado a establecer que algunos aspectos son específicos del organismo, pero que los más importantes se han conservado evolutivamente. Este alto grado de conservación en procesos celulares ha hecho de *S. cerevisiae*, además, un sistema valioso para identificar nuevos compuestos con rastreos a gran escala, conocer sus blancos y tener un análisis detallado de sus efectos celulares. Un ejemplo de ello es la inhibición del complejo TOR cinasa por la rapamicina, cuyo efecto se observó inicialmente en la longevidad de la levadura y posteriormente se observó en otros organismos, incluso en ratones,

incrementando la duración de la vida. Es importante destacar que los compuestos naturales anti-envejecimiento como la rapamicina, el resveratrol y la espermidina, fueron primeramente identificados y caracterizados en la levadura, y actualmente se encuentran en fase de pruebas clínicas. Sin embargo, cabe resaltar que *S. cerevisiae* no sólo se ha usado para identificar compuestos anti-envejecimiento, sino también para identificar extractos crudos que tengan un efecto semejante. Recientemente se identificaron seis extractos de plantas que extienden significativamente la duración de la vida de la levadura y que además mostraron tener un efecto geroprotector (Huges, 2002; Kaeberlyn, 2010; Lutchman *et al.*, 2016).

En la levadura se han establecido dos modelos del envejecimiento para su estudio: el envejecimiento replicativo y el envejecimiento cronológico. El envejecimiento replicativo es un modelo de envejecimiento de células mitóticamente activas en donde la duración de la vida de la célula madre es definida por el número de células hijas que produce antes de la senescencia. La RLS (Replicative Lifespan = Tiempo de la vida replicativa) es medida por la remoción física de las células hijas, que son fáciles de distinguir por su menor tamaño que el de la célula madre cuando se observan en el microscopio óptico. El envejecimiento cronológico es un modelo de envejecimiento para células post-mitóticas en donde la duración de la vida se define como el tiempo que una célula de levadura puede sobrevivir en un estado de quiescencia o no división. La CLS (Chronological Lifespan = Tiempo de la vida cronológica) ha sido medida cultivando las células, principalmente en medios líquidos, hasta entrar en un estado de no división después de que la fuente de carbono se termina (Kaeberlyn, 2010; Longo *et al.*, 2012).

La naturaleza del daño es particular para cada modelo. En el replicativo, el daño producido en la división celular es asimétrico y afecta principalmente a la célula madre produciéndole el envejecimiento. Los círculos de ADN ribosomal extracromosomal nuclear, proteínas oxidadas en el citoplasma y el daño mitocondrial contribuyen a la senescencia replicativa. Por su parte, en el modelo cronológico, el daño se acumula a través del tiempo en la célula que no se divide hasta alcanzar un daño severo evitando que la célula pueda reingresar al ciclo celular; es así que el etanol acumulado

inicialmente se convierte en ácido acético induciendo una respuesta apoptótica y a la muerte celular. Hasta el momento no se ha encontrado una correlación fuerte entre RLS y CLS. Se ha observado que se puede incrementar la CLS sin mostrar cambios en la RLS de la levadura, además que el envejecimiento cronológico ocurre cuando la duración de vida replicativa aún no se ha afectado. Sin embargo, hay casos específicos donde al incrementar la CLS también incrementa la RLS, por ejemplo en la supresión del gen que codifica para la S6 cinasa ribosomal, homóloga en levadura *SCH9*, donde primero se observó un incremento en la CLS y posteriormente un incremento similar en la RLS. El incremento en la longevidad también se observó en gusanos, moscas y ratones. Ambos ensayos, CLS y RLS, han sido usados para un primer acercamiento en el campo de estudio del envejecimiento (Fabrizio & Longo, 2003; Kaeberlyn, 2010; Sinclair *et al.*, 1998).

Los genes principales y las vías que regulan la CLS de la levadura y que son similares en gusanos, moscas y mamíferos son las del censado de nutrientes y del control de su utilización. Éstas son la vía Tor/S6K que es activada por aminoácidos y otros nutrientes, y la vía Ras/AC (adenilato ciclasa)/PKA (protein kinase A = proteína cinasa A) que es la principal vía activada por glucosa y que también se ve afectada por otros nutrientes. A pesar de que las dos vías se traslapan parcialmente, tienen efectos pro-envejecimiento distintos. Un modo primario de acción en estas vías es la convergencia sobre el regulón de resistencia a estrés que incluye a Rim15 y a factores de transcripción como Msn2/Msn4 y Gis1; además estos factores regulan el metabolismo y la acumulación y utilización de fuentes de carbono intra y extracelular. Sir2 también está conectado a la actividad de Msn2/Msn4, sin embargo, los efectos en la CLS son complejos. Los mecanismos que incrementan la CLS en levaduras son la inhibición de las vías Tor/S6K o Ras/AC/PKA, y la expresión de genes de respuesta a estrés para la protección de daño a macromoléculas y estrés celular; y se ve afectada por daño severo, por las vías de estrés pro-senescencia que incluyen el estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, especies reactivas de oxígeno (ROS), reducción de la autofagia, daño al ADN nuclear, mutagénesis y replicación de estrés, además por las alteraciones metabólicas y por el estrés extrínseco (Kaeberlein, 2010; Longo *et al.*, 2012).

Finalmente, en años recientes se desarrolló una estrategia sistemática para encontrar factores de longevidad en *S. cerevisiae* y la interacción genética de estos factores. Este trabajo se desarrolló mediante un ensayo automatizado basado en competición para la CLS, definida como fase estacionaria de supervivencia de poblaciones de levaduras, permitiendo un ensayo masivo de alrededor de 5,600 genes con mutaciones simples o dobles (Garay *et al.*, 2014). Este ensayo automatizado para CLS en la levadura permite analizar un gran número de muestras y producir miles de datos, que pueden ser fácilmente extrapolados al rastreo masivo de extractos de plantas medicinales para identificar candidatos de compuestos naturales anti-envejecimiento. Este tipo de ensayo permitirá analizar un mayor número de genes relacionados con el envejecimiento para dilucidar los mecanismos de acción de un extracto candidato.

### **3.0 Hipótesis**

Existen extractos de plantas que son efectivos para el tratamiento de diversas enfermedades típicas de la vejez. La acción de algunos de éstos está relacionada con un efecto benéfico sobre la longevidad celular y, por lo tanto, extienden la longevidad de células de *Saccharomyces cerevisiae* en el laboratorio.

## 4.0 Objetivo general

Identificar extractos de plantas que extienden la longevidad usando un método automatizado para el análisis masivo del tiempo de la vida cronológica (CLS) de *Saccharomyces cerevisiae*.

### 4.1 Objetivos específicos

- 1) Elaborar una base de datos que incluya los compuestos conocidos como promotores de la longevidad y, por otra parte, cien plantas con efecto documentado para tratar enfermedades.
- 2) Realizar un ensayo prueba para medir el efecto de siete compuestos previamente identificados como promotores de longevidad sobre el tiempo de la vida cronológica de *Saccharomyces cerevisiae*.
- 3) Determinar el efecto de al menos treinta extractos de plantas sobre el tiempo de la vida cronológica de *Saccharomyces cerevisiae*.
- 4) Caracterizar el perfil de compuestos fenólicos y el efecto antioxidante de los extractos que muestren efecto en la extensión del tiempo de la vida cronológica de *Saccharomyces cerevisiae*.
- 5) Identificar el mecanismo de acción de al menos un extracto que haya mostrado efecto en la extensión del tiempo de la vida cronológica de *Saccharomyces cerevisiae*, usando mutantes en los genes relacionados al envejecimiento.

## 5.0 Materiales y métodos

### 5.1 Elaboración de las bases de datos

Para la elaboración de las bases de datos se hizo una búsqueda intensiva vía internet, principalmente en los sitios de PubMed y Google Scholar, usando palabras clave como “longevidad”, “envejecimiento”, “tiempo de vida”, los nombres de los compuestos, y los nombres científicos de las plantas, entre otras. Para corroborar que toda la información estuviera documentada, se hizo una revisión en artículos publicados en revistas científicas que evaluaran las propiedades biológicas requeridas para cada base de datos. Para la base de datos de compuestos promotores de la longevidad se corroboró el nombre del compuesto, su procedencia, los organismos modelo donde se ha comprobado el efecto y los mecanismos de acción identificados del compuesto. En el caso de la base de datos de extractos crudos de plantas con efecto sobre la longevidad, los datos corroborados fueron el nombre científico, el nombre común, la parte de la planta y el tipo de extracto que se probó, el organismo modelo donde se observó el efecto y los datos relevantes observados. Finalmente, para la base de datos de plantas medicinales se verificó el nombre científico, nombre común y la familia, la parte de la planta, el tipo de extracto y el efecto documentado de la o las enfermedades relacionadas a la vejez que contrarresta.

### 5.2 Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y medios

Se trabajó con tres cepas de referencia: S288c diploide proveniente de aislados naturales de la colección de Liti *et al.* (2009); S288c (Mat $\alpha$  *ura3::KanMX ho::mCherry-Nat*) y YEG01 (Mat $\alpha$  *PDC1-mCherry-CaURA3MX4 can1 $\Delta$ ::STE2pr-SpHIS5 lyp1 $\Delta$  his3 $\Delta$ 1 ura3 $\Delta$ 0 LEU2*), esta última cepa además tiene  $\Delta$ *ho::NatMX* para usarse como referencia con mutantes simples o  $\Delta$ *ho::NatMX  $\Delta$ his3::KanMX* para usarse como referencia con mutantes dobles. Se trabajó con catorce mutantes simples:  $\Delta$ *ald6*,  $\Delta$ *atg21*,  $\Delta$ *cyb5*,  $\Delta$ *gis1*,  $\Delta$ *hap3*,  $\Delta$ *his1*,  $\Delta$ *ras2*,  $\Delta$ *rim15*,  $\Delta$ *rps14A*,  $\Delta$ *ste12*,  $\Delta$ *swr1*,  $\Delta$ *tor1*,  $\Delta$ *msn2*,  $\Delta$ *msn4* ( $\Delta$ *x::NatMX*) y la doble mutante  $\Delta$ *msn2 $\Delta$ msn4*

( $\Delta x::NatMX$   $\Delta y::KanMX$ ); todas ellas provenientes de nuestro laboratorio y con fondo genético YEG01.

Para los experimentos de determinación de las cinéticas de crecimiento y el ensayo de longevidad se usó el medio SC-Aging (Longo *et al.*, 2012). Como medio de salida en el ensayo de longevidad se usó el medio YNB-1f (DeLuna *et al.*, 2008).

### 5.3 *Compuestos promotores de la longevidad*

En este proyecto se probaron siete compuestos previamente descritos como promotores de la longevidad: la cafeína, la curcumina, la espermidina, la rapamicina, el resveratrol, la metformina y la dapsona. Las primeras cinco fueron obtenidas de la casa comercial Sigma, mientras la metformina (clohidrato de metformina, 850 g, Genexx) y la dapsona (100 g, Depsoderm-X) fueron obtenidas como pastillas de uso médico.

De cada compuesto se hizo una solución stock con una concentración molar definida disolviendo los compuestos en medio SC-Aging; las soluciones stock se esterilizaron por filtración en filtros Millipore de 0.22  $\mu\text{m}$  de poro. Se hicieron diluciones a partir de la solución stock para tener cinco concentraciones molares de cada compuesto.

### 5.4 *Plantas medicinales y preparación de extractos*

Las 30 especies de plantas medicinales probadas en este proyecto fueron colectadas entre los años 2014-2015; 18 especies fueron colectadas en el Jardín Botánico Regional “Roger Orellana”-Vivero de plantas nativas del CICY; 11 especies fueron colectadas del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM; una especie fue germinada y creció en los invernaderos del LANGEBIO, Cinvestav con semillas proporcionadas por el Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM. Todas las plantas se secaron en prensa o en sílica.



En total se trabajaron 36 muestras debido a que en algunas especies se tenían varias partes de la planta. En la Figura 1 se muestra el nombre científico de la planta, la parte de la planta usada y el tipo de extracto.

Se trabajó con cuatro tipos de extracciones: infusión, decocción, etanólica y metanólica. Para todas las muestras se pesó un gramo de muestra seca y se trituró con mortero y pistilo. La extracción en cada caso se hizo de la siguiente manera:

- Infusión: a la muestra se agregaron 10 mL de agua destilada a 90°C, manteniendo la temperatura por un periodo de 30 min. Posteriormente se dejó enfriar hasta 25°C y se tomó sólo el extracto líquido.

- Decocción: a la muestra se agregaron 15 mL de agua destilada, se elevó la temperatura hasta 150°C y se dejó hirviendo por 10 min. Posteriormente se dejó enfriar hasta 25°C y se tomó sólo el extracto líquido.

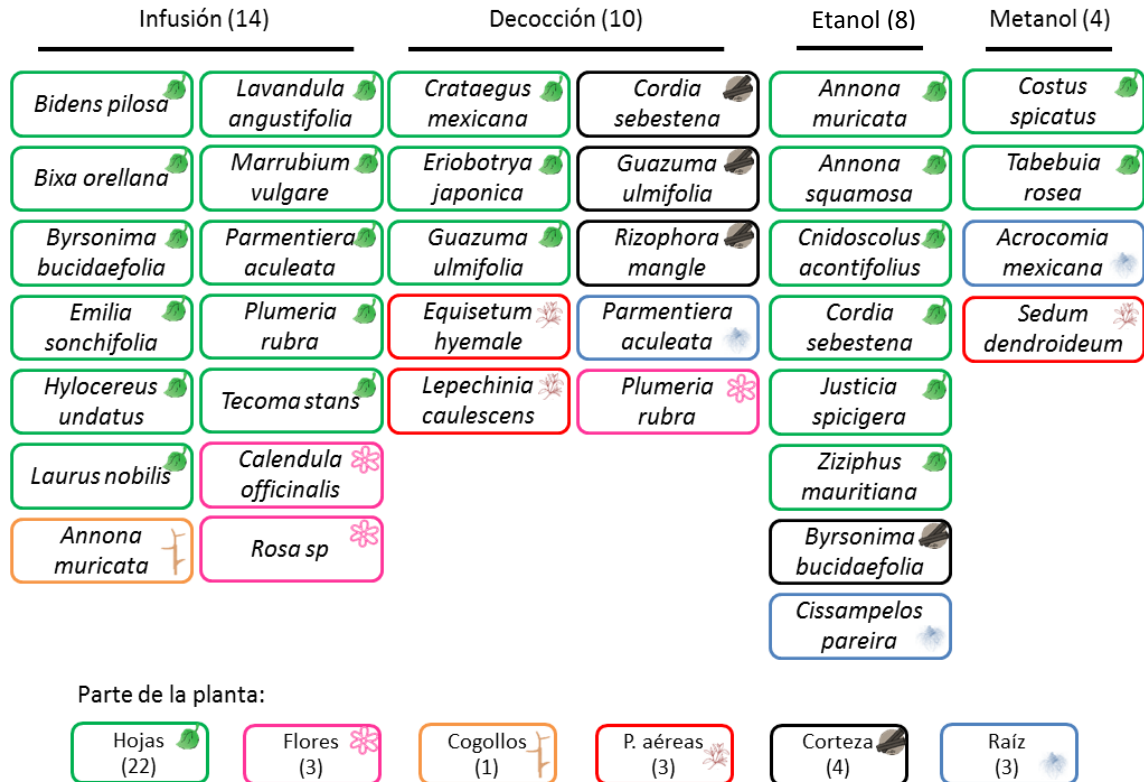
- Extracto con etanol: las muestras se empaquetaron en papel filtro. Para la extracción se usó etanol 96° (Karal); y el programa de extracción en el aparato Soxhlet fue el siguiente: 2:00 h de extracción, 15 min de lavado y 1:30 h de evaporación. Para eliminar todo el etanol, las muestras se secaron en un rotavapor múltiple y posteriormente con nitrógeno gaseoso. Los extractos se resuspendieron en 1.5 mL de agua destilada.

- Extracto con metanol: las muestras se empaquetaron en papel filtro. Para la extracción se usó metanol absoluto grado HPLC (Karal); y el programa de extracción en el aparato Soxhlet fue el siguiente: 2:00 h de extracción, 15 min de lavado y 25 min de evaporación. Para eliminar todo el metanol, las muestras se secaron en un rotavapor múltiple y posteriormente con nitrógeno gaseoso. Los extractos se resuspendieron en 1.5 mL de agua destilada.

Al finalizar la preparación, los extractos se esterilizaron por filtración a través de filtros Thermo Scientific de 0.2 µm de poro, y se almacenaron a 4°C hasta su uso. La concentración porcentaje masa/volumen se calculó con el peso inicial de la muestra y el volumen final del extracto; a partir de esta concentración final se hicieron diluciones en

medio SC-Aging para obtener los porcentajes de concentración usados en los experimentos posteriores.

### 30 especies disponibles en el laboratorio



**Figura 1. Especies de plantas medicinales ensayadas.** 36 muestras para la elaboración de extractos provenientes de 30 especies de plantas medicinales. Partes de la planta donde procedían las 36 muestras: 22 de hojas, tres de flores, una de cogollos, tres de partes aéreas, cuatro de corteza y tres de raíz. Con las 36 muestras se prepararon 14 infusiones, 10 decocciones, 8 extracciones con etanol y 4 extracciones con metanol.

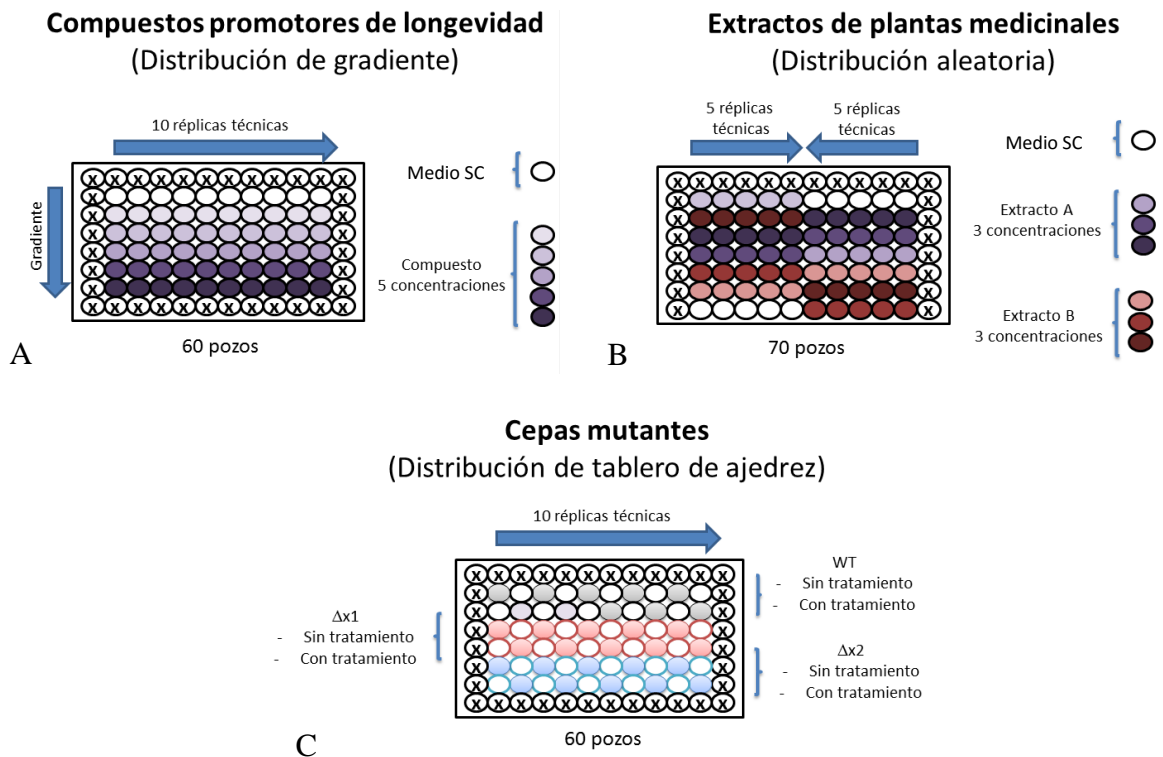
### 5.5 *Cinéticas de crecimiento de Saccharomyces cerevisiae*

Previo al ensayo se cultivaron las cepas en medio SC-Aging hasta la fase estacionaria. Usando un sistema robotizado (Freedom Evoware 2000), se inocularon placas de 96 pozos con 10  $\mu\text{L}$  del cultivo. Las placas de 96 pozos se llenaron previamente a un volumen final de 150  $\mu\text{L}$ , este volumen corresponde al tratamiento (compuesto o extracto) disuelto en medio SC-Aging. Los arreglos para cada experimento se muestran en la Figura 2. Las placas se mantuvieron a 30°C en agitación (750 rpm); al momento de la inoculación y posteriormente cada hora y media se midió la OD600 (Densidad óptica a 600 nm) en el lector TECAN M-1000 por un periodo de 12 h.

Los datos obtenidos de OD se normalizaron restando la primera lectura a las consecutivas para eliminar el fondo de la medición; posteriormente se graficaron los datos de OD resultantes para obtener las cinéticas de crecimiento. Se calculó la tasa de duplicación (T) de las poblaciones con y sin tratamiento usando la fórmula de  $T = [\ln(N - N_0) / \ln 2t]$ , donde  $N_0$  corresponde a la OD600 inicial de 0.3 y N corresponde a una OD600 final de 0.4. Para ambos valores de OD se cercioró que estuvieran en la fase exponencial. Por su parte, t corresponde al tiempo transcurrido entre las dos determinaciones de OD. La T se calculó individualmente para cada una de las diez réplicas técnicas y posteriormente se calculó su promedio. La tasa de duplicación de la población sin tratamiento (0 mM/0%) se comparó con las tasas de duplicación de las poblaciones de cada una de las concentraciones probadas por tratamiento por medio del modelo estadístico ANOVA para el análisis multivariable de Tukey-Kramer ( $\alpha=0.05$ ). Para el procesamiento de la información se usó el programa Matlab R2010a.

### 5.6 *Ensayo de longevidad – Envejecimiento cronológico de Saccharomyces cerevisiae*

Previo al ensayo del efecto de compuestos y extractos sobre la longevidad, se cultivaron las cepas en medio SC-Aging hasta la fase estacionaria. Se inocularon cajas de 96 pozos profundos con 1  $\mu\text{L}$  del cultivo. Las cajas se llenaron previamente con un volumen final de 700  $\mu\text{L}$ , este volumen corresponde al tratamiento (compuesto o extracto) disuelto en medio SC-Aging. Los arreglos para cada experimento se muestran en la Figura 2.



**Figura 2. Arreglos de las placas para cada experimento.** Los arreglos de las placas se usaron para el experimento de la determinación de la cinética de crecimiento y el ensayo de longevidad. A) Distribución de gradiente: cinco concentraciones por placa, una placa por compuesto. Arreglo para ensayar los siete compuestos promotores de longevidad. B) Distribución aleatoria: en una sola placa hay tres concentraciones por extracto y dos extractos por placa. Arreglo para la determinación del efecto de los 36 extractos de plantas medicinales. C) Distribución de tablero de ajedrez: dos cepas mutantes y una cepa silvestre (WT) por placa, con o sin tratamiento. Arreglo para probar el efecto de un extracto en un set de cepas mutantes.

Posterior a las 96 horas de incubación (30°C, 45-75% de humedad relativa), de las cajas de pozo profundo se tomó un inóculo de 10  $\mu\text{L}$  con el sistema robotizado (Freedom Evoware 2000) para inocular placas de 96 pozos con 150  $\mu\text{L}$  de medio YNB-If (Día 1 de lectura). Las cajas de pozo profundo se regresaron a incubar (30°C, 45-75% de humedad relativa). A las placas de 96 pozos se midió la OD600 al momento de la inoculación, 4 h posteriores a la inoculación y posteriormente cada hora en el lector TECAN M-1000 por un periodo de 15 h. Las placas de 96 pozos se mantuvieron en las mismas condiciones de incubación que las cajas de pozo profundo.

El procedimiento de inoculación de muestras provenientes de cajas de pozo profundo a medio nuevo de salida YNB-If, y las posteriores mediciones de OD600 de las placas de 96 pozos se realizaron por cinco días seguidos y posteriormente cada dos días por un periodo total de 20 días.

Los datos obtenidos de OD se normalizaron restando la primera lectura del día a las consecutivas para eliminar el fondo de la medición. Se graficaron los datos de OD resultantes para obtener las cinéticas de crecimiento por día. Para calcular el porcentaje de supervivencia se utilizó la fórmula  $\%S = [1/2^{(\Delta t/T)}]$ , donde la diferencia del tiempo ( $\Delta t$ ) es con respecto al día 1 para alcanzar una absorbancia fija de 0.35, y 'T' es el tiempo de duplicación. Para el análisis estadístico se empleó el modelo ANOVA del análisis multivariable de la prueba de Tukey-Kramer ( $\alpha=0.05$ ) a los valores del crecimiento de la tasa exponencial. La tasa de duplicación, el porcentaje de supervivencia y la tasa de crecimiento exponencial se calcularon individualmente para cada réplica técnica y posteriormente fueron promediadas. Se usó el programa Matlab R2010a para el procesamiento de toda la información. En la Figura 3 se resume el ensayo de longevidad.

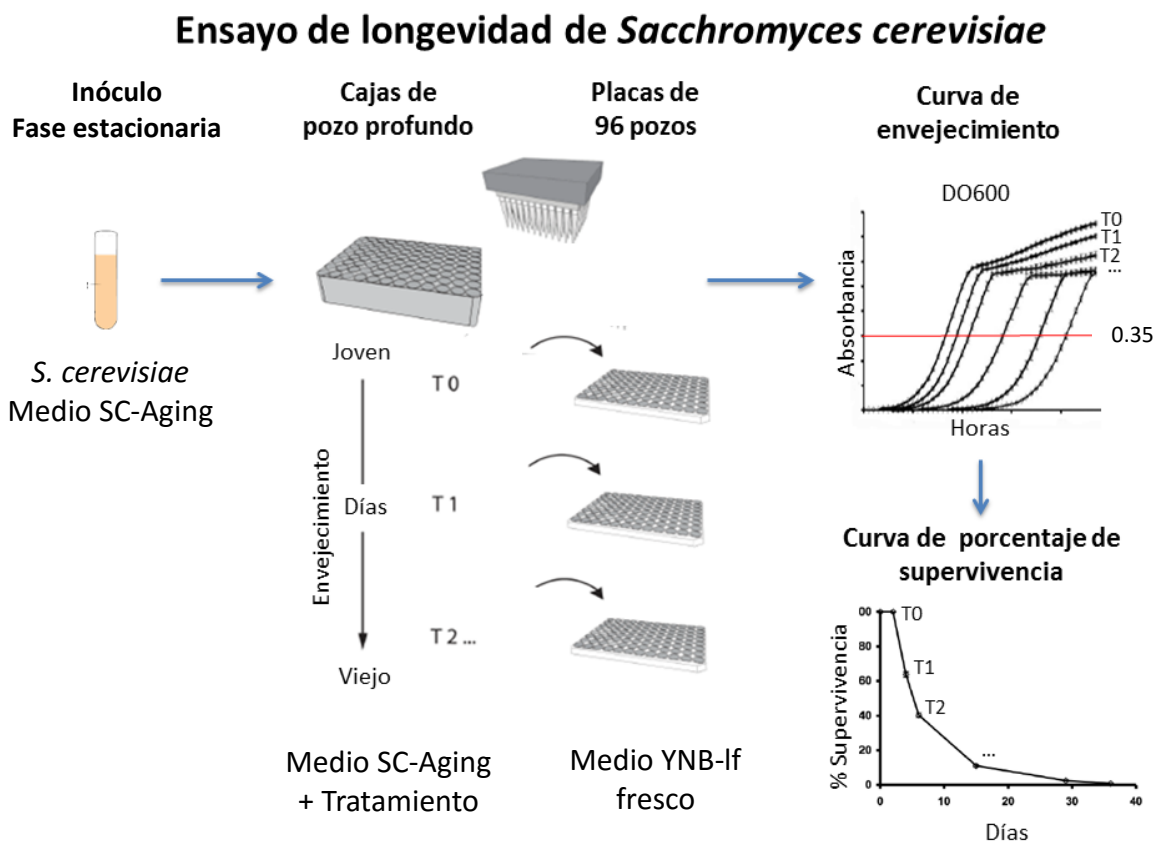
### *5.7 Cromatografía en capa fina*

Para identificar los compuestos fenólicos (incluidos flavonoides) y el efecto antioxidante de siete extractos acuosos se usaron placas HPTLC de 10x10 cm. Se aplicaron 2  $\mu$ L de la solución de cada muestra por placa y se sometieron a elución por 40 min con un sistema de solventes. Los equipos CAMAG se usaron para la aplicación de las muestras, el desarrollo de la placa y su visualización. Se usó el programa visionCATS para el registro de las placas posteriores a la cromatografía y a la derivatización. Para ello se usaron cinco tipos de luz: blanca de remisión, blanca de transmisión, combinación de ambas luces blancas, de 366 nm y de 254 nm.

Para la identificación de compuestos fenólicos el sistema de solventes para la separación cromatográfica fue acetato de etilo : ácido fórmico : ácido acético : agua (100:11:11:13 por volumen); posteriormente, la placa se derivatizó por inmersión en una

mezcla del reactivo de Productos Naturales (1% de éster de ácido- $\beta$ -etanolamida difenilbórico en metanol) y polietilenglicol (5%). Para identificar el efecto antioxidante de los compuestos separados, el sistema de solventes usado fue acetato de etilo : ácido fórmico : ácido acético : agua (100:11:11:13 por volumen); posteriormente, la placa se derivatizó por inmersión en DPPH (1,1-Difenil-2-picril-hidrazilo).

Los extractos evaluados fueron de *Bidens pilosa*, *Lavandula angustifolia*, *Calendula officinalis*, *Acrocomia mexicana*, *Sedum dendroideum* y dos muestras de *Eriobotrya japonica*; así como una mezcla de estándares de compuestos fenólicos: narinina, rutina, ácido 3,4 dimetoxicinámico, ácido *p*-cumárico, ácido gálico, ácido T cinámico y ácido clorogénico.



**Figura 3. Ensayo de la longevidad.** Esquema que resume el ensayo automatizado usado para caracterizar el envejecimiento cronológico de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

## 6.0 Resultados

### 6.1 Bases de datos

Con el fin de recabar la mayor información sobre compuestos promotores de longevidad previamente descritos, se decidió hacer una base de datos, enfocándose en incorporar principalmente aquellos compuestos extraídos de plantas. Se recopiló información de 40 compuestos que se enlistan en la Anexo 1, de los cuales 35 provienen de plantas. En la mayoría de los compuestos ya se ha descrito el mecanismo de acción de cómo estos compuestos actúan, los diversos organismos modelo donde se han probado, así como información relacionada con su efecto sobre el envejecimiento. Un ejemplo ampliamente estudiado es el resveratrol proveniente de la uva (*Vitis vinifera*), mismo que ha sido probado en organismos modelo como *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus*, *Nothobranchius furseri* y fibroblastos humanos; se ha demostrado que sus mecanismos de acción son: inhibir a TORC1, reducir IGF-1, incrementar la actividad catalítica de Sir2 y activar AMPK. Además, el resveratrol incrementa la duración de la vida al modular procesos relacionados con la longevidad al incrementar la sensibilidad a la insulina, incrementar el número de mitocondrias, acelerar el metabolismo de almacenamiento de grasas y activar la autofagia (Baur *et al.*, 2006).

Durante la búsqueda se encontró que existen extractos sin purificar que han mostrado un efecto en la longevidad. Se hizo una base de datos con más de 30 extractos crudos de plantas promotores de la longevidad. Sólo en algunos casos se conoce el mecanismo de acción del extracto. En la mayoría de los casos se desconoce si el efecto de un extracto crudo es debido a un solo compuesto o a la acción sinérgica de más de uno de sus componentes. En el Anexo 2 se detalla la información sobre la especie y la parte de la planta que se usó para la elaboración del extracto, que en su mayoría fueron hojas y frutos; el tipo de extracto, que principalmente fueron decocciones; los organismos modelo donde se probaron; así como la información que se tienen del efecto del extracto en el envejecimiento. Un ejemplo de ello es el mate (*Ilex paraguariensis*) que se dio a ratones en forma de infusión a partir de un sobre de té comercial (Yerba Mate toasted), que mostró un efecto en la disminución de los niveles de ROS y de

nitrito, y un incremento en la duración de la vida y de la salud pulmonar en los ratones viejos (Lanzetti *et al.*, 2013).

Para la base de datos de plantas medicinales se hizo una búsqueda de las especies usadas en la cultura popular mexicana y las más usadas en general para tratar enfermedades relacionadas con la vejez, tales como diabetes, diversos tipos de cáncer y enfermedades neurodegenerativas, entre otras. De esta lista se eligieron 100 plantas que tuvieran un efecto documentado para contrarrestar la enfermedad. En el Anexo 3 se muestran las especies de plantas medicinales seleccionadas. En su mayoría se usan hojas y partes aéreas para hacer el extracto que mayoritariamente son infusiones y decocciones. Se observa que aproximadamente el 60% de estas plantas han sido usadas para combatir más de una enfermedad; también que de una misma especie se pueden usar diversas partes de la planta para elaborar variados tipos de extractos.

## 6.2 Ensayo prueba usando siete compuestos identificados como promotores de longevidad

Los siete compuestos promotores de la longevidad se probaron en un ensayo automatizado para caracterizar el envejecimiento cronológico de *S. cerevisiae*. Por compuesto (tratamiento) se probaron cinco concentraciones, enlistados en la Tabla 1, que se compararon contra una muestra sin tratamiento. La cepa de referencia donde se caracterizó el envejecimiento cronológico fue S288c diploide.

**Tabla 1. Concentraciones de compuestos promotores de longevidad.**

<b>Compuesto promotor de longevidad</b>	<b>Concentraciones</b>					
Cafeína	0 $\mu$ M	100 $\mu$ M	1 mM	2 mM	5 mM	10 mM
Curcumina	0 $\mu$ M	5 $\mu$ M	10 $\mu$ M	50 $\mu$ M	100 $\mu$ M	1 mM
Dapsona	0 $\mu$ M	10 $\mu$ M	100 $\mu$ M	1 mM	5 mM	10 mM
Espermidina	0 $\mu$ M	10 $\mu$ M	100 $\mu$ M	1 mM	5 mM	10 mM
Metformina	0 $\mu$ M	10 $\mu$ M	100 $\mu$ M	1 mM	5 mM	10 mM
Rapamicina	0 $\mu$ M	0.01 $\mu$ M	0.05 $\mu$ M	0.1 $\mu$ M	0.5 $\mu$ M	1 $\mu$ M
Resveratrol	0 $\mu$ M	10 $\mu$ M	100 $\mu$ M	1 mM	5 mM	10 mM



Primeramente se midió el crecimiento y se calculó la tasa de duplicación (T) de las poblaciones con y sin tratamiento para cada uno de los compuestos promotores de longevidad con la finalidad de asegurar que no había una diferencia significativa que pudiera estar influyendo en el efecto de los compuestos para la CLS de la levadura.

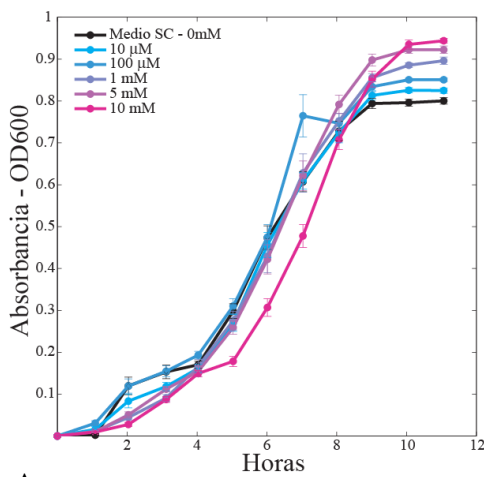
En la Figura 4A se muestran las gráficas de las cinéticas de crecimiento y el análisis multivariable de la tasa de duplicación para el tratamiento de la metformina. Las cinco concentraciones de metformina (10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 1 mM, 5mM y 10 mM) y el medio SC-Aging sin metformina (0 mM) que se evaluaron no muestran una diferencia a simple vista en las cinéticas de crecimiento de las poblaciones. La gráfica del ANOVA de las tasas de duplicación en la prueba multivariable tampoco muestra una diferencia estadística significativa entre poblaciones.

Este comportamiento también fue observado para el caso de las poblaciones que crecieron en los compuestos curcumina, dapsona y resveratrol, donde ninguna de las cinco concentraciones probadas por tratamiento mostró una diferencia en las cinéticas de crecimiento, ni una diferencia significativa estadísticamente en sus tasas de duplicación cuando se comparaba con la población sin tratamiento. Por su parte las poblaciones con espermidina tampoco mostraron una diferencia en las cinéticas de crecimiento o en sus tasas de duplicación, excepto para la concentración mayor de 10 mM, donde la población crecía más lentamente y mostraba una diferencia significativa en su tasa de duplicación comparada con la población sin tratamiento.

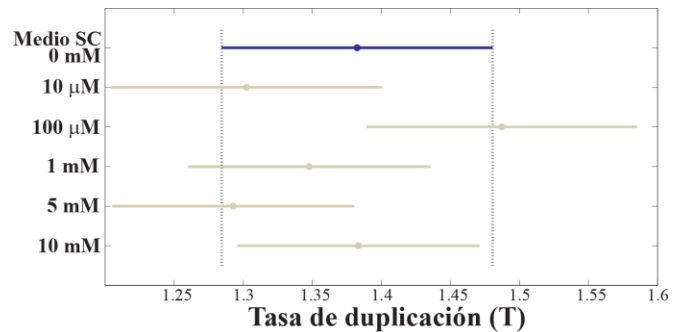
Para la población que creció en la concentración mayor de cafeína (10 mM) no fue posible calcular su tasa de duplicación, ya que no se alcanzó la OD600 de 0.4 para ninguna de sus réplicas técnicas después de 11 h de crecimiento; en la gráfica de las cinéticas de crecimiento se observa que la concentración mayor (10 mM) tiene un crecimiento más lento en comparación con las poblaciones que crecieron en las concentraciones de 100  $\mu$ M, 1 mM y 2 mM, así como la no tratada (0 mM). Por su parte, la población que creció en presencia de una concentración de cafeína 5 mM se observa que tiene un crecimiento más lento que las poblaciones que crecieron en las concentraciones menores, sin embargo, su tasa de crecimiento no presenta una diferencia significativa al compararse con la población no tratada (Figura 4B).

En las poblaciones que crecieron en presencia de las concentraciones de 0.5  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$  de rapamicina no fue posible calcular su tasa de duplicación, ya que para ambos casos la OD600 después de 11 h de crecimiento no era superior a 0.3; en la gráfica de las cinéticas de crecimiento para las poblaciones en estas concentraciones se observa una velocidad de crecimiento menor en comparación con las poblaciones correspondientes a las concentraciones de 0.1  $\mu\text{M}$ , 0.05  $\mu\text{M}$  y 0.01  $\mu\text{M}$ , y con la que no tiene tratamiento. Sin embargo, se observó que para las tres concentraciones menores de rapamicina no hay diferencias significativas en la tasa de duplicación de sus poblaciones si era comparado con la población sin tratamiento (Figura 4C).

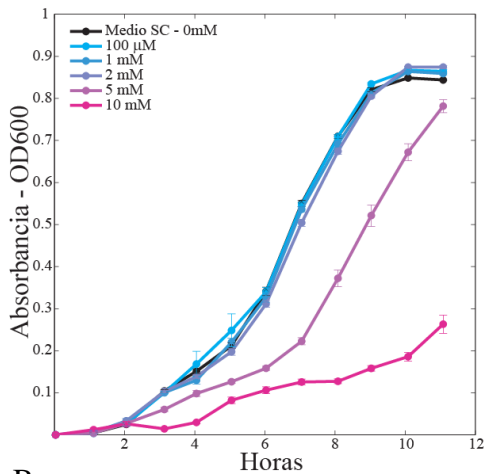
### Metformina



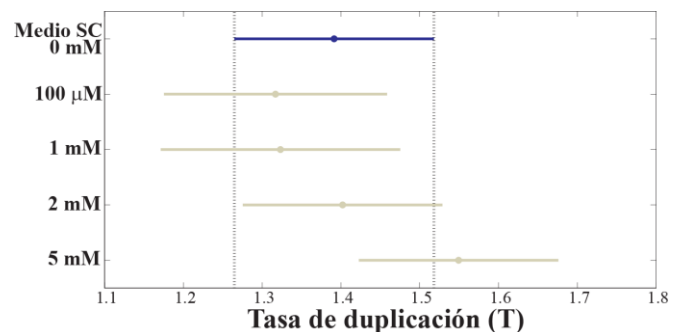
A

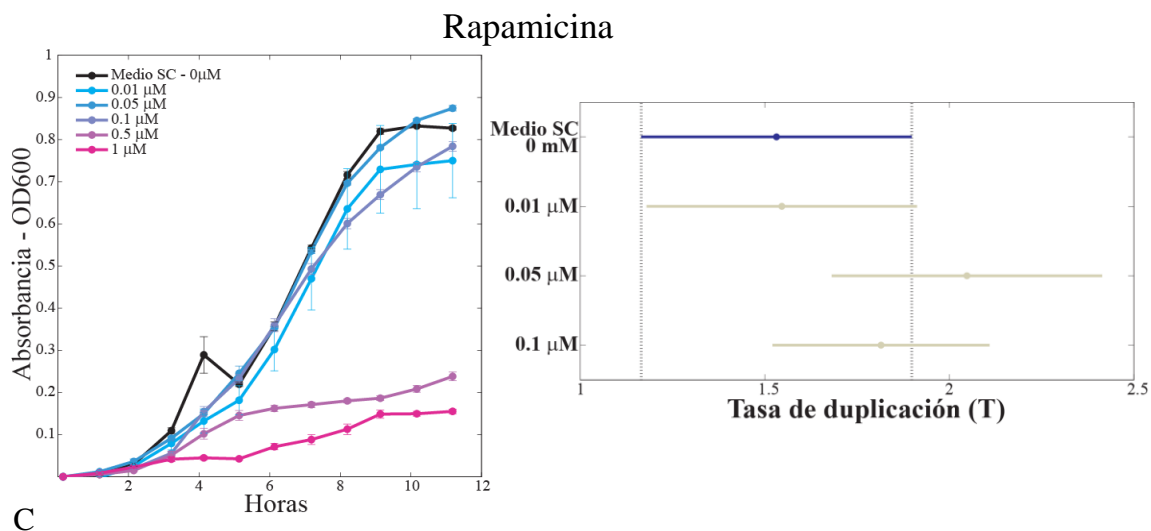


### Cafeína



B





**Figura 4. Cinéticas de crecimiento y análisis multivariable de la tasa de duplicación (T) para poblaciones tratadas con compuestos promotores de longevidad. A) Poblaciones que crecieron en presencia de metformina. B) Poblaciones que crecieron en presencia de cafeína. C) Poblaciones que crecieron en presencia de rapamicina.**

Posterior a la evaluación del crecimiento de las poblaciones con y sin tratamiento, se pasó a caracterizar el efecto de los compuestos promotores de longevidad en el envejecimiento cronológico de la cepa S288c diploide.

Para el ensayo de longevidad, primeramente se compararon las cinéticas de crecimiento diarias para cada concentración de cada tratamiento. En la Figura 5A se muestran por separado las cinéticas de crecimiento de la levadura en presencia de cada una de las concentraciones probadas de metformina. Las cinéticas que representan los primeros días de medición tardan menos tiempo para alcanzar una absorbancia de 0.35, sin embargo, conforme pasan los días el tiempo para alcanzar esta absorbancia va en aumento. Esto se traduce como un menor número de células viables y por ende menor supervivencia que se aprecia en la gráfica de porcentaje de decaimiento (Figura 5B).

Por otro lado se observó que las concentraciones de 5 mM y 10 mM de metformina fueron capaces de mejorar la supervivencia de *S. cerevisiae*. Fue así que se observó un mayor porcentaje de supervivencia en estas poblaciones de la levadura al ser

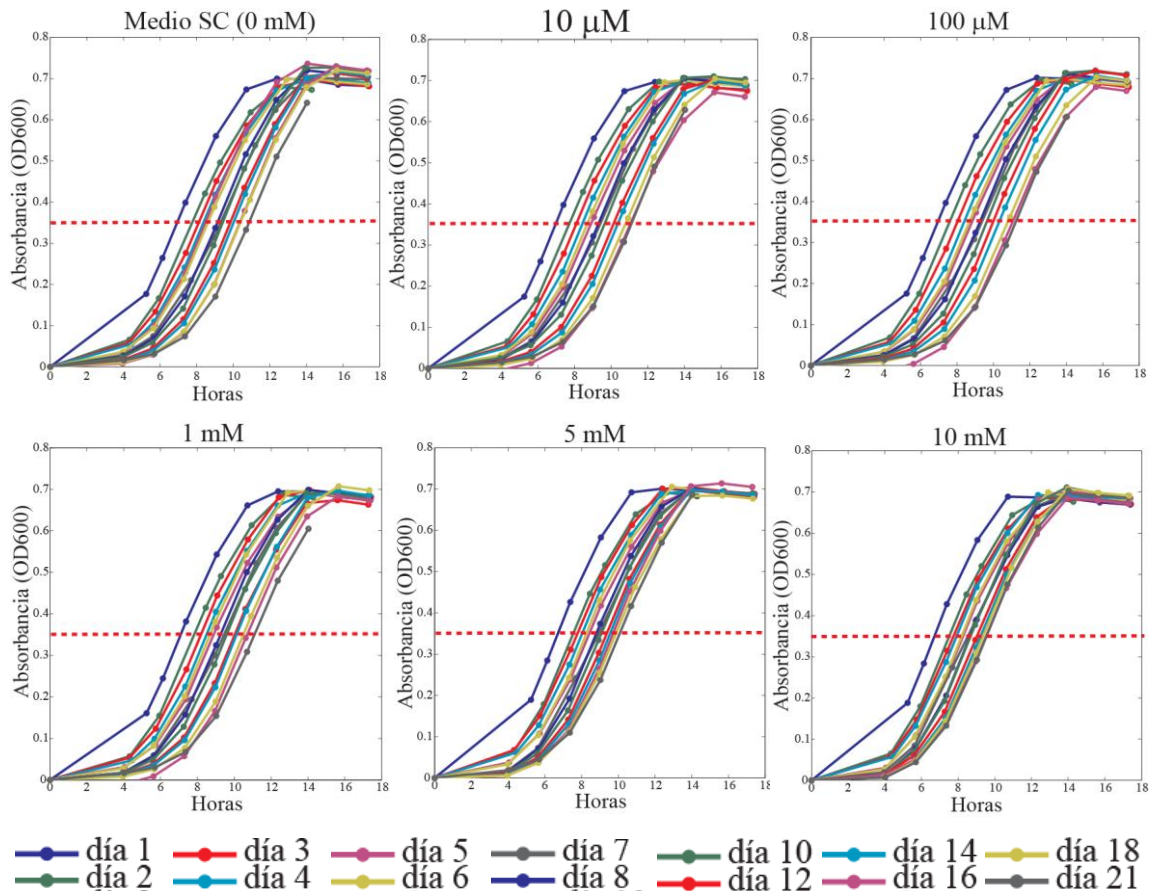
comparadas con el control, teniendo una diferencia significativa en el crecimiento de la tasa exponencial para ambas concentraciones. Para las concentraciones menores de este compuesto (100  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 1  $\text{mM}$ ) no se observó efecto benéfico en la supervivencia, ya que al ser comparado con la población control no muestran diferencias significativas (Figura 5B).

Por su parte, las concentraciones de 5  $\text{mM}$  y 10  $\text{mM}$  de espermidina causaron una mayor supervivencia en la población de levaduras que es observable desde el quinto día, y el efecto de la concentración 1  $\text{mM}$  es notoria a partir del décimo día, concluyéndose que todas presentan una diferencia significativa comparada con la supervivencia de la población sin tratamiento. Las poblaciones incubadas con las dos concentraciones menores de espermidina (100  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ) no mostraron diferencia en la supervivencia comparadas con la población sin tratamiento (Figura 5C).

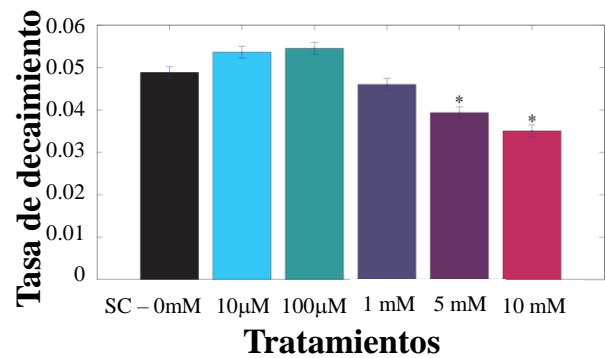
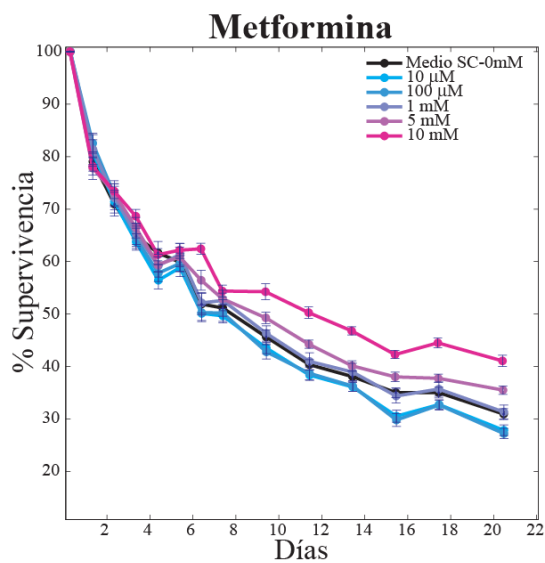
Debido al crecimiento lento de las poblaciones en presencia de concentraciones de 0.1  $\mu\text{M}$ , 0.5  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$  de rapamicina, no fue posible evaluar su supervivencia. La supervivencia de la población en la concentración menor (0.01  $\mu\text{M}$ ) comparada con la población que creció sólo en medio SC-Aging no muestra diferencia significativa, pero para la población que se encontraba en la concentración de 0.05  $\mu\text{M}$  es observable un aumento en la supervivencia desde el día seis que es significativo cuando se compara con la población sin tratamiento (Figura 5D).

Sin embargo, para los compuestos cafeína, curcumina, dapsona y resveratrol no se observa un efecto significativo para promover la CLS de la levadura en ninguna de sus concentraciones. La Figura 6 muestra las gráficas del porcentaje de supervivencia para cada compuesto, con sus cinco concentraciones, donde no hay una diferencia entre las poblaciones tratadas y la no tratada.

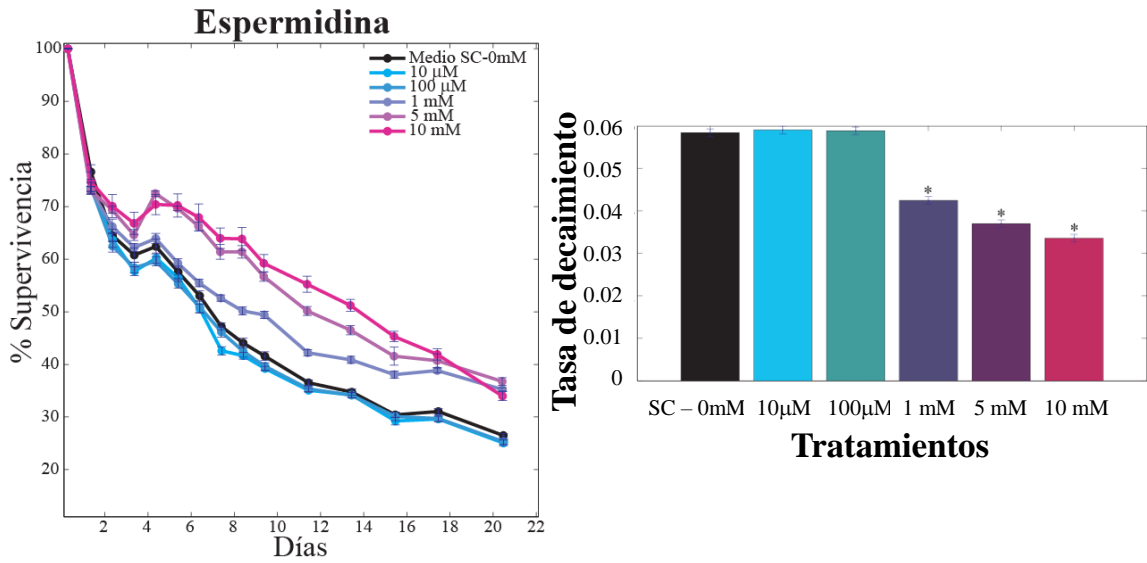
Los resultados obtenidos para los siete compuestos probados en este ensayo inicial concuerdan con los reportados previamente por otros grupos, los cuales se discutirán posteriormente, mostrando que el ensayo automatizado empleado en este trabajo es capaz de identificar compuestos o extractos que extienden la longevidad en el modelo del envejecimiento cronológico de la levadura *S. cerevisiae*,



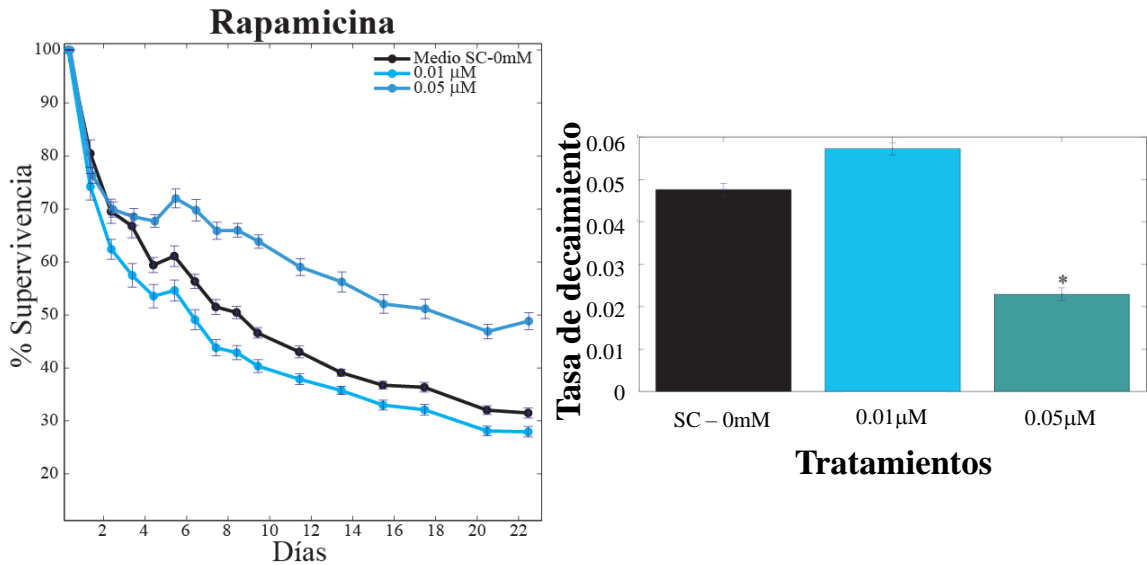
A



B

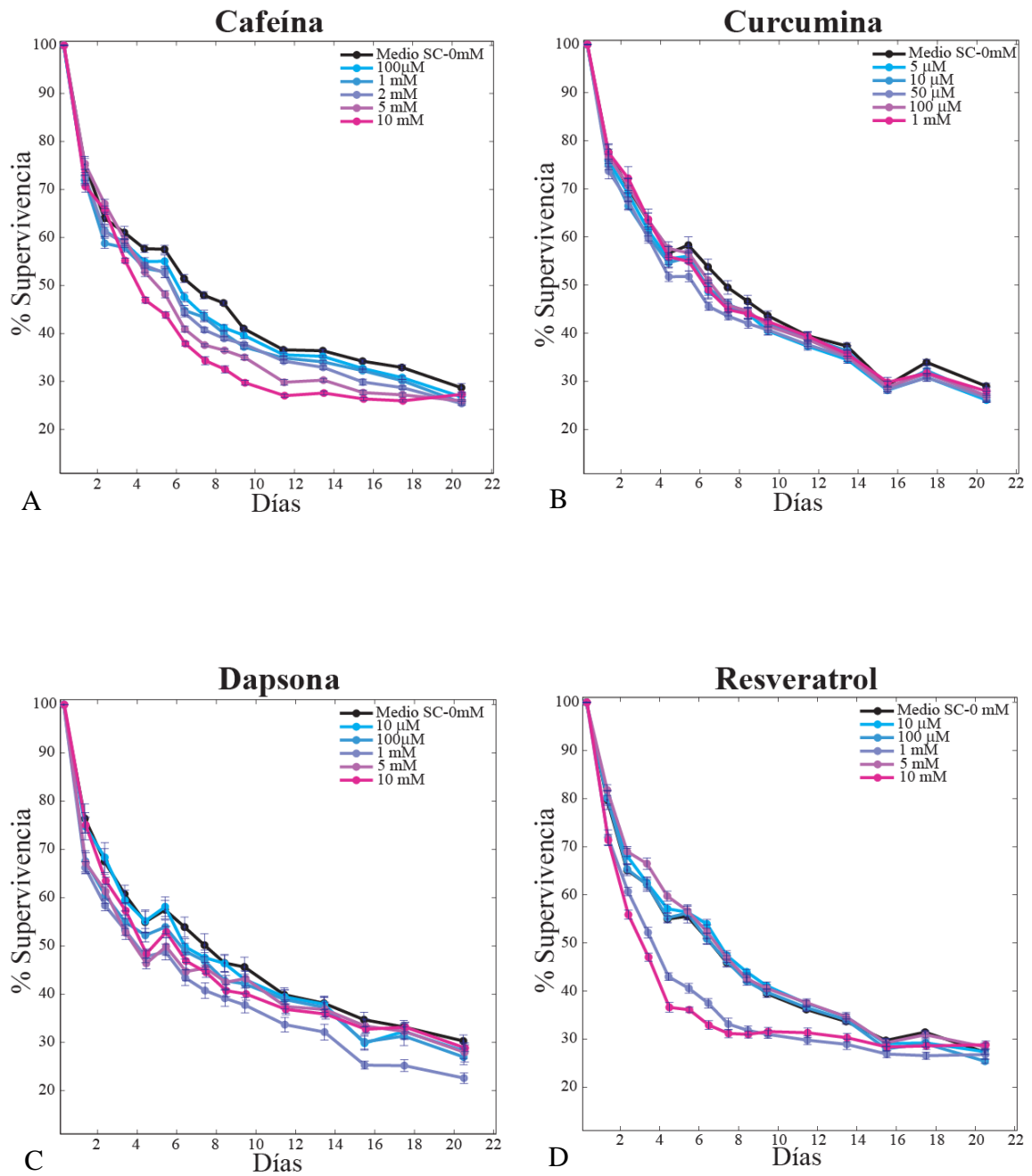


C



D

**Figura 5. Curvas del porcentaje de la supervivencia de las poblaciones con los compuestos que tienen efecto en la CLS de *S. cerevisiae*, y su análisis estadístico.** A) Cinéticas de crecimiento de las poblaciones en las diferentes concentraciones de metformina y sin tratamiento, que se usaron para calcular posteriormente sus curvas de supervivencia. B) Comparación de las curvas de supervivencia de las poblaciones con metformina y sin tratamiento. C) Comparación de las curvas de supervivencia de las poblaciones con espermidina y sin tratamiento. D) Comparación de las curvas de supervivencia de las poblaciones con rapamicina y sin tratamiento. Análisis estadístico de los valores de crecimiento de la tasa exponencial (tasa de decaimiento); a menor tamaño de la barra, representan una mayor supervivencia de la población.



**Figura 6. Curvas del porcentaje de la supervivencia de las poblaciones con los compuestos que no presentan efecto en la CLS de *S. cerevisiae*.** A) Curvas de decaimiento de las poblaciones con cafeína y sin tratamiento. B) Curvas de decaimiento de las poblaciones con curcumina y sin tratamiento. C) Curvas de decaimiento de las poblaciones con dapsona y sin tratamiento. D) Curvas de supervivencia de las poblaciones con resveratrol y sin tratamiento.

### 6.3 Efecto de treinta extractos de plantas medicinales en la supervivencia de *Saccharomyces cerevisiae*

La base de datos de plantas medicinales se usó como referencia para la recolección de 36 muestras de 30 especies; así como para la preparación del extracto, la parte de la planta y el tipo de preparación, que se sugería en estudios previos para probar el efecto de éstos en diversas enfermedades relacionadas con la vejez.

Usando el ensayo automatizado (ver Métodos), se probaron 24 extractos acuosos para caracterizar su efecto en el envejecimiento cronológico de *S. cerevisiae*, de los cuales 14 corresponden a infusiones y 10 a decocciones. Se probaron tres concentraciones (0.05%, 0.5% y 5% m/v) por extracto (tratamiento), sin embargo, para aquellas muestras con las que se contaban pocos gramos, se usaron concentraciones de 0.01%, 0.1% y 1%. El efecto de los tratamientos en las distintas concentraciones se comparó contra un control no tratado. La cepa de referencia donde se caracterizó el envejecimiento cronológico fue la diploide S288c.

De igual forma, se siguió el crecimiento, se calculó y comparó la tasa de duplicación (T) de las poblaciones para cada concentración de cada extracto contra la que no tenía tratamiento para asegurar que no hubiera una diferencia significativa que pudiera influir en el efecto de los extractos en la CLS de la levadura.

La comparación de la T entre las poblaciones incubadas en presencia de los extractos acuosos y las poblaciones sin tratamiento no mostró diferencia significativa. Sólo en algunos casos muy específicos la T fue mayor y significativamente diferente a la de las población sin tratamiento, por ejemplo, en las poblaciones incubadas con 0.1% del extracto de *Byrsonima bucidaefolia*, 5% del extracto de corteza de *Guazuma ulmifolia* y 0.5% ó 5% del extracto de *Rosa sp*; lo que indicaría que estas poblaciones crecen más lento que la población que sólo tiene el medio SC-Aging. También hay casos específicos donde la T fue significativamente menor que la de la población sin extracto, como las incubadas con los siguientes extractos: 5% de cogollos de *Annona muricata*, 5% de *Calendula officinalis*, 0.05% de *Crataegus mexicana*, 1% de *Emilia sonchifolia*, 5% de *Equisetum hyemale*, 0.5% ó 5% de hojas de *Parmentiera acuelata* y 5% de *Tecoma*



*stans*; lo que sugeriría que las correspondientes poblaciones crecen más rápido que la población que no tiene tratamiento.

En el ensayo de longevidad por determinación de la CLS, para la mayoría de los 24 extractos acuosos probados, a partir del octavo día ya no se observaba un decaimiento en la supervivencia de las poblaciones. En las Figuras 7 y 8 correspondientes a las curvas de porcentaje de supervivencia de la levadura incubada con extractos de infusión o extractos de decocción respectivamente, se aprecia que la supervivencia se mantuvo constante en un mismo porcentaje durante los días siguientes, incluso en algunos casos pudo observarse un aumento en la supervivencia por un posible crecimiento adaptativo de la población.

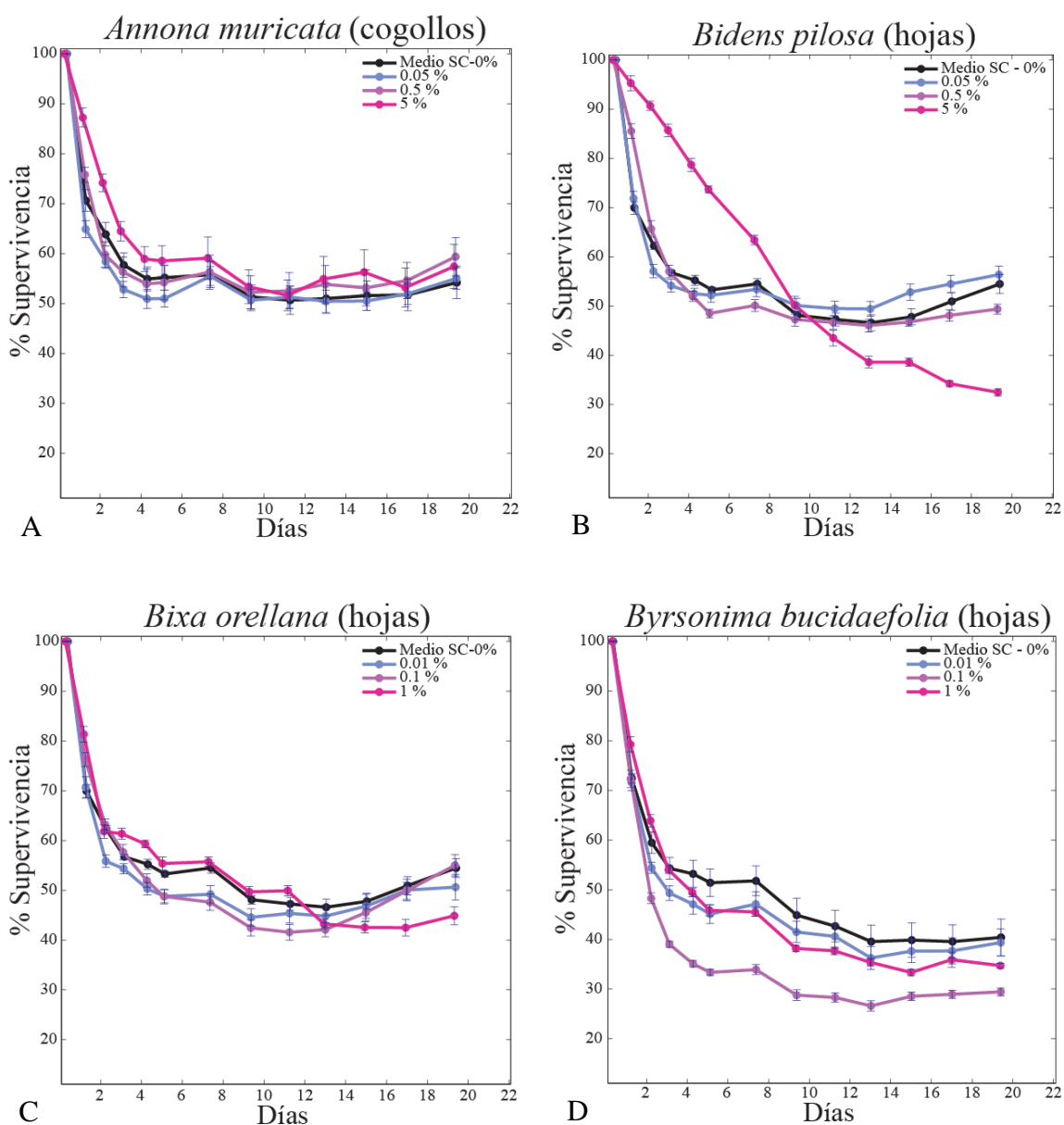
Por lo anterior, el efecto de los extractos acuosos se consideró sólo para los primeros cinco días de medición. Para las infusiones de hojas de *Bidens pilosa* (aceitilla, Figura 7B), flores de *Calendula officinalis* (caléndula, Figura 7E) y hojas de *Lavandula angustifolia* (lavanda inglesa, Figura 7I) se observó que la concentración 5% produjo una mayor supervivencia en la población de levaduras comparado con la que tiene sólo medio SC-Aging (0%). Esta diferencia es significativa para los tres casos, considerando a los tres como extractos con un efecto benéfico en la supervivencia de la levadura.

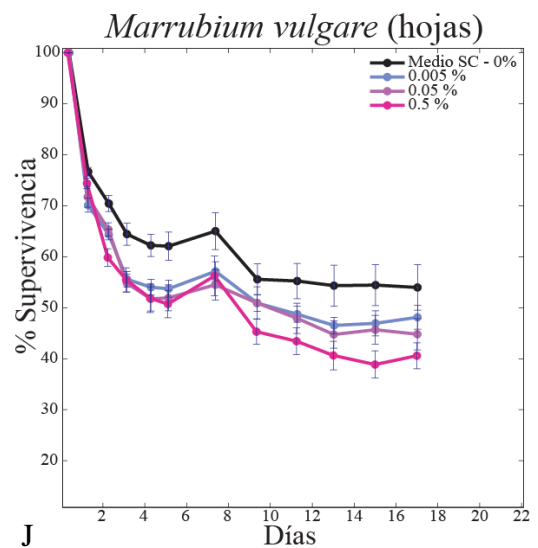
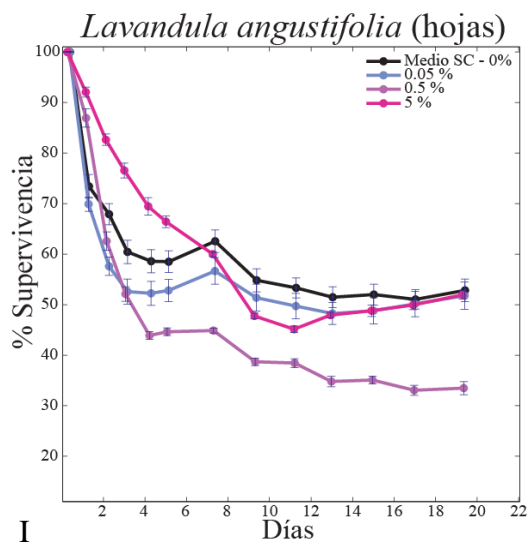
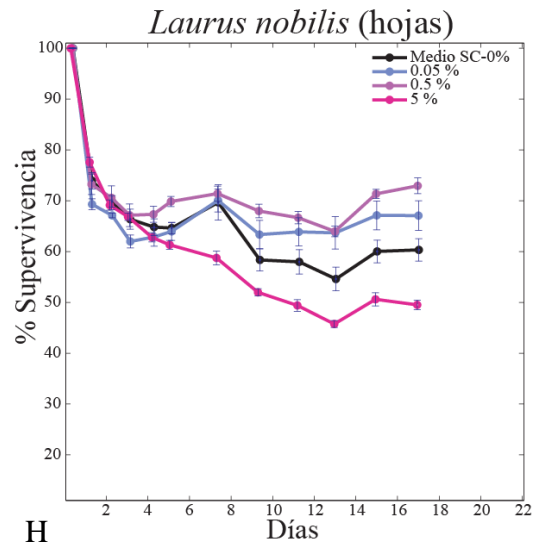
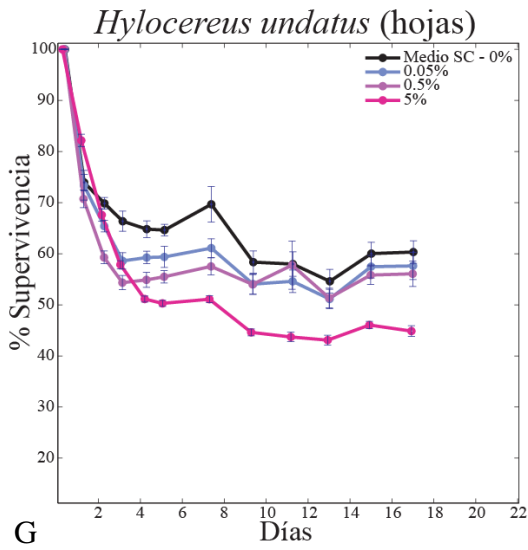
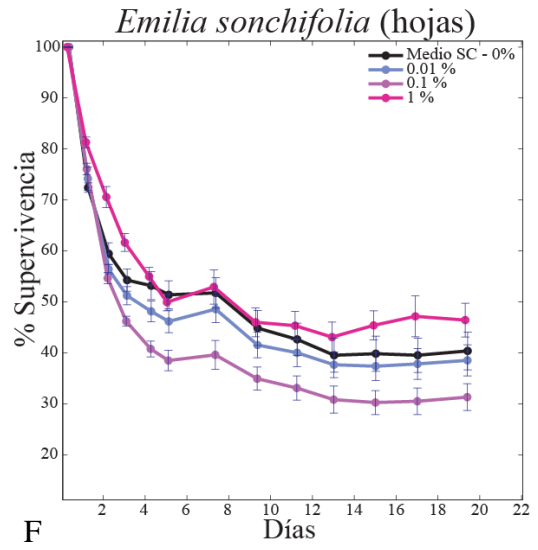
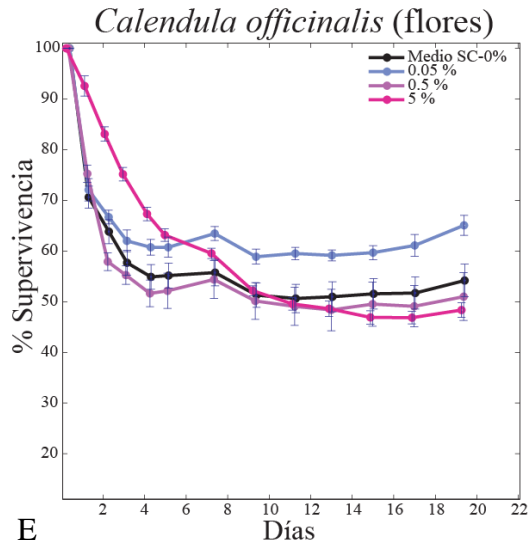
A pesar de que se encontró un aumento de la supervivencia de las poblaciones incubadas con extracto de la infusión de cogollos de *Annona muricata* (guanábana) al 5% (Figura 7A), hojas de *Emilia sonchifolia* (botón rosado) al 1% (Figura 7F), hojas de *Parmentiera aculeata* (cuajilote) al 5% (Figura 7K), hojas de *Plumeria rubra* (flor de mayo) al 0.5% y 5% (Figura 7L), flores de *Rosa sp* (rosa de castillo) al 5% (Figura 7M) y hojas de *Tecoma stans* (hisoncle) al 5% (Figura 7N) en comparación con el control (0%), este aumento fue mínimo y no significativo, por lo que estos extractos no se consideraron con efecto en la supervivencia de la levadura.

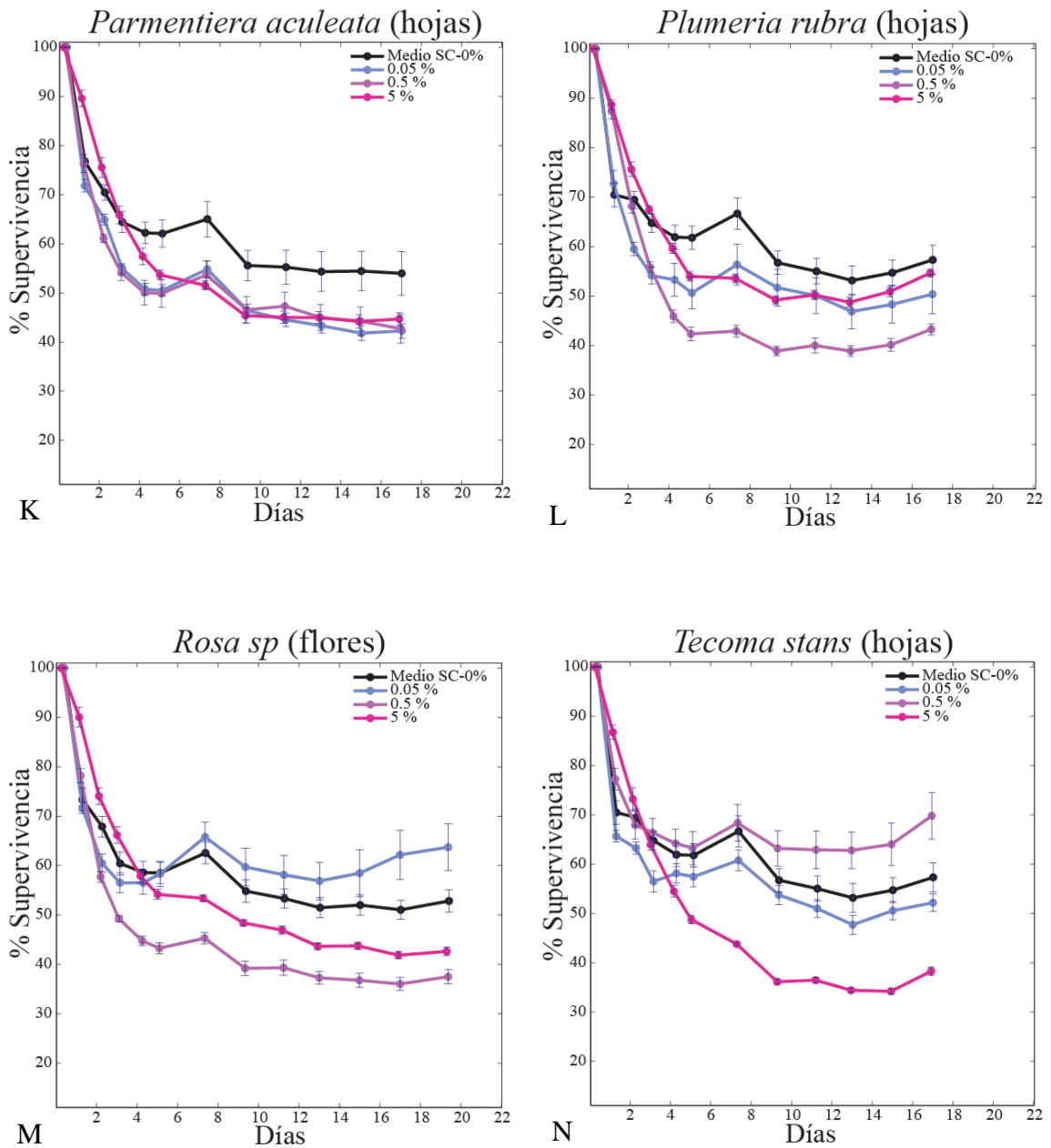
Para el caso de las infusiones de hojas de *Bixa orellana* (achiote, Figura 7C), hojas de *Byrsonima bucidaefolia* (nance agrio, Figura 7D), hojas de *Hylocereus undatus* (pitahaya, Figura 7G), hojas de *Laurus nobilis* (laurel, Figura 7H) y hojas de *Marrubium vulgare* (mestranzo, Figura 7J) no se observó alguna diferencia significativa en la

supervivencia de las poblaciones en ninguna de sus tres concentraciones comparadas con la supervivencia de la población que no tenía extracto (0%), por lo que se concluyó que estos extractos no muestran efecto en la supervivencia de la levadura.

Para la decocción de hojas de *Eribotrya japonica* (níspero) al 5% (Figura 8C) se observa un aumento de la supervivencia de la población de la levadura comparada con la que no tiene extracto (0%), siendo ésta una diferencia significativa, haciendo que el extracto de níspero sea considerado con efecto en la supervivencia de *S. cerevisie*.





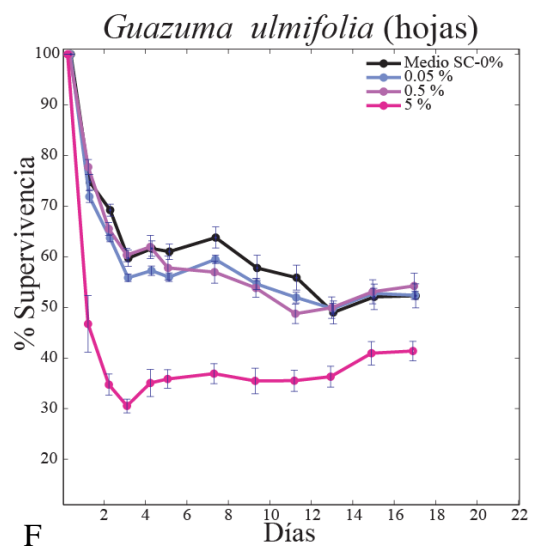
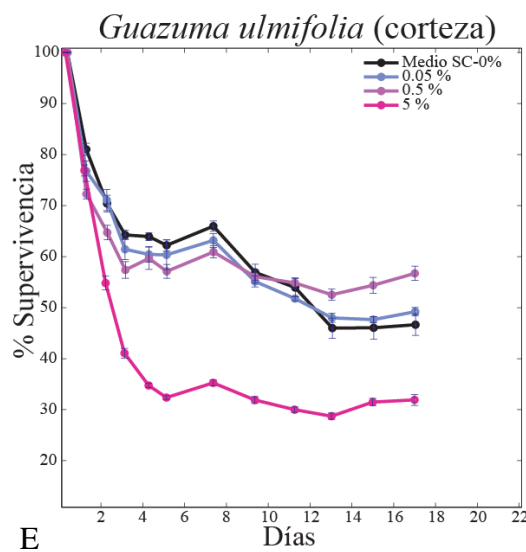
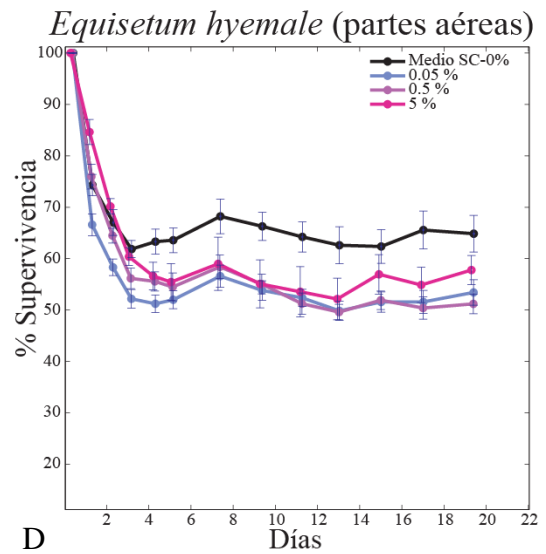
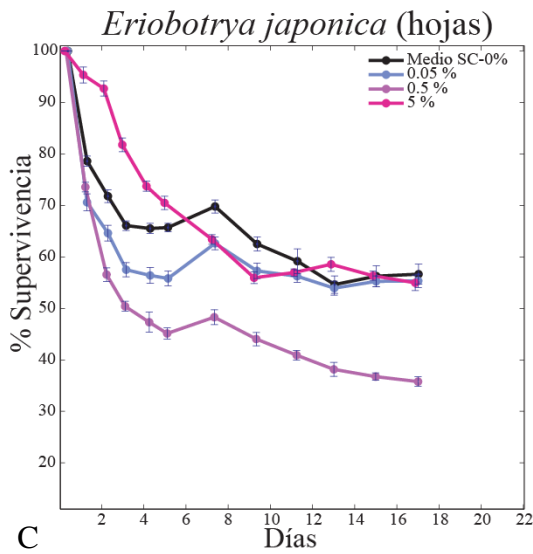
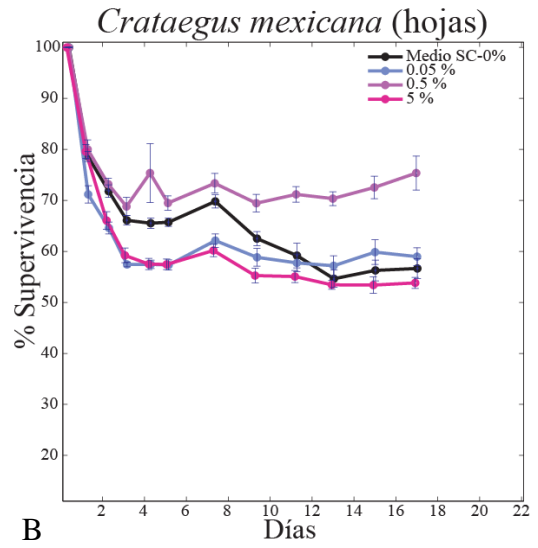
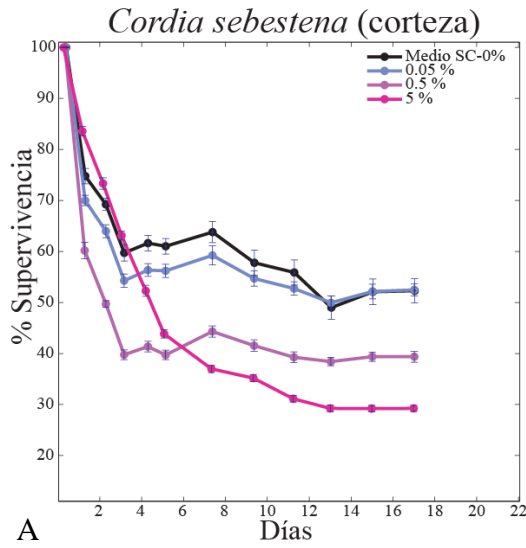


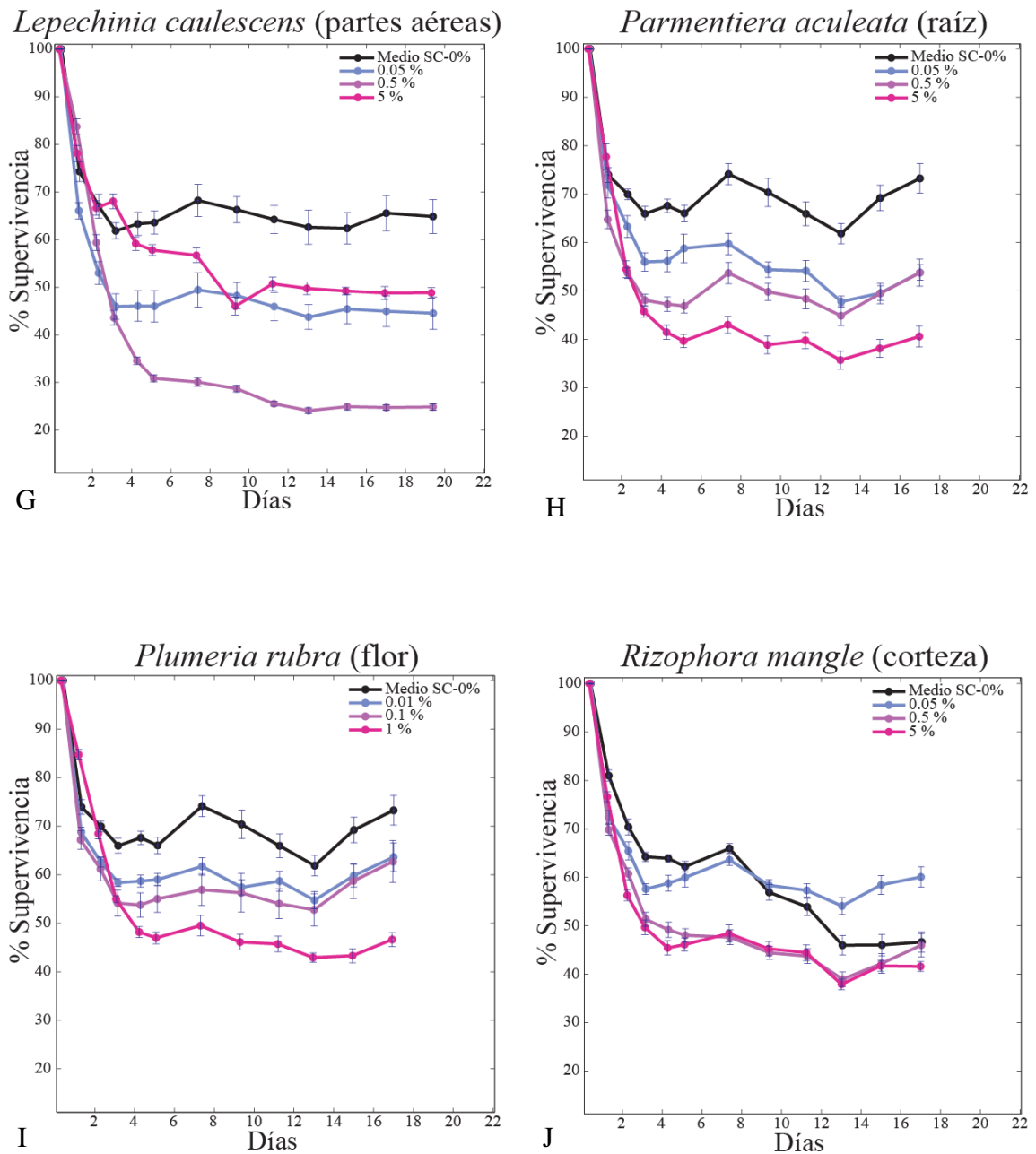
**Figura 7. Curvas del porcentaje de la supervivencia de las poblaciones de levadura incubadas con los extractos de infusiones acuosas.** A) Extracto de cogollos de *A. muricata*. B) Extracto de hojas de *B. pilosa*. C) Extracto de hojas de *B. orellana*. D) Extracto de hojas de *B. bucidifolia*. E) Extracto de flores de *C. officinalis*. F) Extracto de hojas de *E. sonchifolia*. G) Extracto de hojas de *H. undatus*. H) Extracto de hojas de *L. nobilis*. I) Extracto de hojas de *L. angustifolia*. J) Extracto de hojas de *M. vulgare*. K) Extracto de hojas de *P. aculeata*. L) Extracto de hojas de *P. rubra*. M) Extracto de flores de *Rosa sp.* N) Extracto de hojas de *T. stans*.

Por otro lado, no se observó alguna diferencia en la supervivencia de las poblaciones de levadura para ninguna concentración de las decocciones de las hojas de *Crataegus mexicana* (tejocote, Figura 8B) ni de las partes aéreas de *Equisetum hyemale* (cola de caballo, Figura 8D) comparada con el control, por lo que se concluyó que estos extractos no tienen efecto en la supervivencia de la levadura.

Para algunas decocciones se observó que disminuía la supervivencia de las poblaciones de levadura en comparación con la población que sólo tenía medio SC-Aging (0%). El caso más notorio fue el de los extractos de *Guazuma ulmifolia* (guacima), donde 5% de la decocción de hojas (Figura 8E) causó una disminución de más del 50% de la población de levaduras el primer día; y la decocción de corteza al 5% que causó una disminución de la supervivencia a partir del tercer día (Figura 8F), mostrando una diferencia significativa para ambos casos. Se observó un efecto dependiente de la concentración para los casos de la decocción de la raíz de *Parmentiera acuelata* (cuajilote, Figura 8H) y de las flores de *Plumeria rubra* (flor de mayo, Figura 8I), donde se observó que entre mayor era la concentración, menor era la supervivencia de la población de levadura. Otras decocciones que causaron una disminución en la supervivencia de las poblaciones de levadura en comparación con la incubada sin extracto (0%) fueron: la corteza de *Cordia sebestena* (anacahuite) al 0.5% y 5% (Figura 8A), las partes aéreas de *Lepechinia caulescens* (salvia) en sus tres concentraciones (Figura 8G) y la corteza de *Rizophora mangle* (Mangle) principalmente al 0.5 y 5% (Figura 8J). Por ello se concluyó que todas estas decocciones tienen un efecto negativo en la supervivencia de la levadura.

Debido a los problemas con el crecimiento adaptativo de las poblaciones que presentó la cepa diploide S288c en las pruebas con los extractos acuosos, se cambió por la cepa haploide S288c (Mat  $\alpha$ ) para probar el efecto de los extractos alcohólicos.





**Figura 8.** Curvas del porcentaje de la supervivencia de las poblaciones de levadura incubadas con los extractos de decocciones acuosas. A) Extracto de corteza de *C. sebestena*. B) Extracto de hojas de *C. mexicana*. C) Extracto de hojas de *E. japonica*. D) Extracto de partes aéreas de *E. hyemale*. E) Extracto de corteza de *G. ulmifolia*. F) Extracto de hojas de *G. ulmifolia*. G) Extracto de partes aéreas de *L. caulescens*. H) Extracto de raíz de *P. aculeata*. I) Extracto de flor de *P. rubra*. J) Extracto de corteza de *R. mangle*.

Por el ensayo automatizado se probaron doce extractos alcohólicos para caracterizar el efecto de éstos en la CLS de la levadura. Ocho extractos etanólicos se probaron en tres concentraciones por tratamiento, 1%, 3% y 5%; para las especies con las que se contaba con pocos gramos de muestras se trabajó con las concentraciones de 0.5%, 3% y 5%. Los cuatro restantes fueron extractos metanólicos donde se probaron tres concentraciones 1%, 3% y 5%, sin embargo, para dos especies con las que se contaba con menos cantidad de muestra las concentraciones probadas fueron de 0.5%, 1% y 5% ó 0.1%, 0.5% y 1%. El efecto de los tratamientos en las diferentes concentraciones se comparó contra una muestra que sólo tenía medio SC-Aging (0%).

Primeramente se siguió el crecimiento de las poblaciones en las diferentes concentraciones de los diferentes extractos que se probaron, además, se calculó y comparó la tasa de duplicación (T) de las poblaciones con la de la población sin extracto, para asegurar que no hubiera una diferencia significativa que pudiera influir en el efecto de los extractos en la CLS de la levadura. Sin embargo, para la mayoría de las poblaciones con extracto alcohólico su T era menor y significativamente diferente a la de la población sin tratamiento; un resultado que mostró que la levadura incubada con extracto crecía a mayor velocidad que la que no tenía tratamiento. Por su parte, la levadura incubada con 3% ó 5% de extracto de *Sedum dendroideum* mostraron una T mayor y significativamente diferente que la de la población sin extracto, sugiriendo que estas poblaciones crecen más lento que la que sólo tiene medio SC-Aging. Sólo en algunos casos particulares no hubo diferencia significativa en la T de las poblaciones con o sin extracto, por ejemplo, las incubada con los siguientes extractos: 0.1% de *Costus spicatus*, 0.5% de *Justicia spicigera*, 1% de *Sedum dendroideum* y, 0.5% y 3% de *Ziziphus mauritiana*.

Para el ensayo de longevidad por determinación de la CLS, en la Figura 9 se muestran las curvas del porcentaje de supervivencia de las poblaciones incubadas con extractos etanólicos comparadas con la población sin tratamiento (0%). Para los extractos etanólicos de hojas de *Annona muricata* (guanábana, Figura 9A), corteza de *Byrsonima bucidaefolia* (nance negro, Figura 9C) y hojas de *Ziziphus mauritiana* (ciruela babosa, Figura 9H) no se observa alguna diferencia en la supervivencia de las

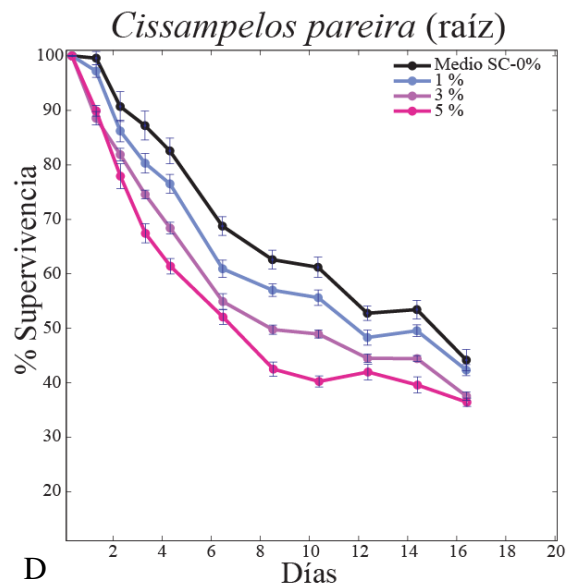
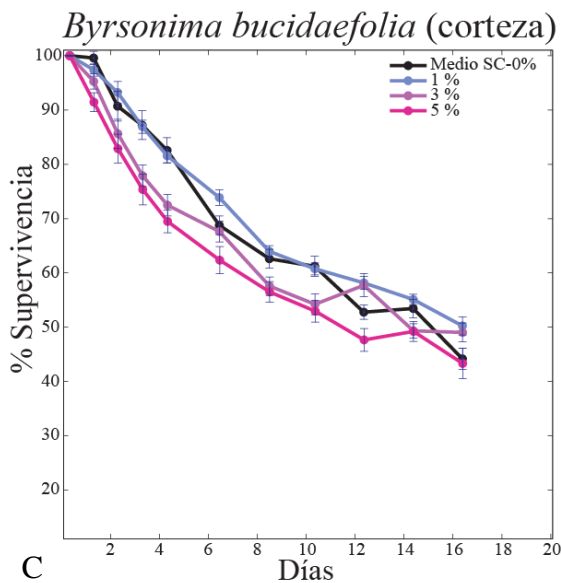
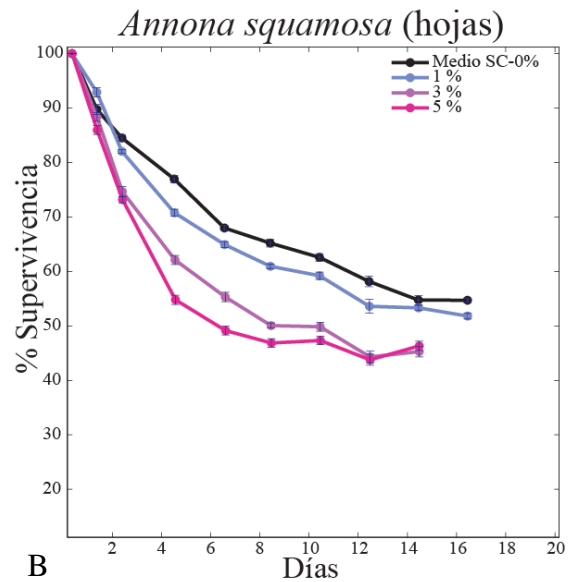
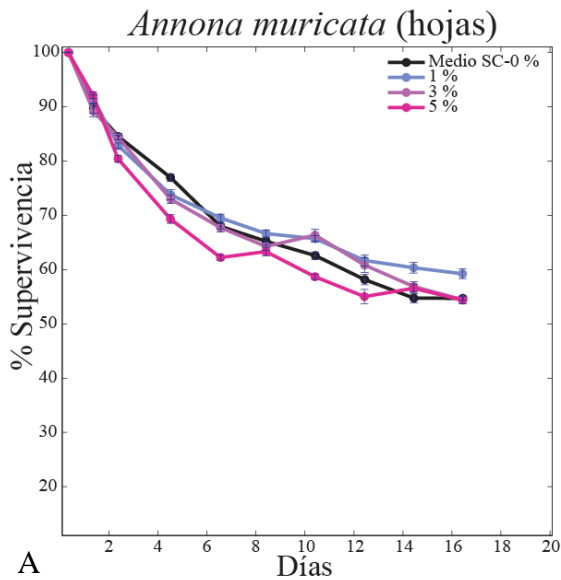


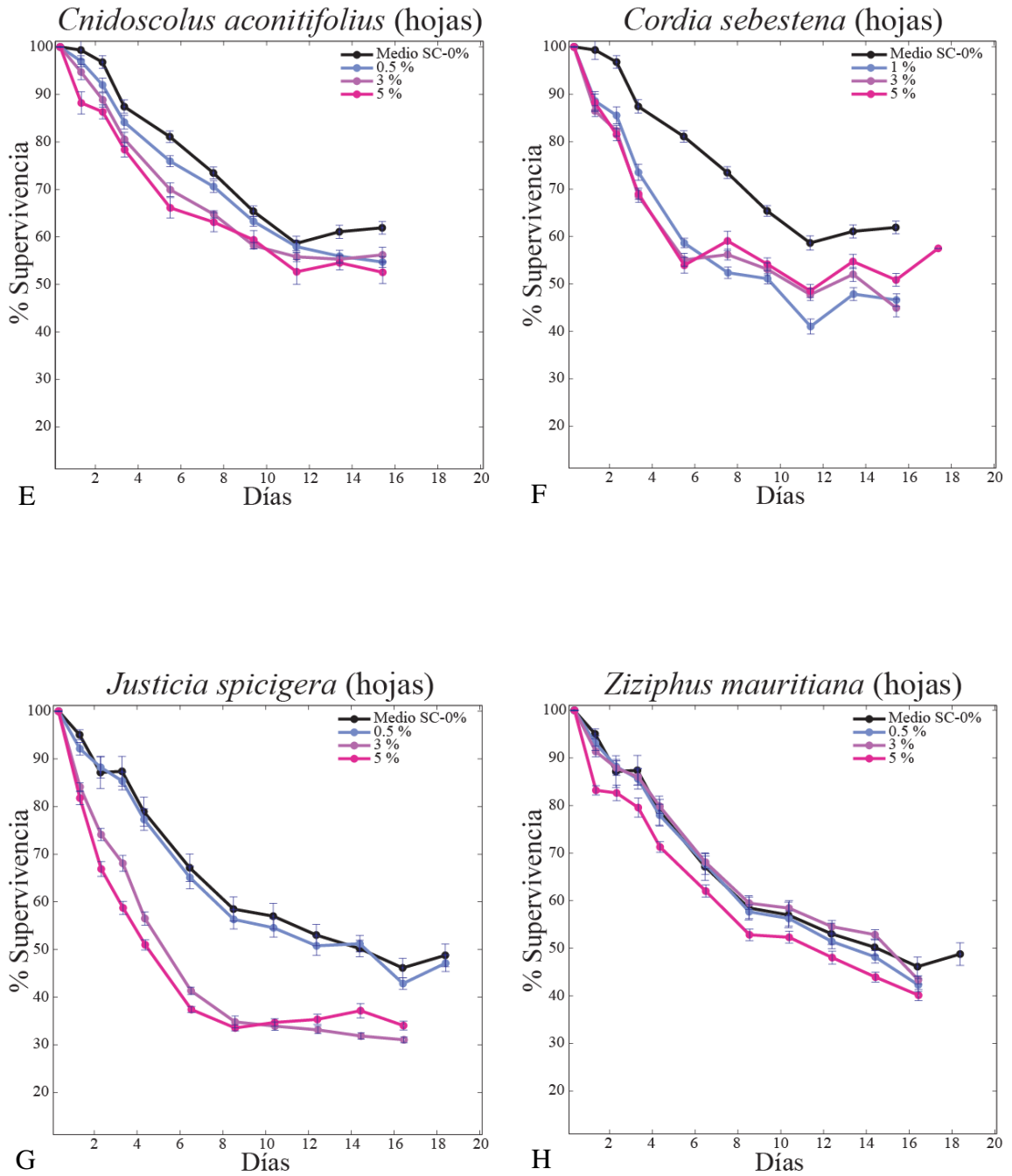
poblaciones incubadas con alguna de sus tres concentraciones comparas con la población control, por lo que se concluyó que estos tres extractos no tienen efecto en la supervivencia de la levadura.

Para el resto de los extractos etanólicos, se observó que la supervivencia de las poblaciones incubadas en su presencia, disminuía en comparación con la población que sólo tenía medio SC-Aging (0%). Para los extractos etanólicos de hojas de *Annona squamosa* (chirimoyo, Figura 9B) y raíz de *Cissampelos pareira* (guaco, Figura 9D) fue notorio el efecto dependiente de la concentración; otro extracto que mostró ese efecto fue el de hojas de *Cnidioscolus aconitifolius* (chaya), aunque no es tan contundente como el caso de los dos anteriores (Figura 9E); en estos tres extractos se observó que entre mayor fue la concentración del extracto, menor era la supervivencia de la población. El extracto etanólico de hojas de *Cordia sebestena* (anacahuite) tuvo un efecto en sus tres concentraciones, observándose una disminución del 50% de la población desde el cuarto día (Figura 9F). Por su parte el extracto etanólico de hojas de *Justicia spicigera* (muicle) en concentraciones de 3% y 5% causó la disminución de la población en más del 40% en el sexto día (Figura 9G). Es por ello que se concluyó que todos estos extractos tienen un efecto negativo en la supervivencia de la levadura.

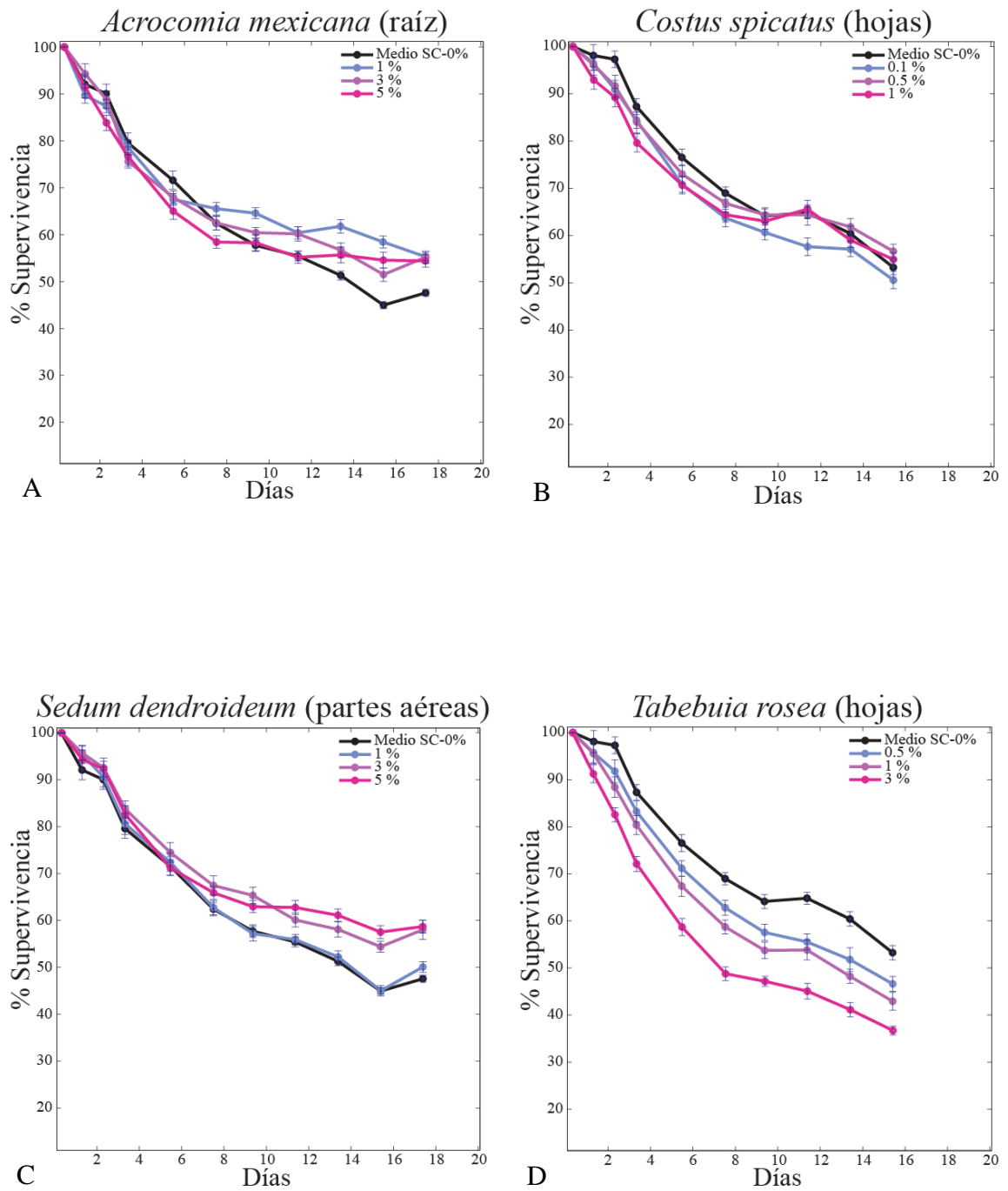
Las curvas del porcentaje de la supervivencia de las poblaciones con extractos metanólicos comparadas con las poblaciones sin extracto (0%) se presentan en la Figura 10. El extracto metanólico de las hojas de *Costus spicatus* (costus) no tuvo efecto en la CLS de la levadura, ya que la supervivencia de las poblaciones incubadas con sus tres concentraciones fue similar a la de la población sin tratamiento (Figura 10B). El extracto metanólico de hojas de *Tabebuia rosea* (maculis rosa) tuvo un efecto dependiente de la dosis, donde a mayor concentración menor supervivencia de la población, concluyéndose que este extracto tiene un efecto negativo en la CLS de la levadura (Figura 10D). Los extractos metanólicos de la raíz de *Acrocomia mexicana* (coyul) y de las partes aéreas de *Sedum dendroideum* (siempreviva) aumentaron la supervivencia de la levadura comparada con la población sin extracto (0%), teniendo una diferencia significativa en el incremento de la supervivencia; en *A. mexicana* el aumento en la supervivencia se presentó con las tres concentraciones del extracto (Figura 10A); el

extracto de *S. dendroideum* al 3% y 5%, aumentó la supervivencia de la levadura mostrando un efecto dependiente de la dosis (Figura 10 C). Estos datos muestran que los dos últimos extractos tienen un efecto positivo en la CLS de la levadura.





**Figura 9. Curvas del porcentaje de la supervivencia de las poblaciones de levadura incubadas con los extractos etanólicos.** A) Extracto de hojas de *A. muricata*. B) Extracto de hojas de *A. squamosa*. C) Extracto de corteza de *B. bucidaefolia*. D) Extracto de raíz de *C. pareira*. E) Extracto de hojas de *C. aconitifolius*. F) Extracto de hojas de *C. sebestena*. G) Extracto de hojas de *J. spicigera*. H) Extracto de hojas de *Z. mauritiana*.



**Figura 10. Curvas del porcentaje de la supervivencia de las poblaciones de levadura incubadas con los extractos metanólicos.** A) Extracto de raíz de *A. mexicana*. B) Extracto de hojas de *C. spicatus*. C) Extracto de partes aéreas de *S. dendroideum*. D) Extracto de hojas de *T. rosea*.

#### 6.4 Efecto de seis extractos candidatos sobre la CLS de tres cepas de referencia de *Saccharomyces cerevisiae*

A partir de los resultados obtenidos en el ensayo de longevidad, se seleccionaron aquellos extractos que incrementaron significativamente la supervivencia de la levadura. Se identificaron seis extractos que se propusieron como candidatos para probar su efecto en tres cepas de referencia de *S. cerevisiae*. Los candidatos fueron las infusiones de hojas de *B. pilosa*, flores de *C. officinalis* y hojas de *L. angustifolia*; los extractos metanólicos de raíz de *A. mexicana* y de partes aéreas de *S. dendroideum*; y la decocción de las hojas de *E. japonica*. Además se probaron dos muestras biológicas de esta última especie, una proveniente del jardín botánico de la UNAM y otra de un parque público de Irapuato, Gto.

De igual forma se compararon las tasas de duplicación (T) de las poblaciones de levaduras incubadas sin tratamiento con las de las poblaciones incubadas con diferentes concentraciones de los extractos, para descartar diferencias significativas entre ellas que pudieran influir en el efecto de los extractos en la CLS de las diferentes cepas de levadura.

Para el caso de la cepa diploide S288c incubada con o sin extracto, no hubo alguna diferencia significativa en la T, excepto cuando se usó el extracto acuoso al 5% de *C. officinalis* o el extracto metanólico al 1% de *A. mexicana* cuya T mostró un valor significativamente menor que el de la población sin tratamiento.

Las poblaciones de la cepa haploide S288c (Mat  $\alpha$ ) incubadas sin tratamiento mostraron una T mayor que las poblaciones incubadas con los extractos candidatos, siendo esta diferencia significativa; excepto el caso antes mencionado de la levadura incubada con 3% ó 5% del extracto de *S. dendroideum*, que mostraron una T significativamente mayor a la de la población sin tratamiento, y con 1% del extracto que no mostró diferencia significativa.

La T de las poblaciones de la cepa YEG01 (Mat  $\alpha$ ) incubada con y sin extracto no mostraron diferencia significativa; sin embargo, se presentaron tres casos específicos donde la T de las poblaciones incubadas con un extracto fue significativamente mayor

que la T de la población sin tratamiento, éstos fueron las poblaciones incubadas con 3%, 4% y 5% de infusión de *C. officinalis*, 5% de infusión de *L. angustifolia* o 1% de la decocción de *E. japonica* de la UNAM.

En los ensayos de determinación de la CLS de la cepa diploide S288c, se observó un efecto positivo de los cuatro extractos acuosos, mismo que también se observó para la cepa haploide YEG01 (Mat  $\alpha$ ). Sin embargo, en el caso de la cepa haploide S288c no se presentó algún aumento en su supervivencia.

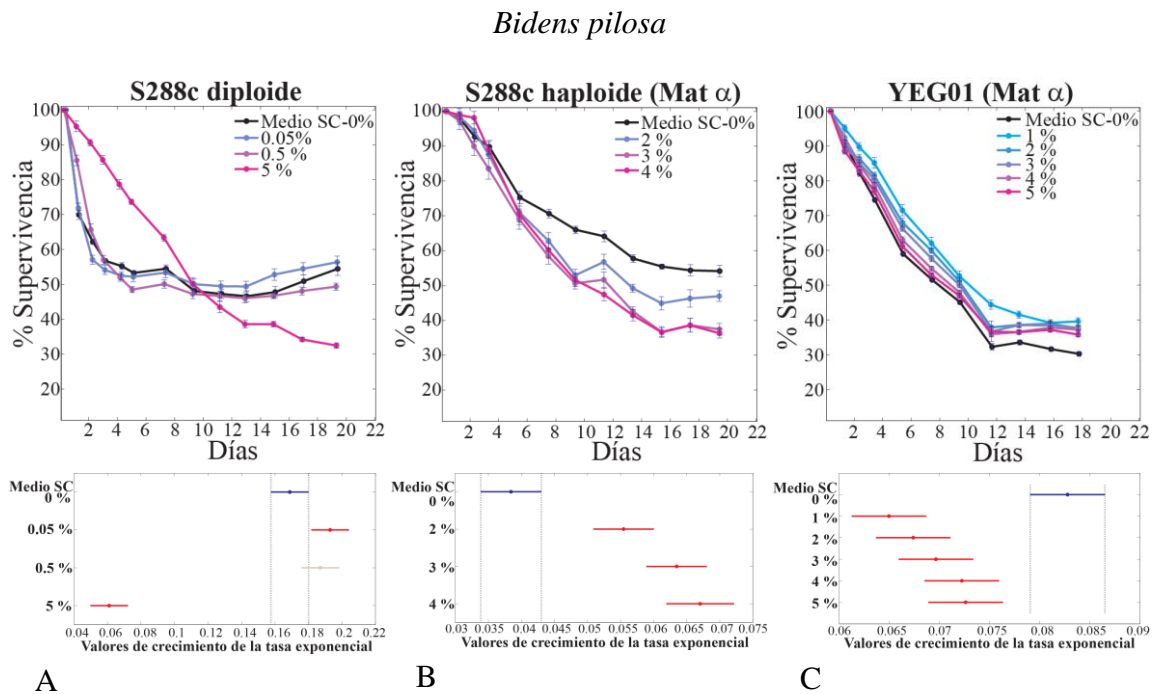
En las Figuras 11 a la 15 se muestran los porcentajes de supervivencia de las tres cepas de referencia probadas con los tres extractos de infusión, así como las dos muestras biológicas de la decocción del níspero.

El extracto de *B. pilosa* al 5% causó un aumento en la supervivencia de la población de la cepa diploide S288c, sin embargo, debido a que a partir del octavo día ya no hubo decaimiento, el efecto sólo pudo observarse hasta ese día (Figura 11A). Para la CLS de la cepa YEG01 (Mat  $\alpha$ ) se observó un efecto dependiente de la dosis; la concentración menor causó una mayor supervivencia (Figura 11C), pero las cinco concentraciones probadas (1%, 2%, 3%, 4% y 5%) tuvieron un efecto benéfico. Sin embargo, en el caso de la cepa haploide S288c (Mat  $\alpha$ ) se observó un efecto contrario, donde a mayor concentración, menor supervivencia de la cepa con respecto a la que no tenía tratamiento (Figura 11B).

El extracto de *C. officinalis* al 5% aumentó la supervivencia de la cepa diploide S288c hasta el sexto día, ya que los siguientes no se observó decaimiento (Figura 12A). Para la cepa YEG01 (Mat  $\alpha$ ) se observó un efecto dependiente de la dosis; a mayor concentración, mayor supervivencia de la población en comparación con la población sin tratamiento. Este efecto se observó en las cuatro concentraciones probadas: 1%, 2%, 3% y 4% (Figura 12B). La supervivencia de la cepa haploide S288c (Mat  $\alpha$ ) no fue probada con este extracto.

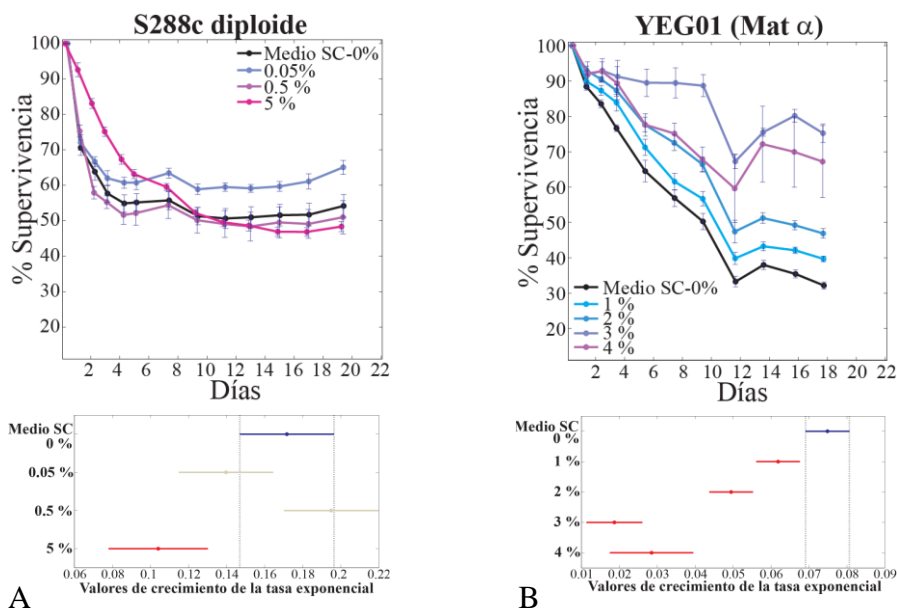
El efecto del extracto de *L. angustifolia* sobre la cepa diploide S288c se probó dos veces. En la primera prueba se tuvo el problema del crecimiento adaptativo, por lo que su efecto sobre la supervivencia de la levadura sólo pudo observarse en los primeros

ocho días, con la concentración mayor (5%) (Figura 13A). En la segunda prueba, la infusión aumentó la supervivencia de la levadura al usar concentraciones de 0.5%, 1% ó 5% (Figura 13B). Al probar el extracto en la cepa YEG01 (Mat  $\alpha$ ), se observó que todas las concentraciones (1%, 2%, 3%, 4% y 5%) aumentaron la supervivencia de la levadura; este aumento fue dependiente de la dosis: a mayor concentración, mayor fue la supervivencia (Figura 13D). Sin embargo, para la cepa haploide S288c (Mat  $\alpha$ ), el extracto tuvo un efecto contrario, ya que las tres concentraciones probadas (1%, 3% y 4%) disminuyeron la supervivencia de *S. cerevisiae* (Figura 13C).



**Figura 11. Curvas del porcentaje de supervivencia de tres cepas de referencia incubadas con la infusión de hojas de *Bidens pilosa*, y su análisis estadístico multivariable. A) Cepa diploide S288c. B) Cepa haploide S288c (Mat  $\alpha$ ). C) Cepa haploide YEG01 (Mat  $\alpha$ ). Análisis estadístico multivariable de los valores de crecimiento de la tasa exponencial (tasa de decaimiento); las barras con valores más pequeños (izquierda del gráfico) representan una mayor supervivencia de la población.**

## *Calendula officinalis*



**Figura 12. Curvas del porcentaje de supervivencia de dos cepas de referencia incubadas con la infusión de flores de *Calendula officinalis*, y su análisis estadístico multivariable. A) Cepa diploide S288c. B) Cepa haploide YEG01 (Mat  $\alpha$ ). Análisis estadístico multivariable de los valores de crecimiento de la tasa exponencial (tasa de decaimiento); las barras con valores más pequeños (izquierda del gráfico) representan una mayor supervivencia de la población.**

Se probaron dos decocciones de hojas de *E. japonica*. El extracto de la muestra proveniente de la UNAM se probó dos veces con la cepa diploide S288c. En la primera, debido al crecimiento adaptativo, el aumento en la supervivencia se observó hasta el octavo día en la población incubada con 5% de extracto (Figura 14A). Para la segunda prueba con la cepa, sólo el extracto al 5% incrementó la supervivencia de la población (Figura 14B). El efecto del extracto sobre la cepa YEG01 (Mat  $\alpha$ ) fue dependiente de la dosis, pero el incremento de la supervivencia fue significativo sólo con las concentraciones de 3%, 4% y 5% (Figura 14D). Con la cepa haploide S288c (Mat  $\alpha$ ), no se observó efecto de los extractos sobre la supervivencia de las poblaciones, para ninguna de sus cinco concentraciones: 1%, 2%, 3%, 4% y 5% (Figura 14C). Por otro lado, el extracto de la muestra obtenida del parque tuvo un patrón similar al de la

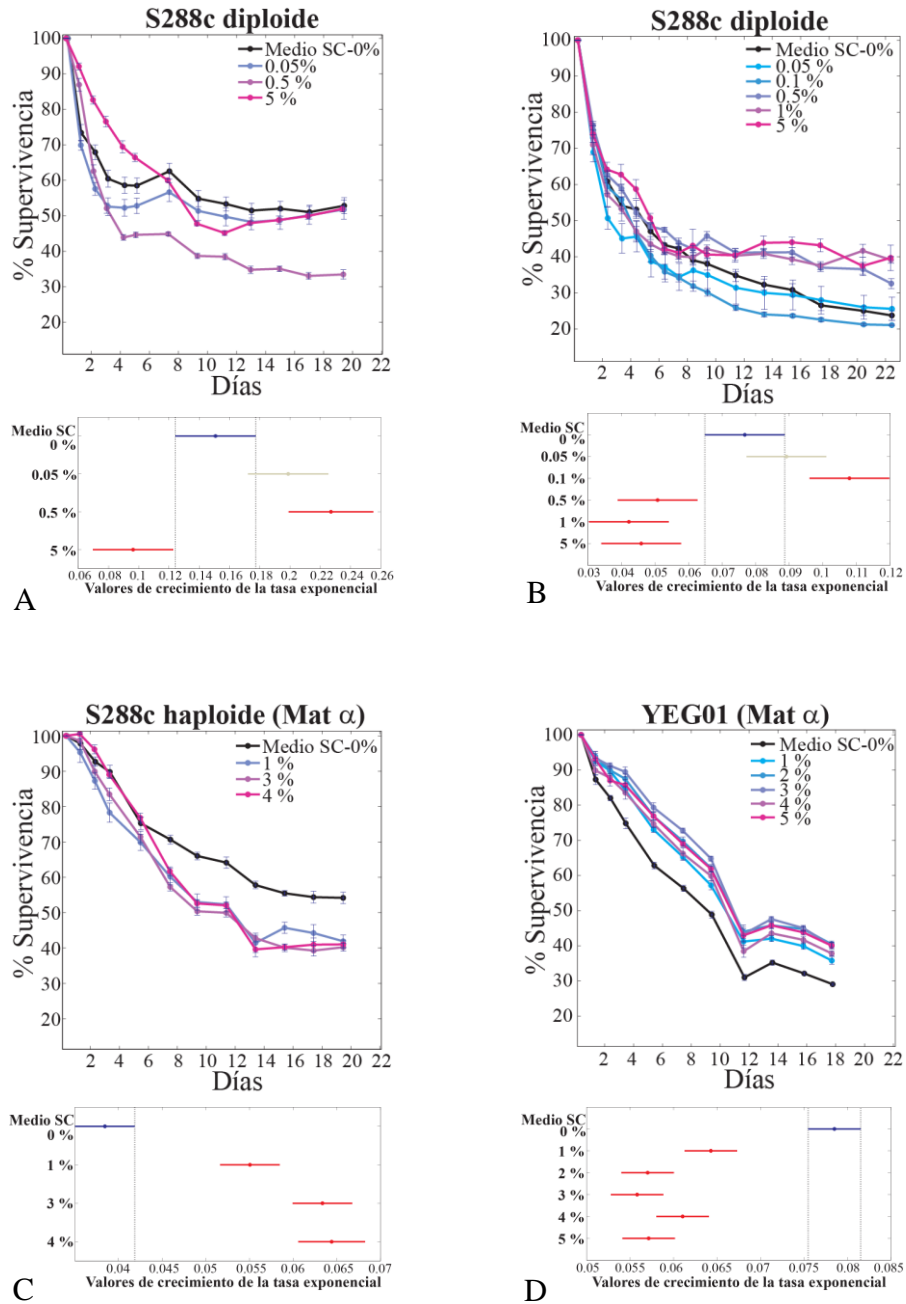


UNAM. En el caso de la cepa diploide S288c, debido al crecimiento adaptativo, sólo en los primeros cuatro días y sólo con el extracto al 5% se observó una mayor supervivencia de la población (Figura 15A). En la cepa YEG01 (Mat  $\alpha$ ) se observó un efecto dependiente de la dosis: mayor concentración, mayor supervivencia; aunque todas las concentraciones (1%, 2%, 3%, 4% y 5%) incrementaron la supervivencia (Figura 15C). De igual forma que con el extracto de la muestra de la UNAM, para la cepa haploide S288c (Mat  $\alpha$ ), el extracto de la muestra del parque no tuvo efecto significativo en la supervivencia de la levadura (Figura 15B).

En la Figura 16 se muestran los porcentajes de supervivencia de las tres cepas de referencia probadas con los dos extractos metanólicos. El extracto de *A. mexicana* se probó inicialmente en la cepa haploide S288c (Mat  $\alpha$ ), teniendo un efecto al aumentar la supervivencia de la población en sus tres concentraciones: 1%, 3% ó 5% (Figura 16B). En la cepa diploide S288c, el efecto del extracto fue dependiente de la dosis: mayor concentración, mayor supervivencia (Figura 16A). Sin embargo, cuando este mismo extracto se probó sobre la cepa YEG01 (Mat  $\alpha$ ) tuvo un efecto negativo en cualquiera de sus concentraciones: 1%, 3% ó 5% (Figura 16C).

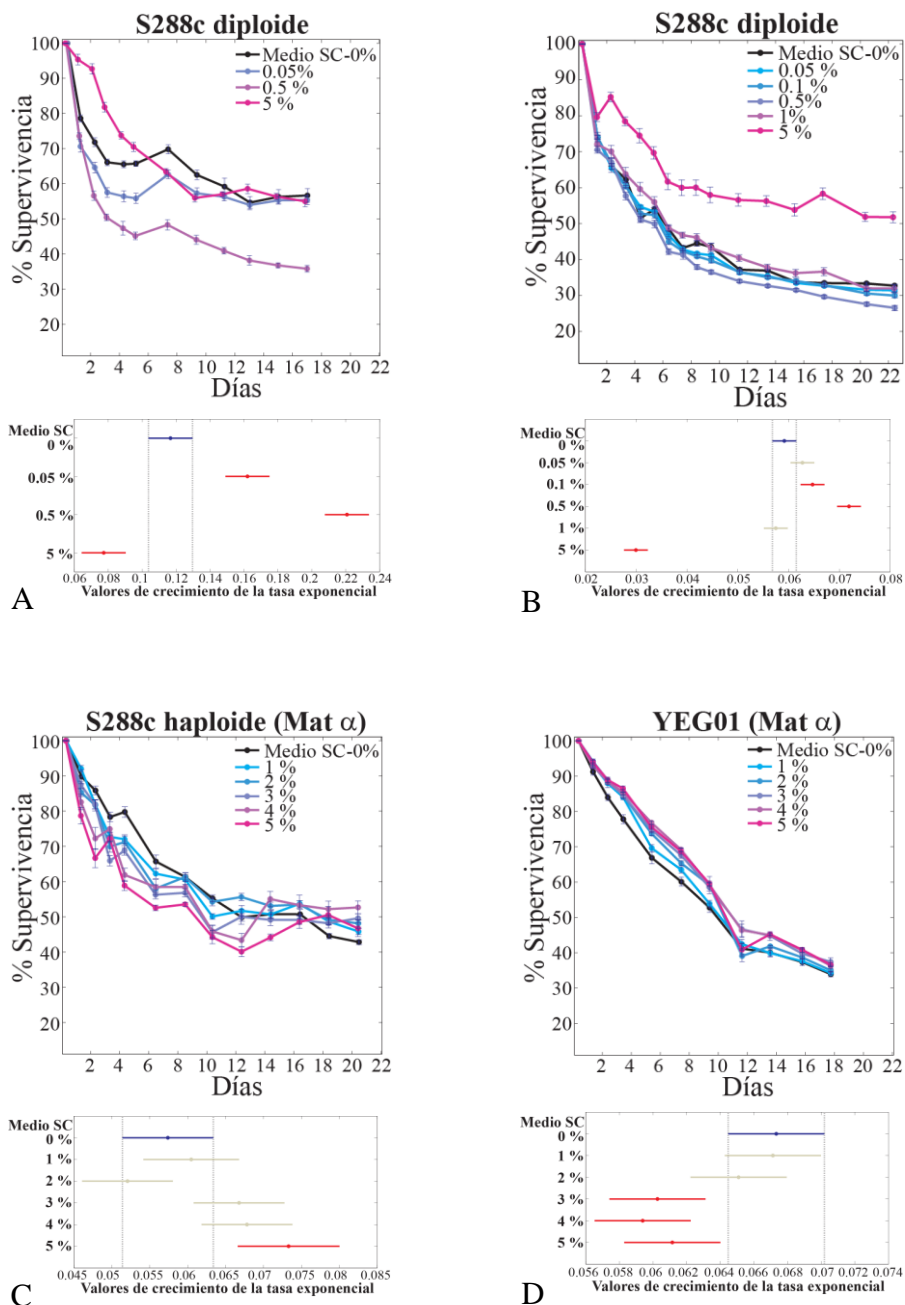
Finalmente, el extracto de *S. dendroideum* se probó primeramente en la cepa haploide S288c (Mat  $\alpha$ ), mostrando un efecto dependiente de la dosis en sus concentraciones de 3% y 5%, donde a mayor concentración del extracto causó una mayor supervivencia de la población (Figura 16E). Cuando este extracto se probó con la cepa diploide S288c, sólo se observó un aumento en la supervivencia de la población con una concentración del 3% (Figura 16D). Sin embargo, cuando este extracto se probó en la cepa YEG01 (Mat  $\alpha$ ) no tuvo efecto en la supervivencia (Figura 16F).

*Lavandula angustifolia*



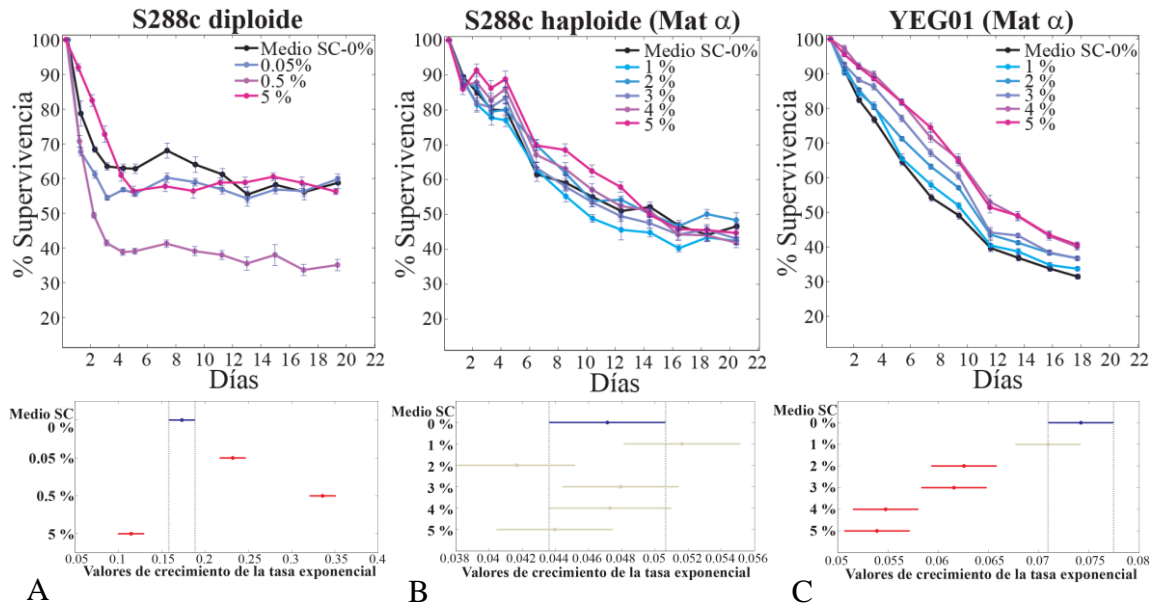
**Figura 13. Curvas del porcentaje de supervivencia de tres cepas de referencia incubadas con la infusión de hojas de *Lavandula angustifolia*, y su análisis estadístico multivariable. A) Cepa diploide S288c para el ensayo 1. B) Cepa diploide S288c para el ensayo 2. C) Cepa haploide S288c (Mat  $\alpha$ ). D) Cepa haploide YEG01 (Mat  $\alpha$ ). Análisis estadístico multivariable de los valores de crecimiento de la tasa exponencial (tasa de decaimiento); las barras con valores más pequeños (izquierda del gráfico) representan una mayor supervivencia de la población.**

*Eriobotrya japonica* (UNAM)



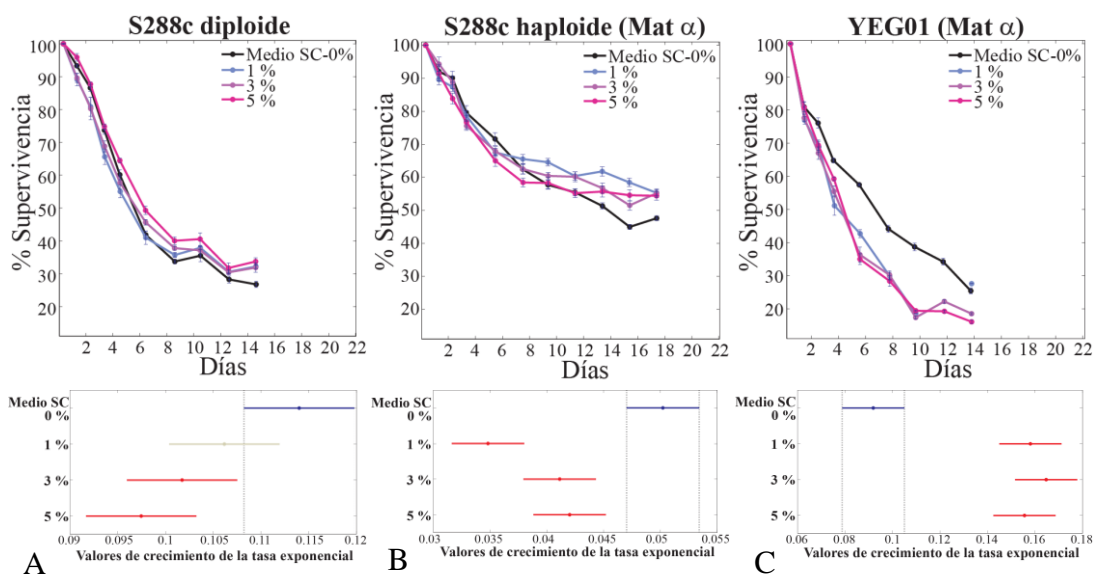
**Figura 14.** Curvas del porcentaje de supervivencia de tres cepas de referencia incubadas con la decocción de hojas de *Eriobotrya japonica* (UNAM), y su análisis estadístico multivariable. A) Cepa diploide S288c para el ensayo 1. B) Cepa diploide S288c para el ensayo 2. C) Cepa haploide S288c (Mat  $\alpha$ ). D) Cepa haploide YEG01 (Mat  $\alpha$ ). Análisis estadístico multivariable de los valores de crecimiento de la tasa exponencial (tasa de decaimiento); las barras con valores más pequeños (izquierda del gráfico) representan una mayor supervivencia de la población.

*Eriobotrya japonica* (parque)

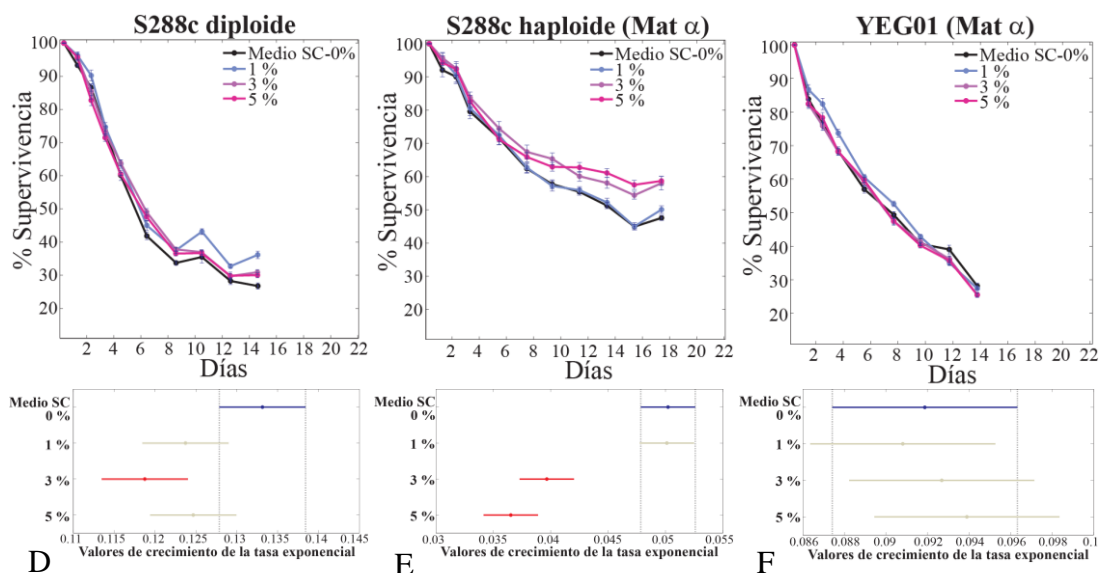


**Figura 15.** Curvas del porcentaje de supervivencia de tres cepas de referencia incubadas con la decocción de hojas de *Eriobotrya japonica* (parque), y su análisis estadístico multivariable. A) Cepa diploide S288c. B) Cepa haploide S288c (Mat  $\alpha$ ). C) Cepa haploide YEG01 (Mat  $\alpha$ ). Análisis estadístico multivariable de los valores de crecimiento de la tasa exponencial (tasa de decaimiento); las barras con valores más pequeños (izquierda del gráfico) representan una mayor supervivencia de la población.

*Acrocomia mexicana*



*Sedum dendroideum*



**Figura 16.** Curvas del porcentaje de supervivencia de tres cepas de referencia incubadas con extractos metanólicos, y su análisis estadístico multivariable. A) Cepa diploide S288c incubada con extracto de *A. mexicana*. B) Cepa haploide S288c (Mat  $\alpha$ ) incubada con extracto de *A. mexicana*. C) Cepa haploide YEG01 (Mat  $\alpha$ ) incubada con extracto de *A. mexicana*. D) Cepa diploide S288c incubada con extracto de *S. dendroideum*. E) Cepa haploide S288c (Mat  $\alpha$ ) incubada con extracto de *S. dendroideum*. F) Cepa haploide YEG01 (Mat  $\alpha$ ) incubada con extracto de *S. dendroideum*. Análisis estadístico multivariable de los valores de crecimiento de la tasa exponencial (tasa de decaimiento); las barras con valores más pequeños (izquierda del gráfico) representan una mayor supervivencia de la población.

### 6.5 Perfil químico de los extractos que muestran efecto sobre la supervivencia de *Saccharomyces cerevisiae*

Para los seis extractos candidatos como promotores de longevidad de la levadura se dispuso complementar la información buscando en la literatura compuestos ya identificados en estos extractos crudos. En la Tabla 2 se enlista la composición química general que se conoce hasta el momento de cada uno de ellos.

Se observó que los flavonoides, que forman parte de los compuestos fenólicos, eran las moléculas que se encontraban en la mayoría de los extractos. Por lo que se hicieron análisis de cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) para identificar los patrones de estos compuestos para cada extracto candidato que se probó. Los extractos candidatos probados fueron las infusiones de *B. pilosa*, *C. officinalis* y *L. angustifolia*; los extractos metanólicos de *A. mexicana* y *S. dendroideum*; y dos muestras biológicas (UNAM y parque) de la decocción de *E. japonica*.

La Figura 17 muestra los resultados del análisis por HPTLC de las siete muestras probadas, donde aparecen los patrones de los compuestos fenólicos presentes en cada uno de ellos. Se presenta únicamente la placa que fue iluminada con luz de 366 nm, ya que en las otras longitudes de onda no se apreciaron las bandas nítidamente.

Para la muestra de *B. pilosa* (1) se aprecian al menos cuatro bandas que sólo aparecen en la placa sin derivatizar (Figura 17A) y que no aparecen en la derivatizada (Figura 17B). De igual forma, el extracto de *A. mexicana* (6) muestra una banda difusa en la placa sin derivatizar, pero en la placa derivatizada desaparece. Por su parte, los extractos de *L. angustifolia* (2), *C. officinalis* (3) y *S. dendroideum* (7) presentan un patrón con más bandas en la placa sin derivatizar, pero en la derivatizada las bandas que se muestran tienen mayor nitidez. Finalmente, los patrones de compuestos fenólicos para las dos muestras biológicas de *E. japonica* en la placa sin derivatizar son iguales, sin embargo, en la placa derivatizada la muestra de la UNAM (4) presenta dos bandas extras en comparación de la del parque (5). No obstante, los patrones para estas dos muestras tienen una mayor similitud entre sí que con las otras cinco muestras probadas.

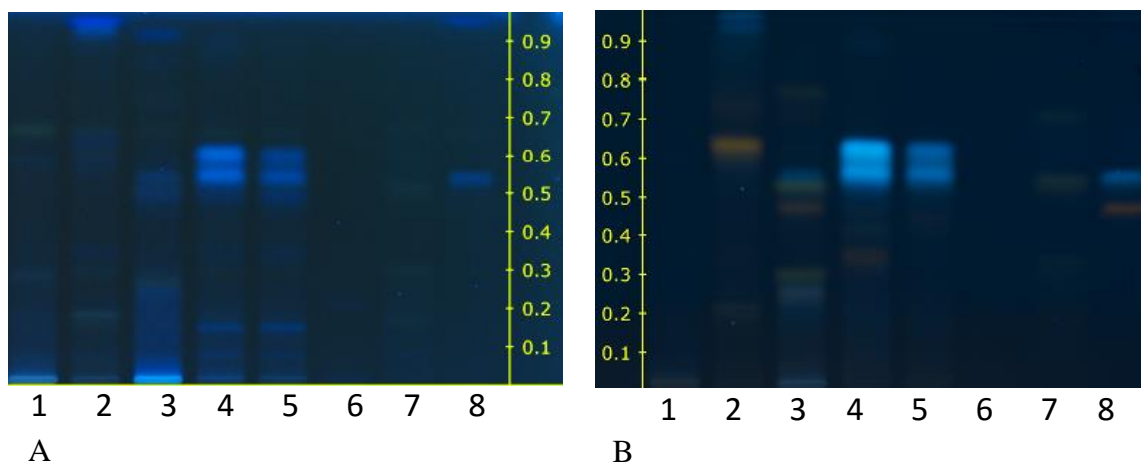
Con estos resultados se logró identificar algunos compuestos fenólicos presentes en los extractos. Por ejemplo, el ácido 3,4 dimetoxicinámico ( $RF > 0.9$ ) en el extracto de *L. angustifolia* en la placa sin derivatizar; la rutina ( $RF = 0.45$ ) que se observó como una banda naranja en el extracto de *C. officinalis* en la placa derivatizada; y el ácido clorogénico ( $RF = 0.55$ ) que se observó como una banda azul celeste en las dos muestras biológicas de *E. japonica* y en *C. officinalis* tanto en la placa sin derivatizar como en la derivatizada.

Otra de las características que se determinó en los extractos candidatos fue su capacidad antioxidante. La Figura 18 muestra una placa de HPTLC derivatizada con DPPH e iluminada con luz blanca de transmisión; las bandas claras que se observaron representan a los compuestos que tienen capacidad antioxidante. El extracto de *L. angustifolia* (2) muestra al menos tres bandas nítidas y anchas, siendo el extracto que tiene los compuestos con capacidad antioxidante más notorios de los probados. Las dos muestras de *E. japonica* presentan el mismo patrón de bandas, siendo la de la UNAM (4) la que muestra las bandas más nítidas en comparación con la muestra del parque (5). Sin embargo, los otros cuatro extractos candidatos, *B. pilosa* (1), *C. officinalis* (3), *A. mexicana* (6) y *S. dendroideum* (7), no mostraron compuestos con capacidad antioxidante en esta prueba.

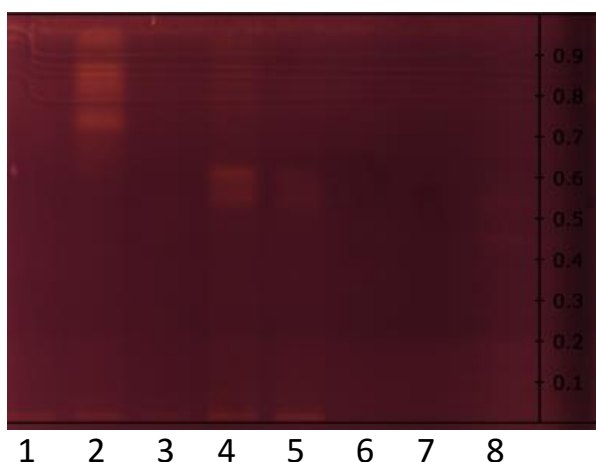
**Tabla 2. Composición química reportada previamente para los extractos candidatos**

Especie	Composición	Referencias
<i>Acrocomia mexicana</i>	- <b>Raíz:</b> Coyolosa; Tetrahydropirano	Pérez <i>et al.</i> , 1997
<i>Bidens pilosa</i>	<p>- <b>Hojas:</b> Flavonoides (Quercetina, Iso-okanina)</p> <p>- <b>Partes aéreas:</b> Flavonoides (Calconas, Aurenas); Taninos; Saponinas</p> <p>- <b>Planta completa:</b> Productos alifáticos naturales (Hidrocarbones saturados sin ramificar, Alcoholes saturados no ramificados, Ácidos carboxílicos saturados no ramificados, Esteres no ramificados alifáticos, Hidrocarburos acetilénicos); Hidrocarburos aromáticos simples (Fenoles simples, Aril aldehidos simples, Ácidos benzóicos simples); Fenilpropanoides (Fenilpropanoides simples, Esteres coumaricos y cafeoilos, Coumarinas); Flavonoides (Aurones, Calcones, Flavononas, Flavonas, Flavonolas); Terpenoides (Sesquiterpenos, Diterpenos, Esteroides, Triterpenos, Tetraterpenos); Porfirinas</p>	Fotso <i>et al.</i> , 2014 Silva <i>et al.</i> , 2011 Souza <i>et al.</i> , 2013
<i>Calendula officinalis</i>	<p>- <b>Hojas:</b> Fenilpropanoides (Ácido caféico, Ácido mono y di-O-cafeoilquinico); Flavonoides (Calendoflavosida, Isoquercitina, Quercetina-3-O-(6"-acetil)-<math>\beta</math>-D-glucopiranosida, Isorhamnetina-3-O-<math>\beta</math>-D-glucopiranosida, Isorhamnetina-3-O-(6"-acetil)-<math>\beta</math>-D-glucopiranosida); Quinonas; Carotenoides; Lípidos</p> <p>- <b>Flores:</b> Ácido caféico; Faradiol; Ácido clorogénico; Rutina; Terpenoides; Aceites volátiles; Lípidos; Aminoácidos libres</p> <p>- <b>Inflorescencias:</b> Flavonoides; Coumarinas; Carbohidratos</p>	Loescher <i>et al.</i> , 2014 Muley <i>et al.</i> , 2009 Olennikov <i>et al.</i> , 2014
<i>Eriobotrya japonica</i>	<p>- <b>Hojas:</b> Triterpenos; Sesquiterpenos; Flavonoides; Taninos; Glicosidas megastigmana</p> <p>- <b>Frutos:</b> Azúcares (Fructosa, Glucosa, Sorbitol y Sucrosa); Fenólicos; Flavonoides; Carotenoides; Vitamina C</p> <p>- <b>Flores:</b> Flavonoides (Hespetina, Ácido gálico); Fenólicos</p>	Cha <i>et al.</i> , 2011 Esmaeili <i>et al.</i> , 2014 Xu <i>et al.</i> , 2011
<i>Lavandula angustifolia</i>	<p>- <b>Hojas y flores:</b> Fenoles (Ácido ferulico, Glucosida kaemferol malonil, Ácido rosmarinico)</p> <p>- <b>Aceites esenciales:</b> Linalool; Antranilato linalil; 1-terpineno-4-ol, p-ment-1-en-8-ol; 1,8-cineola; Linalool; Bomeol; Beta-fellandreno; Camfor</p>	Adaszynska <i>et al.</i> , 2013 Lakusic <i>et al.</i> , 2014 Spiridon <i>et al.</i> , 2011
<i>Sedum dendroideum</i>	- <b>Jugo de hojas:</b> Flavonoides (Kaempferitrina, Kaempferol 3-O- $\beta$ -glucopyranosida-7-O- $\alpha$ -rhamnopyranosida, Kaempferol 3-O-neohesperidosida-7-O- $\alpha$ -rhamnopyranosida; $\alpha$ -rhamnoisorobina; Kaempferol 3-O-neohesperidosida-7-O- $\beta$ -glucopyranosida; Afzelina; Kaempferol)	De Melo <i>et al.</i> , 2009





**Figura 17. Resultados del análisis por HPTLC de los extractos candidatos para identificar patrones de sus compuestos fenólicos.** A) Placa desarrollada con acetato de etilo : ácido fórmico : ácido acético : agua (100:11:11:13 por volumen) e iluminada con luz de 366 nm. B) Placa derivatizada con reactivo de Productos Naturales y polietilenglicol e iluminada con luz de 366 nm. 1) Extracto de *B. pilosa*, 2) Extracto de *L. angustifolia*, 3) Extracto de *C. officinalis*, 4) Extracto de *E. japonica* (UNAM), 5) Extracto de *E. japonica* (parque), 6) Extracto de *A. mexicana*, 7) Extracto de *S. dendroideum*, 8) Estándares de compuestos fenólicos.



**Figura 18. Resultado del análisis por HPTLC de los extractos candidatos para identificar patrones de actividad antioxidante.** Placa desarrollada con acetato de etilo : ácido fórmico : ácido acético : agua (100:11:11:13 por volumen), derivatizada con DPPH e iluminada con luz blanca de transmisión. 1) Extracto de *B. pilosa*, 2) Extracto de *L. angustifolia*, 3) Extracto de *C. officinalis*, 4) Extracto de *E. japonica* (UNAM), 5) Extracto de *E. japonica* (parque), 6) Extracto de *A. mexicana*, 7) Extracto de *S. dendroideum*, 8) Estándares de compuestos fenólicos.

### 6.6 Efecto del extracto de *Eriobotrya japonica* (níspero) en cepas mutantes de genes relacionados al envejecimiento para identificar sus mecanismos de acción

Se eligió *E. japonica* entre las seis especies candidatas propuestas en este trabajo para identificar su mecanismo de acción, debido a la facilidad con la que se obtenía la muestra. El extracto de la decocción de hojas del níspero se probó en quince mutantes de genes relacionados al envejecimiento para identificar posibles interacciones de los componentes del extracto con estos genes. Para ello se usó el ensayo automatizado para caracterizar el envejecimiento cronológico de 15 cepas mutantes de *S. cerevisiae*, así como la cepa de referencia YEG01 (Mat  $\alpha$ ), tratadas con 5% del extracto de níspero y un control sin tratamiento.

Asimismo, se midió la cinética de crecimiento para calcular la tasa de duplicación (T) de las poblaciones, con la finalidad de asegurar que no había diferencia significativa que pudiera influir en el efecto del extracto en la CLS de la levadura.

Se observó que la T de las poblaciones de la cepa de referencia (WT) con y sin extracto de níspero no mostraba diferencia significativa. Cuando se comparó la T de cada una de las poblaciones de cepas mutantes con y sin extracto de níspero tampoco se observó diferencia significativa; excepto para la cepa mutante  $\Delta ras2$ , donde la T de la población con el extracto de níspero fue menor que la T de la población control, siendo esta diferencia significativa.

Posteriormente, cuando se realizaron los ensayos de determinación de la CLS con las cepas mutantes de  $\Delta atg21$  (proteína de unión a fosfoinositida, relacionada a autofagia),  $\Delta cyb5$  (citocromo B),  $\Delta gis1$  (factor de transcripción, dimetilasa de histonas) y  $\Delta tor1$  (cinasa blanco de rapamicina) se tuvieron problemas técnicos, por lo que los resultados obtenidos no fue posible interpretarlos adecuadamente. Los resultados del ensayo de CLS de las demás cepas mutantes se muestran a continuación.

En todas las gráficas de supervivencia se puede apreciar que la cepa de referencia YEG01 (Mat  $\alpha$ ) con el extracto de níspero al 5%, representada por una línea sólida negra, tiene una mayor supervivencia si se compara con la población que no tiene

extracto (Medio SC – 0%), representada con la línea punteada negra, siendo esta diferencia significativa.

Se usó como control interno la cepa mutante  $\Delta his1$ , por ser una mutación que no tiene efecto en el envejecimiento. En la Figura 19A se observa que la cepa de referencia (línea punteada negra) y la cepa mutante (línea punteada magenta) tienen el mismo porcentaje de supervivencia y no existe una diferencia significativa entre ellas, tal como se esperaba. Para ambas cepas incubadas con el extracto de níspero al 5% hubo un igual incremento en la supervivencia, sin mostrar diferencia significativa entre ellas. El aumento en la supervivencia de las poblaciones con el extracto de níspero fue significativo.

En este ensayo se trabajó con cuatro cepas mutantes de genes relacionados al envejecimiento porque su ausencia incrementa la supervivencia de la levadura; su efecto fue identificado en ensayos previos. Estas mutantes son:  $\Delta ald6$  (acetaldehído deshidrogenasa),  $\Delta ras2$  (regulador de la respuesta a carencia de nitrógeno),  $\Delta rps14A$  (proteína ribosomal de la unidad pequeña) y  $\Delta swr1$  (remodelador de la cromatina). En los cuatro casos se observó que la cepa mutante (línea punteada magenta) tuvo una mayor supervivencia comparada con la cepa de referencia (línea punteada negra).

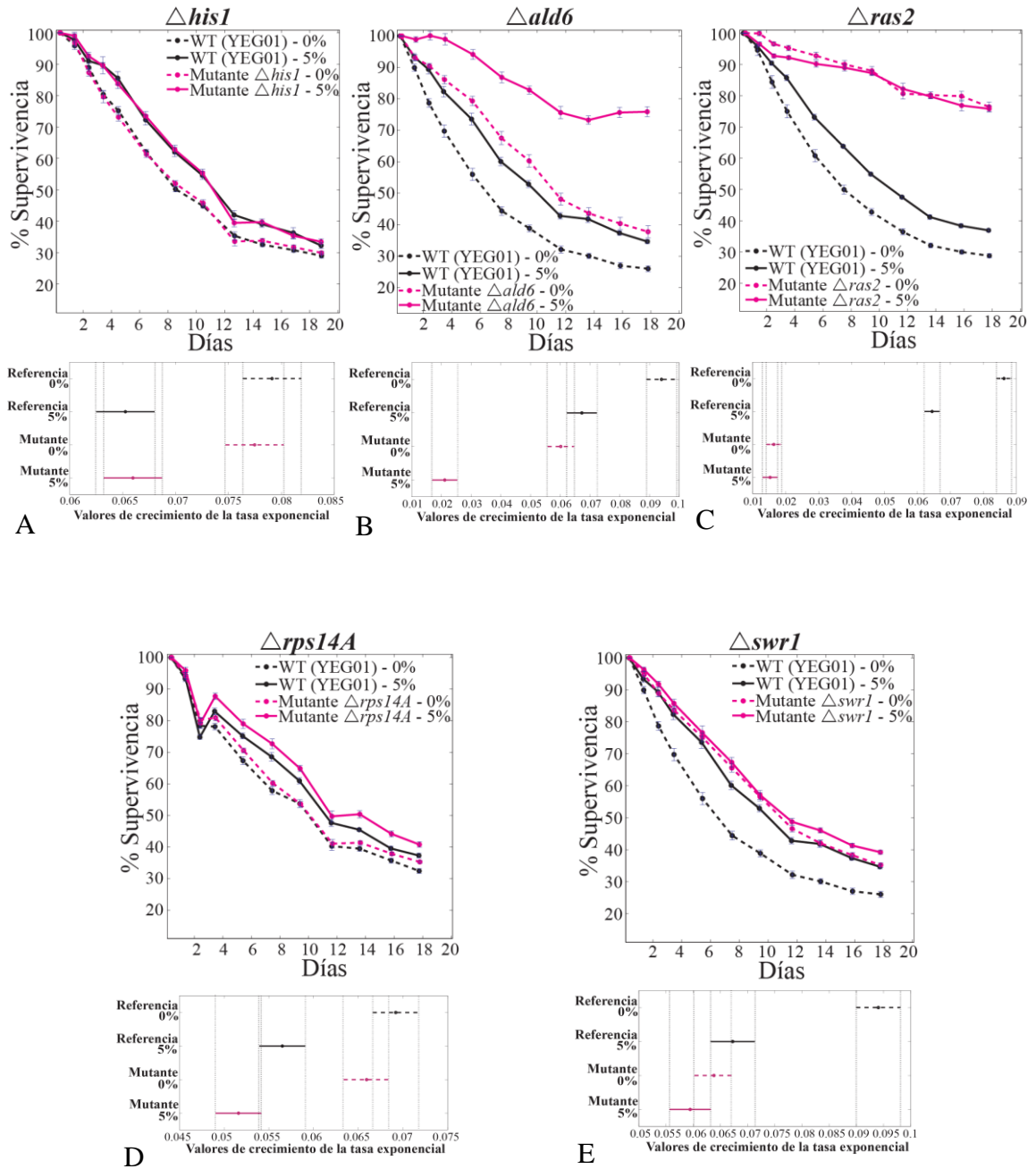
La cepa mutante  $\Delta ald6$  (Figura 19B), línea punteada magenta, mostró una mayor supervivencia que la cepa de referencia (línea punteada negra); esta diferencia fue significativa. Por otro lado, la cepa de referencia incubada con extracto de níspero al 5% (línea sólida negra) mostró un incremento significativo en la supervivencia con respecto a la cepa de referencia sin extracto (línea punteada negra). El incremento en la supervivencia por el efecto del extracto de níspero es similar al causado por el efecto de la mutación, siendo la supervivencia de ambas poblaciones de alrededor del 40%, y entre ellas no hay diferencia significativa. Sin embargo, la cepa mutante  $\Delta ald6$  incubada con extracto de níspero al 5% (línea sólida magenta) mostró un incremento sobre la supervivencia aún mayor, siendo de casi el doble de los antes mencionados, y significativamente diferente a todos los anteriores.

En la Figura 19C, la cepa mutante  $\Delta ras2$  (línea punteada magenta) tuvo una mayor supervivencia (casi un 80%) con respecto a la de la cepa de referencia (línea punteada negra), siendo significativa esta diferencia. Sin embargo, no hubo una diferencia significativa en la supervivencia de la cepa mutante incubada con extracto de níspero (línea sólida magenta) o sin el extracto (línea punteada magenta).

Por su parte, la mutante  $\Delta rps14A$  (Figura 19D, línea punteada magenta), mostró un ligero aumento en su supervivencia comparado con la cepa de referencia (línea punteada negra), aunque esta diferencia no es significativa. La supervivencia de la cepa mutante incubada con el extracto de níspero (línea sólida magenta) fue mayor que la de la cepa mutante sin tratamiento (línea punteada magenta), siendo significativa esta diferencia; además de ser ligeramente mayor que la supervivencia de la cepa de referencia con tratamiento (línea sólida negra), aunque entre ellas no hay diferencia significativa.

Finalmente, la supervivencia de la cepa  $\Delta swr1$  (Figura 19E) sin tratamiento (línea punteada magenta), incubada con el extracto de níspero (línea sólida magenta) y la de la cepa de referencia con tratamiento (línea sólida negra) no mostraron una diferencia significativa entre ellas; sin embargo, su supervivencia fue mayor que la de la cepa de referencia sin tratamiento (línea punteada negra), siendo esta diferencia significativa.

Por su parte, se probaron seis cepas mutantes de genes relacionados al envejecimiento porque su ausencia disminuye la supervivencia de la levadura; su efecto fue identificado en ensayos previos. Estas mutantes son:  $\Delta hap3$  (factor de transcripción y regulador global de la expresión de genes respiratorios),  $\Delta rim15$  (proteína cinasa involucrada en la proliferación),  $\Delta ste12$  (factor de transcripción que es activado por señalización de MAPK),  $\Delta msn2$  (activador transcripcional en respuesta a estrés),  $\Delta msn4$  (activador transcripcional en respuesta a estrés) y  $\Delta msn2\Delta msn4$ . Todas las mutantes (línea punteada magenta) tuvieron una menor supervivencia comparada con la cepa de referencia (línea punteada negra).



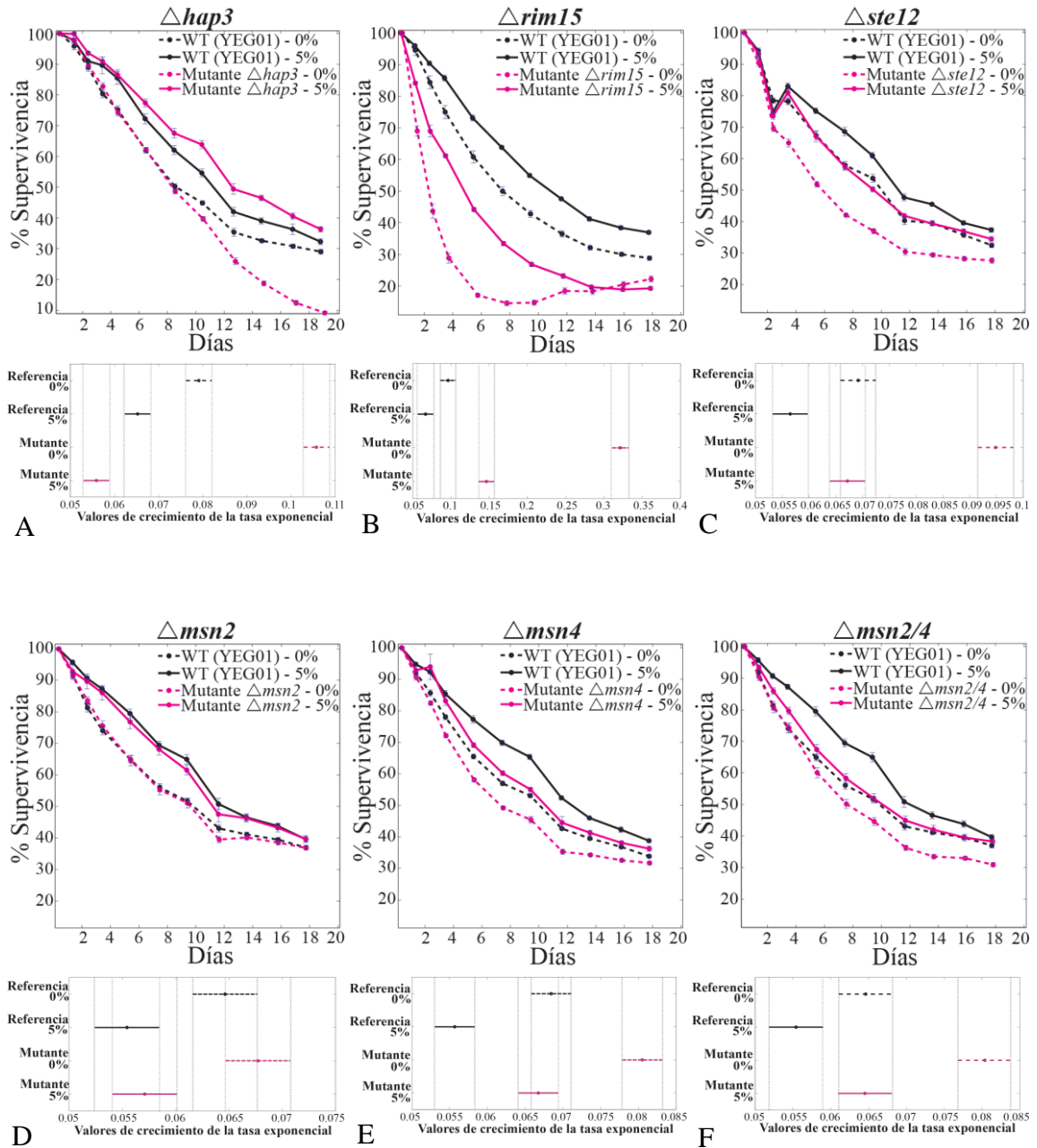
**Figura 19.** Curvas del porcentaje de decaimiento de las cepas mutadas en genes relacionados con el envejecimiento por aumentar la supervivencia, tratadas con extracto de níspero al 5%, y su análisis estadístico multivariable. A) Cepa mutante  $\Delta his1$ . B) Cepa mutante  $\Delta ald6$ . C) Cepa mutante  $\Delta ras2$ . D) Cepa mutante  $\Delta rps14A$ . E) Cepa mutante  $\Delta swr1$ . Análisis estadístico multivariable de los valores de crecimiento de la tasa exponencial (tasa de decaimiento); las barras con valores más pequeños (izquierda del gráfico) representan una mayor supervivencia de la población.

En el caso de las cepas mutantes  $\Delta msn2$  (Figura 20D),  $\Delta msn4$  (Figura 20E) y  $\Delta msn2\Delta msn4$  (Figura 20F) incubados con el extracto de níspero (línea sólida magenta) se observa un aumento en su supervivencia cuando se compara con la de las cepas mutantes sin tratamiento (línea punteada magenta), siendo en los tres casos una diferencia significativa. El aumento en la supervivencia de las cepas mutantes incubadas en el extracto es el mismo que se observó en la cepa de referencia incubada con el extracto.

La supervivencia de la cepa mutante  $\Delta rim15$  (Figura 20B) con tratamiento (línea sólida magenta) fue significativamente mayor que la supervivencia de la cepa mutante sin tratamiento (línea punteada magenta); sin embargo, la mutante incubada con el extracto no logró recuperarse por completo para alcanzar la misma supervivencia que la cepa de referencia sin tratamiento (línea punteada negra). Además, el aumento en la supervivencia de las cepas de referencia y mutante incubadas con el extracto de níspero, fue muy similar.

Por su parte, la cepa  $\Delta ste12$  (Figura 20C) incubada con el extracto (línea sólida magenta), se recuperó hasta alcanzar el porcentaje de supervivencia de la cepa de referencia sin tratamiento (línea punteada negra); sin embargo, la cepa de referencia con tratamiento (línea sólida negra) tuvo una mayor supervivencia en comparación de las antes mencionadas, siendo significativamente diferentes.

La mutante  $\Delta hap3$  (Figura 20A) incubada con extracto de níspero (línea sólida magenta) no sólo se recuperó si se compara con su supervivencia sin tratamiento (línea punteada magenta), sino que mostró una supervivencia mayor que la cepa de referencia sin tratamiento (línea punteada negra) y con tratamiento (línea sólida negra), siendo todas estas diferencias significativas.



**Figura 20. Curvas del porcentaje de decaimiento de las cepas mutadas en genes relacionados con el envejecimiento por disminuir la supervivencia, tratadas con extracto de níspero al 5%, y su análisis estadístico multivariable.** A) Cepa mutante  $\Delta hap3$ . B) Cepa mutante  $\Delta rim15$ . C) Cepa mutante  $\Delta ste12$ . D) Cepa mutante  $\Delta msn2$ . E) Cepa mutante  $\Delta msn4$ . F) Cepa mutante  $\Delta msn2 \Delta msn4$ . Análisis estadístico multivariable de los valores de crecimiento de la tasa exponencial (tasa de decaimiento); las barras con valores más pequeños (izquierda del gráfico) representan una mayor supervivencia de la población.

## 7.0 Discusión

Para cumplir con los objetivos de este trabajo, se implementó un ensayo automatizado de prueba usando compuestos identificados previamente como promotores de la longevidad. El ensayo confirmó que tres compuestos (metformina, espermidina y rapamicina) incrementan significativamente la CLS de la levadura. Posteriormente se realizó un rastreo a gran escala de extractos de plantas medicinales para identificar aquellos capaces de extender la longevidad durante el envejecimiento cronológico de la levadura *S. cerevisiae*. Este trabajo reveló que seis extractos (*Acrocomia mexicana*, *Bidens pilosa*, *Calendula officinalis*, *Eriobotrya japonica*, *Lavandula angustifolia*, *Sedum dendroideum*) incrementan significativamente la CLS de la levadura. También se probaron los seis extractos en tres diferentes cepas de *S. cerevisiae* para determinar si el efecto sobre la CLS era independiente de la cepa usada. Además se caracterizó el perfil de compuestos fenólicos y el efecto antioxidante de los seis extractos candidatos. Finalmente se identificó que el extracto de *E. japonica* interactúa funcionalmente con al menos dos genes que están relacionados al envejecimiento.

### 7.1 Los compuestos metformina, espermidina y rapamicina aumentan la CLS de *Saccharomyces cerevisiae*

De los siete compuestos identificados como promotores de la longevidad, en mi ensayo cuatro de ellos fueron inefectivos para extender la CLS de la levadura en las concentraciones probadas. Los efectos en la extensión de la duración de la vida de la dapsone y la curcumina anteriormente fueron demostrados en otros organismos modelo como gusanos, moscas y roedores, pero dicho efecto no se observó en levaduras (Choi *et al.*, 2013). Las diferencias naturales de la complejidad de tener sistemas multicelulares y unicelulares, o simplemente porque estos compuestos actúan a nivel sistémico, pueden ser la razón por la cual estos dos compuestos no extendieron la CLS de la levadura. Por su parte, el resveratrol primeramente fue descrito como un potencial promotor de la longevidad por extender la RLS de la levadura e incrementar la actividad de Sir2 (Howitz *et al.*, 2003). Es importante mencionar que para medir la duración de vida en las



levaduras se han usado los dos modelos de envejecimiento, la CLS y la RLS, sin embargo, estos dos métodos tienen características biológicas diferentes (Longo *et al.*, 2012). La CLS refleja la supervivencia cuando un medio se ha agotado, planteando un envejecimiento celular, mientras que la RLS es el número de progenie que una célula produce hasta perder su fecundidad, planteando un parámetro de reproducción. Hasta el momento no se ha encontrado una correlación fuerte entre ambos modelos de envejecimiento; en mi ensayo esta falta de correlación fue evidente, ya que a pesar de lo descrito para la RLS, el resveratrol fue inefectivo para extender la CLS de la levadura. Otro punto importante es que el resveratrol aumenta la longevidad a través del incremento de la actividad de Sir2, sin embargo, este mecanismo se ha reportado que extiende la RLS pero que no incrementa la CLS (Kaeberlyn, 2010). Finalmente, la cafeína se menciona que incrementa la CLS de la levadura con un tratamiento de 400  $\mu\text{M}$  en un ensayo de UFC (Unidades Formadoras de Colonia), pero que este incremento era muy pequeño, sólo a las 20 h incrementaba la supervivencia media de la levadura (Wanke *et al.*, 2008). Es posible que el ensayo que se empleó en este trabajo fuera incapaz de detectar un cambio tan minúsculo en la CLS de la levadura a pesar de haber usado concentraciones de hasta 10 mM de este compuesto. Sin embargo, mis resultados son consistentes con los de Choi *et al.* (2013), donde ninguno de los cuatro compuestos, cafeína, curcumina, dapsona y resveratrol, tuvieron efecto en la CLS de la levadura, a pesar de que fueron probados en dos medios, YPD y SC, y por dos ensayos distintos al mío, citometría de flujo por tinción de viabilidad con PI (propidium iodide = yoduro de propidio) y UFC (Choi *et al.*, 2013).

Los compuestos que en este ensayo incrementaron significativamente la CLS de la levadura fueron la metformina, la espermidina y la rapamicina. De la metformina ya se había demostrado su efecto en extender la duración de la vida en otros organismos modelo como *C. elegans* y *Mus musculus* (Anisimov *et al.*, 2008), pero no había sido probado su efecto en la levadura. Choi *et al.*, 2013 realizaron un ensayo con concentraciones de hasta 1 mM de metformina sin obtener un incremento en la CLS de *S. cerevisiae*. A diferencia de estos ensayos, en mi trabajo se probaron concentraciones mayores, observándose que las concentraciones 5 mM y 10 mM extendían la CLS de la levadura. Esto demuestra que la concentración 1 mM de metformina es insuficiente para

aumentar la CLS de la levadura y que se requieren concentraciones mayores a ésta, siendo su efecto dependiente de la dosis. Las sólidas pruebas del efecto de la metformina para aumentar la duración de la vida en los diversos organismos a través de mecanismos básicos del envejecimiento, la ha convertido en la primera droga que se ensayará en humanos, en un estudio aprobado por la FDA, para avalar su efecto en la longevidad (TAME Study, 2015). El efecto de la espermidina para retrasar el envejecimiento se ha descrito en levaduras, gusanos, moscas, cultivos de células de ratón y células humanas. En las levaduras, la concentración 4 mM se describió que extendía la CLS en el ensayo de clonogenicidad (Eisenberg *et al.*, 2009). Al igual que en ese estudio, nosotros observamos que la espermidina extendía la CLS de la levadura en concentraciones desde 1 mM, corroborando que el efecto es consistente aún usando dos ensayos diferentes. El efecto de la rapamicina para retrasar el envejecimiento se ha descrito en la mayoría de los organismos modelo. Para *S. cerevisiae*, se observó que desde una concentración 100 nM, la rapamicina incrementa la CLS hasta en un 87%, en dos diferentes medios, YPD y SC, y por dos ensayos, UFC y citometría de flujo por tinción de viabilidad con PI (Choi *et al.*, 2013). Al igual que en este estudio, mis resultados mostraron que la rapamicina aumenta la CLS, a pesar de usar una concentración menor, 50 nM, y un ensayo de densidad óptica.

El ensayo automatizado de densidad óptica para el análisis masivo de muestras, propuesto en este trabajo, es efectivo para identificar compuestos o extractos que son capaces de extender la longevidad en el modelo del envejecimiento cronológico de *S. cerevisiae*. Este ensayo, a pesar de ser indirecto, muestra resultados consistentes al compararse con los descritos en otros estudios que usaron ensayos directos como citometría de flujo, UFC y clonogenicidad, para los siete compuestos identificados como promotores de longevidad (cafeína, curcumina, dapsona, espermidina, metformina, rapamicina y resveratrol).

## 7.2 Seis extractos de plantas medicinales incrementan significativamente la CLS de *Saccharomyces cerevisiae*

Como ya se señaló, *S. cerevisiae* se ha usado como organismo modelo para identificar extractos de plantas que aumentan la CLS en rastreos a gran escala, permitiendo proponer extractos candidatos para obtener más información de ellos y su relación con la longevidad (Lutchman *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2014). En mi estudio se probaron 36 extractos de plantas correspondientes a 30 especies, encontrando que seis de ellas eran eficientes para extender la CLS de la levadura; éstas fueron: *A. mexicana*, *B. pilosa*, *C. officinalis*, *E. japonica*, *L. angustifolia* y *S. dendroideum*.

La aceitilla (*B. pilosa*) es originaria de América; el extracto de sus partes aéreas tiene efecto hipoglucémico, antiinflamatorio, antioxidante y antitumoral contra el carcinoma de Ehrlich (Alarcon-Aguilar *et al.*, 2002; Fotso *et al.*, 2014; Kwiecinski *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2013). El extracto probado en fibroblastos humanos mostró habilidad para estimular la matriz extracelular, incrementar factores de crecimiento y modular receptores de retinol, probando ser un agente reparador antienvjecimiento (Dieamant *et al.*, 2015). Demostramos que el extracto de aceitilla también tiene efecto antienvjecimiento en levaduras, ya que incrementa significativamente su CLS. Cabe esperar que en estudios siguientes se muestre el efecto antienvjecimiento en otros organismos.

El níspero (*E. japonica*) es ampliamente cultivado por el valor de su fruto y por ser una planta ornamental. En la medicina tradicional china se usan sus hojas para combatir diversas enfermedades; el efecto hipoglucémico, antioxidante y antiinflamatorio del extracto de las hojas y tallos ha sido probado de manera fehaciente (Cha *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2008; Rashed *et al.*, 2014). Además, el extracto de las semillas, probado en cultivos de fibroblastos de ratas, retarda y protege del envejecimiento celular porque asemeja la homeostasis del calcio intracelular de células senescentes al de las células jóvenes (Muramoto *et al.*, 2011). En mi estudio, las dos muestras biológicas de *E. japonica* fueron capaces de aumentar significativamente la CLS de la levadura, corroborando que el níspero tiene efectos en la longevidad y apoyando el efecto en el retraso del envejecimiento descrito por Muramoto *et al.* (2011).

Al igual que la aceitilla y el níspero, los extractos de coyul (*A. mexicana*), caléndula (*C. officinalis*), lavanda inglesa (*L. angustifolia*) y siempreviva (*S. dendroideum*) tienen efecto para combatir diversas enfermedades relacionadas con la edad. Por ejemplo, el extracto de raíz de coyul tiene efecto hipoglucémico (Andrade-Cetto *et al.*, 2005); e, incluso, se ha demostrado que estos extractos contrarrestan más de una enfermedad. El extracto de siempreviva tiene efecto antiinflamatorio e hipoglucémico (Da Silva *et al.*, 2014; De Melo *et al.*, 2009), la infusión de flor de caléndula tiene efecto antiinflamatorio, antioxidante y antitumoral (Jiménez-Medina *et al.*, 2006; Preethi *et al.*, 2009), y el extracto de hojas y de flor de lavanda inglesa se comprobó su efecto antiinflamatorio, antioxidante y su capacidad de mejorar del rendimiento espacial en el Alzheimer (Hajhashemi *et al.*, 2003; Kashani *et al.*, 2011; Spiridon *et al.*, 2011). En este estudio, se demostró que estos extractos tienen efecto en la longevidad porque incrementan significativamente la CLS de la levadura. Para estas seis especies se probó que hay una conexión entre su efecto para combatir una o varias enfermedades que se desarrollan en la vejez y su efecto en el retraso del envejecimiento. Esto aterriza la idea propuesta recientemente por Argyropoulou *et al.* (2013), que el efecto del extracto para combatir una enfermedad es sólo la consecuencia y que su efecto directo es retrasando el envejecimiento e incrementando la salud.

Esta idea, también, ha llevado a la propuesta del estudio TAME (Targeting Aging with Metformin = Dirigido contra el envejecimiento con metformina), donde se plantea que demorar el envejecimiento con el uso de compuestos naturales es una manera efectiva de postergar el desarrollo de las enfermedades relacionadas con la edad. En este año, 2016, se probará en humanos el efecto de la metformina, compuesto originario de la planta *Galega officinalis*, para evaluar sus efectos sobre el envejecimiento; siendo un punto de partida para probar más compuestos naturales anti-envejecimiento en el humano (TAME Study, 2015). Este gran avance nos reitera la importancia de haber identificado seis nuevos extractos de plantas con efecto sobre la longevidad, motivándonos a realizar más ensayos para obtener más información sobre ellos. Esto con el fin de comprobar si son una promesa futura para retrasar el envejecimiento en el humano, trayendo más salud a sus años y previniendo o retrasando al mismo tiempo muchas enfermedades relacionadas con la vejez.

Una séptima especie mostró un efecto interesante en mi estudio, guacima (*Guazuma ulmifolia*). Dos extractos de esta especie fueron probados, la decocción de hojas y la decocción de corteza; ambos mostraron un efecto adverso en la supervivencia de la levadura. La disminución de la supervivencia de la levadura es consistente en los dos tratamientos con guacima, a pesar de que los extractos provenían de dos partes diferentes de la planta, lo que nos lleva a creer que tiene compuestos tóxicos para el organismo. Se ha descrito que el uso de dosis elevadas ingeridas por humanos produce náuseas, vómitos y diarreas, atribuyéndolo a la posible presencia de sustancias activas (Patiño, 1963). El efecto tóxico de los extractos de la guacima, principalmente el observado en la levadura, nos lleva a pensar que puede presentarse con otros organismos, como los fúngicos. Es por esto que proponemos al extracto de *G. ulmifolia* para futuros estudios, confrontándolo con organismos fúngicos patógenos para probar su efecto fungicida.

Por otro lado, cabe mencionar que la decisión de usar cepas de referencia diferentes para identificar el efecto de los extractos acuosos y los extractos alcohólicos surgió a partir de los problemas con el decaimiento de la cepa diploide S288c; ya que el porcentaje de supervivencia muestra un fenómeno estacionario. Una alternativa para explicarlo es la evaporación del cultivo; ésta se da a través del experimento causando un efecto aparente de tener más células vivas conforme pasa el tiempo, que es visible en las gráficas de decaimiento por mantener o aumentar la supervivencia de las poblaciones a través del tiempo. En mi ensayo, la evaporación del medio pudo propiciarse debido a uno o la combinación de varios de estos factores: poco volumen del cultivo, la alta temperatura (30 °C) o las variaciones de humedad del ambiente. Sin embargo, en nuestro laboratorio seguimos realizando experimentos para descartar esta posibilidad. Otra explicación de este fenómeno es el crecimiento adaptativo, éste ocurre cuando un grupo de células deja su estado quiescente y reingresa al ciclo celular, aparentando un incremento en la supervivencia (Longo *et al.*, 2012). Esto puede ser posible ya que aproximadamente 50% de los cultivos silvestres de levadura que se usan en estudios de envejecimiento cronológico presentan este fenotipo. A pesar de los estudios extensivos para aclarar el crecimiento adaptativo, las características principales que se han descrito es que depende de mutaciones en el ADN que se acumulan durante el envejecimiento, y

que sus requerimientos nutrimentales son tomados de las células muertas del cultivo (Fabrizio & Longo, 2008).

### *7.3 El efecto de los extractos candidatos sobre la CLS difiere de acuerdo a la cepa de referencia donde se prueba*

Los seis extractos que se propusieron como candidatos para promover la longevidad se probaron en tres cepas de referencia provenientes de nuestro laboratorio: la cepa diploide S288c, la cepa haploide S288c y la cepa haploide YEG01; observándose una variación del efecto del extracto sobre la CLS de las distintas cepas de referencia.

Los extractos que mostraron primeramente aumentar la CLS de la cepa diploide S288c, también fueron capaces de aumentar la CLS de la cepa haploide YEG01, aunque no la de la cepa haploide S288c; tales extractos fueron obtenidos de *B. pilosa*, *C. officinalis*, *E. japonica* y *L. angustifolia*. Por otra parte, los extractos de *A. mexicana* y *S. dendroideum* mostraron primeramente aumentar la CLS de la cepa haploide S288c, y su efecto también se observó en la cepa diploide S288c, pero no en la cepa haploide YEG01. Es interesante ver que el efecto de los seis extractos se mantuvo para la cepa diploide, pero su efecto varió en las cepas haploides. Creemos que esta variación de su efecto es debido a las variaciones genéticas que hay entre las cepas haploides, ya que se ha observado que en otros compuestos promotores de la longevidad hay una variación de su efecto, dependiendo del sistema. La metformina, por ejemplo, tiene un efecto en la duración de la vida con rango de variación dependiendo de la edad, el género y las condiciones de salud de los roedores (Berstein, 2012). Incluso se ha observado en otras intervenciones, como la restricción calórica, que tiene un efecto variable aún entre cepas de una misma especie (Narasimhan *et al.*, 2009). Es por ello que existe un interés creciente por la farmacogenética, ya que incluso en el humano, la variación genética de los blancos farmacológicos produce una respuesta distinta a pesar de que los pacientes se tratan con un mismo medicamento (Genetic Alliance, 2009). Por lo tanto, proponemos identificar el efecto de nuestros seis extractos en diversas cepas, provenientes de aislados naturales, para corroborar si se presentan variaciones en el efecto sobre la CLS.

Una razón adicional para explicar las diferencias del efecto de los extractos en las cepas haploides puede darse por los marcadores que éstas tienen. Para la selección de cepas, éstas tienen mutaciones como marcadores de auxotrofia; por ejemplo, nuestra cepa de referencia haploide S288c tiene una mutación por sustitución en el gen *URA3*. Se sabe que en algunas mutaciones de auxotrofia influyen diversos parámetros fisiológicos, a pesar de compensar el medio con el o los nutrientes faltantes. Se ha visto que las auxotrofías tienen efectos importantes en la CLS de la levadura, por lo que es posible que éstas también estén influyendo en el efecto de los extractos, propiciando su variación dependiendo del extracto y las auxotrofías de la cepa haploide (Mülleder *et al.*, 2012).

#### *7.4 El extracto de Eriobotrya japonica interactúa con dos genes que están relacionados al envejecimiento en Saccharomyces cerevisiae*

En mi estudio se probó el extracto de níspero en 15 mutantes de genes involucrados con el envejecimiento. Para determinar si existía una relación entre el gen y el efecto del extracto de níspero en la CLS de la levadura se usaron los parámetros básicos de la epistasis. En el caso de las cepas con mutaciones que aumentan la CLS probadas con el extracto de níspero se tienen dos posibles panoramas: no incrementa la CLS al compararse con la de la mutación por sí sola, y hay incremento en la CLS si se compara con la de la mutación por sí sola. En el primero se considera que el efecto del extracto depende de este gen o que el extracto está interactuando con este gen faltante para incrementar la longevidad de la levadura. En el segundo se considera que el extracto de níspero es independiente o no interactúa con este gen para aumentar la CLS de la levadura. Por otro lado, para las mutaciones que disminuyen la CLS, si al combinar la mutación con el extracto el incremento en la CLS es el mismo que el observado en la cepa silvestre cuando se le agrega el extracto, se identifica que el extracto es independiente o que no interactúa con este gen para aumentar la CLS de la levadura.

Las vías involucradas en aumentar la duración de la vida cronológica de la levadura son principalmente Tor/Sch9, Sch9 y Ras/AC/PKA, las cuales controlan el

censado de nutrientes. Estas vías convergen en Rim15, que es el encargado de activar factores de transcripción de respuesta a estrés tales como Gis1 y Msn2/4. Estos últimos inducen SOD, HSP's (heat shock proteins = proteínas de choque de calor), autofagia y otros procesos que aumentan la longevidad (Figura 21; Longo *et al.*, 2012). En mi estudio trabajé con seis mutantes de los genes involucrados en estas vías e identifiqué que el extracto de níspero depende de Ras2 para incrementar la CLS en la levadura; y, por otro lado, mis resultados revelan que es independiente de Rim15, Msn2 y Msn4 que se encuentran río abajo. Como se sabe que Msn2 y Msn4 actúan paralelamente, confirmamos con la doble mutante  $\Delta msn2 \Delta msn4$  que el efecto del extracto de níspero es independiente de dicha vía. Desafortunadamente no fue posible interpretar los resultados para Tor1 y Gis1 por problemas técnicos, esto nos hubiese permitido ampliar el panorama de cómo el extracto de níspero está involucrado en estas vías principales. Es por ello que se propone probar nuevamente el extracto en estas cepas e incluso probarlo en cepas mutantes de los genes faltantes que completan las vías.

Swr1 forma parte del complejo Swr1, el cual se encarga de reclutar la histona Htz1 (H2A.Z, homólogo en mamíferos) y promover la expresión de la heterocromatina silenciada (Krogan *et al.*, 2003). Se conoce que durante el proceso de envejecimiento hay un cambio dinámico en la estructura de la cromatina, de tal manera, que al suprimir genes para proteínas remodeladoras de la cromatina da como resultado la extensión de la duración de la vida en la levadura (Das & Tyler, 2013). Anteriormente, en nuestro laboratorio, se identificó que el complejo Swr1 es un factor en el envejecimiento cronológico de la levadura; siendo su papel específico como regulador de la CLS en la restricción calórica (Garay *et al.*, 2014). En mi estudio, el extracto de níspero mostró el mismo efecto en la longevidad que la mutante para Swr1, sugiriendo que el efecto del níspero depende de Swr1. El efecto del extracto de níspero dependiente de Swr1 y de Ras2 nos podría sugerir que éste actúa como un mimetizador de la restricción calórica. Sin embargo, aún queda probar con las otras proteínas del complejo Swr1, Arp6 y Swc3, para identificar si el efecto del extracto de níspero también depende de ellas, así como probarlo directamente en condiciones de restricción calórica, para aseverar que dicho extracto es un mimetizador. También desconocemos si el extracto de níspero está activando una vía alterna donde interactúen directamente Ras2 con Swr1, esto por su



independencia con Rim15 y Msn2/4, por lo que son necesarias más pruebas con el extracto.

Ald6 (acetaldehído deshidrogenasa) cataliza la conversión de acetaldehído a acetato, la enzima es importante en el crecimiento en etanol, e importante en la producción de acetyl-CoA. Se demostró que Ald6 se degrada preferentemente por autofagia y que al existir falta de nitrógeno, la reducción de Ald6, mejora la tasa de viabilidad en *S. cerevisiae* (Onodera & Ohsumi, 2004). En nuestro laboratorio, se confirmó que la falta de Ald6 permitía incrementar la CLS de la levadura (Garay *et al.*, 2014). En mi ensayo, identificamos que el efecto del extracto de níspero es independiente de Ald6, sin embargo, al combinar la supresión del gen con el extracto de níspero se muestra un efecto sinérgico, lo cual sugiere que el extracto de níspero potencia el efecto de aumentar la CLS al no estar la proteína Ald6, pero que no depende directamente de ésta. Este efecto sinérgico también sugiere que la vía donde actúa el extracto de níspero y la vía que actúa cuando falta de la proteína Ald6 en algún punto se compensan.

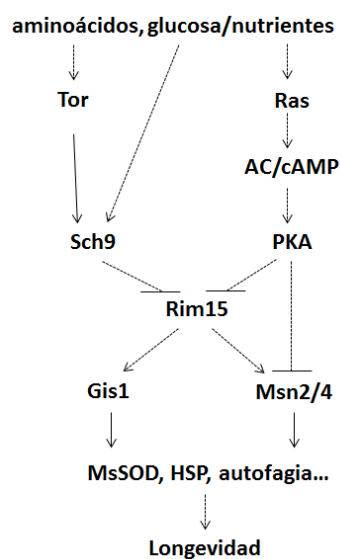


Figura 21. Vías regulatorias involucradas en incrementar la duración de la vida cronológica en la levadura (Longo *et al.*, 2012).

Rps14A es una proteína ribosomal de la subunidad pequeña (40S) de levadura, involucrada en la maduración de la subunidad y su ensamblaje, que presenta un homólogo en mamíferos (S14) y en bacterias (S11). En el ensayo masivo realizado anteriormente en nuestro laboratorio se identificó que al suprimir *RPS14A*, la CLS de la levadura incrementa sutilmente (Garay *et al.*, 2014). Este efecto se corroboró en el presente ensayo, donde el incremento en la CLS de la levadura fue observable pero no estadísticamente significativo. Por otro parte, al combinar la mutación con el extracto de níspero se observó que el efecto del incremento en la CLS se suma, lo cual nos sugiere que el mecanismo de acción del extracto de níspero es independiente de la proteína ribosomal Rps14A.

Ste12 es un factor de transcripción, activado por MAPK (mitogen-activated protein kinases = proteína cinasa activada por mitógenos), que activa genes involucrados en el apareamiento. Mutaciones en genes *STE* se probaron en nuestro laboratorio para identificar el efecto en la CLS de la levadura, mostrando siempre una disminución de la misma (Campos *et al.*, en preparación). En mi ensayo, la mutación en *STE12* también disminuyó la CLS de *S. cerevisiae*; y fue interesante que al probar el extracto de níspero en la cepa mutante se presentó un efecto compensatorio, siendo recuperada la supervivencia hasta la mostrada en la cepa silvestre. Esto nos hace proponer que el extracto de níspero compensa la falta del gen, ya sea porque hace la función del gen, o porque activa otro compuesto para sustituir al gen faltante. Por su parte, el efecto que se mostró cuando se combinaba la mutación en *HAP3* con el extracto de níspero fue aún más sorprendente que el antes mencionado. La mutación por sí sola, en mi ensayo, mostraba una disminución hasta del 10% de la supervivencia de la levadura [la disminución en la CLS de la levadura por esta mutación ya había sido identificada anteriormente por otros grupos (Garay *et al.*, 2014; Laschober *et al.*, 2010)], pero al incubar con el extracto de níspero, el efecto en la supervivencia no sólo se vio compensado, sino que la supervivencia se vio incrementada, incluso superando la mostrada por la cepa silvestre incubada con el extracto. Hap3 es una subunidad del complejo Hap2p/3p/4p/5p, un activador transcripcional y regulador global de la expresión de genes de la respiración. Por ello suponemos que el efecto que observamos para este caso tan particular se deba a que el efecto del níspero es activar otro factor

transcripcional que esté supliendo a Hap3 en el complejo, o incluso activar otro complejo transcripcional que devuelve y mejora la supervivencia de la levadura. Sin embargo, aún quedan por hacer más ensayos para poder dilucidar el mecanismo de acción del extracto de níspero.

Para finalizar es importante mencionar que la implementación de un ensayo automatizado eficiente para identificar compuestos y extractos que sean capaces de incrementar significativamente la CLS de *S. cerevisiae* nos permitirá seguir realizando estudios a gran escala para descubrir nuevos compuestos naturales con efecto inhibitor del envejecimiento. Aún nos resta seguir probando los seis extractos de plantas, identificados en este estudio, que incrementan significativamente la CLS de la levadura, tanto en diversos aislados naturales de la misma, como en otros organismos modelo; además de identificar los compuestos individuales de cada extracto, que son los responsables del efecto. También identificamos que dos genes interactúan directamente con el extracto de *E. japonica*, sin embargo, para ampliar la información sobre el mecanismo de acción de este extracto se sugiere probar más genes que ya han sido relacionados al envejecimiento.

## 8.0 Conclusiones

Comprobamos que el ensayo automatizado de Densidad Óptica es capaz de identificar compuestos y/o extractos crudos que extienden la duración de la vida cronológica de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

En nuestro ensayo prueba, corroboramos que la espermidina y la rapamicina son compuestos promotores de la longevidad que extienden la CLS de *Saccharomyces cerevisiae*, y por primera vez comprobamos que la metformina en concentraciones mayores a 5 mM es capaz de incrementar la CLS de la levadura.

En el rastreo a gran escala de las 30 especies de plantas medicinales se identificó que extractos de seis de ellas: *Acrocomia mexicana*, *Bidens pilosa*, *Calendula officinalis*, *Eriobotrya japonica* (dos muestras biológicas), *Lavandula angustifolia* y *Sedum dendroideum*, son capaces de extender significativamente la CLS de la levadura.

El efecto de los extractos en la extensión de la CLS de la levadura difiere de acuerdo a la cepa de referencia donde se prueben, mostrando que seis extractos son capaces de extender la CLS de la cepa diploide S288c, pero su efecto difiere cuando se prueba en las cepas de referencia haploides S288c y YEG01; posiblemente esto último se deba a las auxotrofías presentes en las cepas haploides.

Finalmente, se identificó que el efecto del extracto de *Eriobotrya japonica* para incrementar la CLS de la levadura depende de Ras2 y Swr1; que el extracto potencia el efecto de la ausencia de Ald6, pero sin interactuar directamente con ella; que compensa la falta del gen *STE12*; y que además de compensar, mejora la CLS de la levadura cuando está carente el gen *HAP3*.

## 9.0 Perspectivas

Las conclusiones propuestas en base al trabajo desarrollado nos permiten plantearnos nuevas perspectivas para este proyecto, permitiendo enriquecer el estudio de las plantas medicinales con efecto sobre la longevidad.

Primeramente para los seis extractos de plantas que ya han sido identificados como promotores de la longevidad en la cepa diploide S288c, aún resta probarlos en diversos aislados naturales de *S. cerevisiae* para identificar su efecto sobre la CLS de éstos y dilucidar si hay variación en el efecto de los extractos debido a sus variaciones genéticas, como la observada en las cepas haploides YEG01 y S288c.

Además, identificar los mecanismos a través de los cuales los cinco extractos candidatos que restan retrasan el envejecimiento biológico. Así como proponer una red de interacciones de los genes que ya han sido identificados que interactúan con el extracto de *Eriobotrya japonica*.

Aún queda identificar los compuestos individuales responsables de los efectos que retrasan el envejecimiento cronológico de la levadura en los seis extractos medicinales propuestos. Es concebible que sólo algunas combinaciones de ciertos compuestos de los extractos, y no sólo compuestos individuales, puedan ser los responsables de su eficacia, o incluso que tengan una eficacia mayor.

También resta probar las 70 especies de plantas medicinales que están propuestas en la base de datos, con la finalidad de identificar su efecto en la extensión de la CLS de *S. cerevisiae*.

A mediano plazo, sería importante probar los extractos candidatos en otros organismos eucarióticos modelo: *C. elegans*, *D. melanogaster*, *Mus musculus*, para identificar su efecto en el envejecimiento, esperando que el efecto de estos extractos pueda generalizarse en otras especies eucarióticas, incluyendo la especie humana.

Finalmente, una dirección alternativa de esta investigación es probar el extracto de *Guazuma ulmifolia* en organismos fúngicos patógenos para evaluar su efecto fungicida, esto con la finalidad de tener nuevas alternativas para combatir plagas.

## Referencias

- Adaszynska, M., Swarcewicz, M., Dzieciol, M., Dobrowolska, A. 2013. Comparison of chemical composition and antibacterial activity of lavender varieties from Poland. *Natural Product Research* 27:1497-1501.
- Alarcon-Aguilar, F.J., Roman-Ramos, R., Flores-Saenz, J.L., Aguirre-Garcia, F. 2002. Investigation of the hypoglycaemic effects of extracts of four mexican medicinal plants in normal and alloxan-diabetic mice. *Phytotherapy Research* 16:383-386.
- Alvers, A.L., Wood, M.S., Hu, D., Kaywell, A.C., Dunn, W.A.Jr., Aris, J.P. 2009. Autophagy is required for extension of yeast chronological life span by rapamycin. *Autophagy* 5:847-849.
- Andrade-Cetto, A., Heinrich, M. 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology* 99:325-348.
- Anisimov, V.N., Berstein, L.M., Egormin, P.A., Piskunova, T.S., Popovich, I.G., Zabezhinski, M.A., Tyndyk, M.L., Yurova, M.V., Kovalenko, I.G., Poroshina, T.E., Semenchenko, A.V. 2008. Metformin slows down aging and extends life span of female SHR mice. *Cell Cycle* 7:2769-2773.
- Argyropoulou, A., Aligiannis, N., Trougakos, I.P., Skaltsounis, A.L. 2013. Natural compounds with anti-ageing activity. *Natural Product Reports* 30:1412-1437.
- Baur, J.A., Pearson, K.J., Price, N.L., Jamieson, H.A., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, V.V., Allard, J.S., Lopez-Lluch, G., Lewis, K., Pistell, P.J., Poesala, S., Becker, K.G., Boss, O., Gwinn, D., Wang, M., Ramaswamy, S., Fishbein, K.W., Spencer, R.G., Lakatta, E.G., Le Couteur, D., Shaw, R.J., Navas, P., Puigserver, P., Ingram, D.K., de Cabo, R., Sinclair, D.A. 2006. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 444:337-342.
- Berstein, L.M. 2012. Metformin in obesity, cancer, and aging: addressing controversies. *Aging* 4:320-329.
- Bioshop, N.A., Guarente, L. 2007. Genetic links between diet and lifespan: shared mechanisms from yeast to humans. *Nature Reviews. Genetics* 8:835-844.
- Campos, S.E., Garay, E., Juárez-Reyes, A., DeLuna, A. Novel mechanism of lifespan extension revealed by genome-wide screening of dietary-restriction factors in yeast. In preparation.
- Capri, M., Salvioli, S., Sevini, F., Valensin, S., Celani, L., Monti, D., Pawelec, G., De Benedictis, G., Gonos, E.S., Franceschi, C. 2006. The genetics of human longevity. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1067:252-263.

- Cha, D.S., Eun, J.S., Jeon, H. 2011. Anti-inflammatory and antinociceptive properties of the leaves of *Eriobotrya japonica*. *Journal of Ethnopharmacology* 134:305-312.
- Chen, J., Li, W.L., Wu, J.L., Ren, B.R., Zhang, H.Q. 2008. Hypoglycemic effects of a sesquiterpene glycoside isolated from leaves of loquat (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.). *Phytomedicine* 15: 98-102.
- Choi, K.M., Lee, H.L., Kwon, Y.Y., Kang, M.S., Lee, S.K., Lee, C.K. 2013. Enhancement of mitochondrial function correlates with the extension of lifespan by caloric restriction and caloric restriction mimetics in yeast. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 441:236-242.
- Da Silva, D., Casanova, L.M., Marcondes, M.C., Espindola-Netto, J.M., Paixão, L.P., De Melo, G.O., Zancan, P., Sola-Penna, M., Costa, S.S. 2014. Antidiabetic activity of *Sedum dendroideum*: metabolic enzymes as putative targets for the bioactive flavonoid kaempferitin. *IUBMB life* 66:361-370.
- Das, C., Tyler, J.K. 2013. Histone exchange and histone modifications during transcription and aging. *Biochimica et Biophysica Acta* 1819:332-342.
- De Luna, A., Vetsigian, K., Shores, N., Hegreness, M., Colón-González, M., Chao, S., Kishony, R. 2008. Exposing the fitness contribution of duplicated genes. *Nature Genetics* 40:676-681.
- De Melo G.O., Malvar Ddo, C., Vanderlinde, F.A., Rocha, F.F., Pires, P.A., Costa, E.A., de Matos, L.G., Kaiser, C.R., Costa, S.S. 2009. Antinociceptive and anti-inflammatory kaempferol glycosides from *Sedum dendroideum*. *Journal of Ethnopharmacology* 124:228-232.
- Dieamant, G., Pereda, M.C.V., Nogueira, C., Eberlin, S., Facchini, G., Checon, J.T., Cesar, C.K., Mussi, L., Polezel, M.A., Martins-Oliveira, D.Jr., Di Stasi, L.C. 2015. Antiageing mechanisms of a standardized supercritical CO<sub>2</sub> preparation of black jack (*Bidens pilosa* L.) in human fibroblasts and skin fragments. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* doi:10.1155/2015/280529.
- Eisenberg, T., Knauer, H., Schauer, A., Büttner, S., Ruckenstuhl, C., Carmona-Gutierrez, D., Ring, J., Schroeder, S., Magnes, C., Antonacci, L., Fussi, H., Deszcz, L., Hartl, R., Schraml, E., Criollo, A., Megalou, E., Weiskopf, D., Laun, P., Heeren, G., Breitenbach, M., Grubeck-Loebenstern, B., Herker, E., Fahrenkrog, B., Fröhlich, K., Sinner, F., Tavernarakis, N., Minois, N., Kroemeer, G., Madeo, F. 2009. Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nature Cell Biology* 11:1305-1314.

- Esmaeili, A.H., Hajizadeh Moghaddam, A., Chachi, M.J. 2014. Identification, determination, and study of antioxidative activities of hesperetin and gallic acid in hydro-alcoholic extract from flowers of *Eriobotrya japonica* (Lindl.). *Avicenna Journal of Phytomedicine* 4:260-266.
- Fabrizio, P., Longo, V.D. 2003. The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell* 2:73-81.
- Fabrizio, P., Longo, V.D. 2008. Chronological aging-induced apoptosis in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta* 1783:1280-1285.
- Fotso, A.F., Longo, F., Djomeni, P.D., Louam, S.F., Spiteller, M., Dongmo, A.B., Savineau, J.P. 2014. Analgesic and antiinflammatory activities of the ethyl acetate fraction of *Bidens pilosa* (Asteraceae). *Inflammopharmacology* 22:105-114.
- Garay, E., Campos, S.E., González de la Cruz, J., Gaspar, A.P., Jinich, A., DeLuna, A. 2014. High-Resolution profiling of stationary-phase survival reveals yeast longevity factors and their genetic interactions. *PLoS Genetics* 10:1-17.
- Genetic Alliance. 2009. The New York-Mid-Atlantic Consortium for Genetic and Newborn Screening Services. Cómo entender la genética. Anexo M: Farmacogenómica y farmacogenética.
- Greer, E.L., Dowlatshahi, D., Banko, M.R., Villen, J., Hoang, K., Blanchard, D., Gygi, S.P., Brunet, A. 2007. An AMPK-FOXO pathway mediates longevity induced by a novel method of dietary restriction in *C. elegans*. *Current Biology* 17:1646-1656.
- Hajhashemi, V., Ghannadi, A., Sharif, B. 2003. Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. *Journal of Ethnopharmacology* 89:67-71.
- Howitz, K.T., Bitterman, K.J., Cohen, H.Y., Lamming, D.W., Lavu, S., Wood, J.G., Zipkin, R.E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L., Scherer, B., Sinclair, D.A. 2003. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425:191-196.
- Huges, T.R. 2002. Yeast and drug discovery. *Functional & Integrative Genomics* 2:199-211.
- Jiménez-Medina, E., García-Lora, A., Paco, L., Algarra, I., Collado, A., Garrido, F. 2006. A new extract of the plant *Calendula officinalis* produces a dual in vitro effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. *BMC Cancer* 6:119.
- Kachroo, A.H., Laurent, J.M., Yellman, C.M., Meyer, A.G., Wilke, C.O., Marcotte, E.M. 2015. Evolution. Systematic humanization of yeast genes reveals conserved functions and genetic modularity. *Science* 348:921-925.



- Kaeberlein, M. 2010. Lessons on longevity from budding yeast. *Nature* 464:513-519.
- Kaeberlein, M., Powers, R.W. 3<sup>rd</sup>, Steffen, K.K., Westman, E.A., Hu, D., Dang, N., Kerr, E.O., Kirkland, K.T., Fields, S., Kennedy, B.K. 2005. Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients. *Science* 310:1193-1196.
- Kalra, S., Jacob, J.J., Gupta, Y. 2016. Newer antidiabetic drugs and calorie restriction mimicry. *Indian Journal of Endocrinology Metab* 20:142-146.
- Kashani, M.S., Tavirani, M.R., Talaei, S.A., Salami, M. 2011. Aqueous extract of lavender (*Lavandula angustifolia*) improves the spatial performance of a rat model of Alzheimer's disease. *Neuroscience Bulletin* 27:99-106.
- Kenyon, C. 2010. The genetics of ageing. *Nature* 464:504-512.
- Komishon, A.M., Shishtar, E., Ha, V., Sievenpiper, J.L., de Sousa, R.J., Javanovski, E., Ho, H.V., Duvnjak, L.S., Vuksan, V. 2015. The effect of ginseng (genus *Panax*) on blood pressure: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Journal of Human Hypertension* doi:10.1038/jhh.2016.18.
- Krogan, N.J., Keogh, M.C., Datta, N., Sawa, C., Ryan, O.W., Ding, H., Haw, R.A., Pootoolal, J., Tong, A., Canadien, V., Richards, D.P., Wu, X., Emili, A., Hughes, T.R., Buratowski, S., Greenblatt, J.F. 2003. A Snf2 family ATPase complex required for recruitment of the histone H2A variant Htz1. *Molecular Cell* 12:1565-1576.
- Kwiecinski, M.R., Bettega Felipe, K., Schoenfelder, T., de Lemos Wiese, L.P., Rossi, M.H., Gonzalez, E., D'arc Felicio, J., Wilhelm Filho, D., Curi Pedrosa, R., 2008. Study of the antitumor potential of *Bidens pilosa* (Asteraceae) used in Brazilian folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 117:69-75.
- Lakusic, B., Lakusic, D., Ristic, M., Marcetic, M., Slavkowska, V. 2014. Seasonal variations in the composition of the essential oils of *Lavandula angustifolia* (Lamiaceae). *Natural Product Communications* 9:859-862.
- Laplante, M., Sabatini, D.M. 2012. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149:274-293.
- Laschober, G.T., Ruli, D., Hofer, E., Muck, C., Carmona-Gutierrez, D., Ring, J., Hutter, E., Ruckenstuhl, C., Micutkova, L., Brunauer, R., Jamnig, A., Trimmel, D., Herndl-Brandstetter, D., Brunner, S., Zenzmaier, C., Sampson, N., Breitenbach, M., Fröhlich, K.U., Grubeck-Loebenstien, B., Berger, P., Wieser, M., Grillari-Vaglaue, R., Thallinger, G.G., Grillari, J., Trajanoski, Z., Madeo, F., Lepperdinger, G., Jansen-Dürr, P. 2010. Identification of evolutionarily conserved genetic regulators of cellular aging. *Aging Cell* 9:1084-1097.

- Liu, J.R., Ye, Y.L., Lin, T.Y., Wang, Y.W., Peng, C.C. 2013. Effect of floral sources on the antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of honeys in Taiwan. *Food Chemistry* 15;139:938-943.
- Loescher, C.M., Morton, D.W., Razic, S., Agatonovic-Kustrin, S. 2014. High performance thin layer chromatography (HPTLC) and high performance liquid chromatography (HPLC) for the qualitative and quantitative analysis of *Calendula officinalis*-advantages and limitations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 98:52-59.
- Longo, V.D., Shadel, G.S., Kaeberlein, M., Kennedy, B. 2012. Replicative and chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Metabolism* 16:18-31.
- Lutchman, V., Medkour, Y., Samson, E., Arlia-Ciommo, A., Dakik, P., Cortes, B., Feldman, R., Mohtashami, S., McAuley, M., Chanchaoren, M., Rukundo, B., Simard, E., Titorenko, V. 2016. Discovery of plants extracts that greatly delay yeast chronological aging and have different effects on longevity-defining cellular processes. *Oncotarget* 7:16542-16566.
- Masoro, E.J. 2009. Caloric restriction-induced life extension of rats and mice; a critique of proposed mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta* 1790:1040-1048.
- Muley, B.P., Khadabadi, S.S., Banarase, N.B. 2009. Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Calendula officinalis* Linn (Asteraceae): A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 8:455-465.
- Mülleder, M., Capuano, F., Pir, P., Christen, S., Sauer, U., Oliver, S.G., Ralser, M. 2012. A prototrophic deletion mutant collection for yeast metabolomics and systems biology. *Nature Biotechnology* 30:1176-1178.
- Muromato, K., Quan, R.D., Namba, T., Kyotani, S., Miyamura, M., Nishioka, Y., Tonasaki, K., Doi, Y.L., Kaba, H. 2011. Ameliorative effects of *Eriobotrya japonica* seed extract on cellular aging in cultured rat fibroblasts. *Journal of Natural Medicines* 65:254-261.
- Narasimhan, S.D., Yen, K., Tissenbaum, H.A. 2009. Converging pathways in lifespan regulation. *Current Biology* 19:R657-666.
- Olechnikov, D.N., Kashchenko, N.I. 2014. Componential profile and amylase inhibiting activity of phenolic compounds from *Calendula officinalis* L. leaves. *The Scientific World Journal* doi: 10.1155/2014/654193.
- Onken, B., Driscoll, M. 2010. Metformin induces a dietary restriction-like state and the oxidative stress response to extend *C. elegans* healthspan via AMPK, LKB1, and SKN-1. *PLoS One* 5:e8758.

- Onodera, J., Ohsumi, Y. 2004. Ald6p is a preferred target for autophagy in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 279:16071-16076.
- Patiño, V.M. 1963. Editorial: Cali, Imprenta Departamental. 1ª Edición. Plantas cultivadas y animales domésticos en América equinoccial. Tomo III: Fibras, medicinas, misceláneas. Capítulo XVII: Medicinales, estimulantes, venenosas, insecticidas.
- Pearson, K.J., Baur, J.A., Lewis, K.N., Peshkin, L., Price, N.L., Labinskyy, N., Swindell, W.R., Kamara, D., Minor, R.K., Perez, E., Jamieson, H.A., Zhang, Y., Dunn, S.R., Sharma, K., Pleshko, N., Woollett, L.A., Csiszar, A., Ikeno, Y., Le Couteur, D., Elliott, P.J., Becker, K.G., Navas, P., Ingram, D.K., Wolf, N.S., Ungvari, Z., Sinclair, D.A., de Cabo, R. 2008. Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. *Cell Metabolism* 8:157-168.
- Pérez, S., Pérez, R.M., Pérez, C., Zavala, M.A., Vargas, R. 1997. Coyolosa, a new hypoglycemic from *Acrocomia mexicana*. *Pharmaceutica acta Helvetiae* 72:105-111.
- Preethi, K.C., Kuttan, G., Kuttan, R. 2009. Anti-inflammatory activity of flower extract of *Calendula officinalis* Linn. and its possible mechanism of action. *Indian Journal of Experimental Biology* 47:113-120.
- Rallis, C., Codlin, S., Bähler, J. 2013. TORC1 signaling inhibition by rapamycin and caffeine affect lifespan, global gene expression, and cell proliferation of fission yeast. *Aging Cell* 12:563-573.
- Rashed, K.N., Butnariu, M. 2014. Isolation and antimicrobial and antioxidant evaluation of bioactive compounds from *Eriobotrya japonica* stems. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* 4:75-81.
- Rogina, B., Helfand, S.L. 2004. Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 101:15998-16003.
- Selman, C., Lingard, S., Choudhury, A.I., Batterham, R.L., Claret, M., Clements, M., Ramadani, F., Okkenhaug, K., Shuster, E., Blanc, E., Piper, M.D., Al-Qassab, H., Speakman, J.R., Carmignac, D., Robinson, I.C.A., Thornton, J.M., Gems, D., Partridge, L., Withers, D.J. 2008. Evidence for lifespan extension and delayed age-related biomarkers in insulin receptor substrate 1 null mice. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 22:807-818.
- Silva, F.L., Fischer, D.C., Tavares, J.F., Silva, M.S., de Athayde-Filho, P.F., Barbosa-Filho, J.M. 2011. Compilation of secondary metabolites from *Bidens pilosa* L. *Molecules* 16:1070-1102.

- Sinclair, D., Mills, K., Guarente, L. 1998. Aging in *Saccharomyces cerevisiae*. Annual Review of Microbiology 52:533-560.
- Souza, B.A., Silva, L.C., Chicarino, E.D., Bessa, E.C. 2013. Preliminary phytochemical screening and molluscicidal activity of the aqueous extract of *Bidens pilosa* Linné (Asteraceae) in *Subulina octona* (Mollusca, Subulindade). Anais da Academia Brasileira de Ciências 85:1557-1566.
- Spiridon, I., Colceru, S., Anghel, N., Teaca, C.A., Bodirlau, R., Armatu, A. 2011. Antioxidant capacity and total phenolic contents of oregano (*Origanum vulgare*), lavender (*Lavandula angustifolia*) and lemon balm (*Melissa officinalis*) from Romania. Natural Product Research 25:1657-1661.
- TAME Study. 2015. American Federation for Aging Research.
- Wanke, V., Cameroni, E., Uotila, A., Piccolis, M., Urban, J., Loewith, R., De Virgilio, C. 2008. Caffeine extends yeast lifespan by targeting TORC1. Molecular Microbiology 69:277-285.
- Wu, Z., Song, L., Liu, S.Q., Huang, D. 2014. Tanshinones extend chronological lifespan in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Applied Microbiology and Biotechnology 98:8617-8628.
- Xu, H.X., Chen, J.W. 2011. Commercial quality, major bioactive compound content and antioxidant capacity of 12 cultivars of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) fruits. Journal of the Science and Food and Agriculture 91:1057-1063.
- Yu, Y. B., Dosanjh, L., Lao, L., Tan, M., Shim, B.S., Luo, Y. 2010. *Cinnamomum cassia* bark in two herbal formulas increases life span in *Caenorhabditis elegans* via insulin signaling and stress response pathways. PloS One 5:e9339.

**Anexo 1. Base de datos de compuestos promotores de la longevidad. (ND) Información no disponible.**

Nombre del compuesto	Procedencia del compuesto	Organismo modelo donde muestra efecto	Mecanismo de acción del compuesto	Observaciones	Referencias
Ácido valproico	Droga sintética	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Modula la señalización de la vía insulina/IFG-1	Extiende la duración de la vida máxima y media; retrasa los cambios degenerativos del movimiento relacionados al envejecimiento	Evason <i>et al.</i> , 2008
Dapsona	Sulfona sintética	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Inhibe la piruvato cinasa	Incrementa significativamente la duración de la vida media y máxima	Cho <i>et al.</i> , 2010
Espermidina	Poliamida natural	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Caenorhabditis elegans</i> <i>Drosophila melanogaster</i> <i>Mus musculus</i> PBMC	Inhibe HAT	Inhibe el estrés oxidativo y aumenta la autofagia	Eisenberg <i>et al.</i> , 2009
Rapamicina	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Schizosaccharomyces pombe</i> <i>Caenorhabditis elegans</i> <i>Mus musculus</i>	Inhibe TORC1	Incrementa la duración de la vida mediante la activación de la autofagia; inhibe la traducción de proteínas; incrementa la resistencia al estrés	Rallis <i>et al.</i> , 2013
Trolox	Hidrosoluble derivado de la proteína E	<i>Caenorhabditis elegans</i> <i>Brachionus manjavacas</i>	Reduce el daño oxidativo	Incrementa el promedio de la duración de la vida media y máxima	Benedetti <i>et al.</i> , 2008 Snell <i>et al.</i> , 2012
Ácido ferulsinaico	Género Ferula	<i>Caenorhabditis elegans</i>	ND	Alarga significativamente la duración de la vida media; mejora significativamente la resistencia al estrés calórico y oxidativo; atenúa la peroxidación lipídica y la formación de glicación	Sayed, 2011
Ácido nordihidroguairático	<i>Larrea tridentata</i> (Gobernadora)	<i>Drosophila melanogaster</i> Familia Culicidae <i>Mus musculus</i> Género Rattus	ND	En mosquito incrementa la duración de la vida media en adultos de ambos sexos; incrementa la duración de la salud en rata y mosca; en ratón incrementa la duración de la vida media en machos	Argyropoulou <i>et al.</i> , 2013 Strong <i>et al.</i> , 2008
Ácido tánico	Café, té, vino tinto, espinacas	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Se relaciona con la SAPK/ERK cinasa	Aumenta la resistencia al estrés termal; reduce el crecimiento; incrementa ligeramente la resistencia al estrés oxidativo	Saul <i>et al.</i> , 2010
Acteosida	<i>Incarvillea younghusbandii</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	ND	Prolonga la duración de la vida significativa	Pan <i>et al.</i> , 2008
Aldehído protocatéquico	<i>Sasa senanensis</i> (Bambú)	<i>Drosophila melanogaster</i>	Inhibe la histona demetilasa	Extiende significativamente la duración de la vida en hembras de mosca	Nakagawa-Yagi <i>et al.</i> , 2012
Aspalatina	<i>Aspalathus linearis</i> (Rooibos)	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Regula DAF-16/FOXO Incrementa significativamente la expresión de las enzimas antioxidantes (sod-3)	Disminuye el daño oxidativo agudo; mejora la tasa de supervivencia	Chen <i>et al.</i> , 2013

## Continuación del Anexo 1.

Nombre del compuesto	Procedencia del compuesto	Organismo modelo donde muestra efecto	Mecanismo de acción del compuesto	Observaciones	Referencias
Baicaleína	<i>Scutellaria baicalensis</i> (Huáng qín)	<i>Caenorhabditis elegans</i> Células de carcinoma humano de colon	Activa la vía de señalización Nrf2/SKN-1	Extiende la duración de la vida media y máxima	Havermann <i>et al.</i> , 2013
Buteína	<i>Toxicodendron vernicifluum</i> (Árbol de la laca)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Activa las sirtuinas	Incrementa la duración de la vida promedio e incrementa significativamente la duración de vida máxima	Howitz <i>et al.</i> , 2003
Cafeína	<i>Coffea arabica</i> (Café)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Schizosaccharomyces pombe</i> <i>Caenorhabditis elegans</i>	Inhíbe TORC1	Relacionado a procesos de la longevidad y la respuesta al estrés oxidativo	Rallis <i>et al.</i> , 2013
Catequina (EGCG)	<i>Camelia sinensis</i> (Té verde)	<i>Drosophila melanogaster</i> <i>Caenorhabditis elegans</i> <i>Mus musculus</i>	Inhíbe la expresión de NTF- $\alpha$ Induce la alta expresión de SOD y CAT Activa la vía de señalización DAF-16/FOXO	Atenúa el estrés oxidativo intracelular; disminuye la formación de la lipofuscina; efectos preventivos en enfermedades inflamatorias crónicas, cardiovasculares y cáncer	Kitani <i>et al.</i> , 2007
Celastrol	<i>Tripterygium wilfordii</i> (Trueno dios de la vid)	<i>Mus musculus</i> (transgénicos a SOD1 con ALS)	Reduce TNF- $\alpha$ e iNOS Induce HSP70 y HSF1	Mejora la pérdida del peso y el rendimiento motor; retrasa el inicio de ALS; efecto protector en médula	Kiaei <i>et al.</i> , 2005
Cianidina	Frutos morados	Fibroblastos humanos	Disminuye la expresión del factor nuclear- $\kappa\beta$ , la ciclooxigenasa-2 y la óxido nítrico sintasa inducible	Atenúa el estrés oxidativo; incrementa la viabilidad celular; inhibe la peroxidación lipídica	Choi <i>et al.</i> , 2010
Crocina	<i>Crocus sativus</i> (Azafrán)	<i>Mus musculus</i>	ND	Presenta una actividad anti-tumoral significativa en ratones con linfoma de Dalton incrementando la duración de la vida	Bakshi <i>et al.</i> , 2009
Curcumina (Tetrahidrocurcumina)	<i>Curcuma longa</i> (Cúrcuma)	<i>Drosophila melanogaster</i> <i>Caenorhabditis elegans</i> <i>Mus musculus</i> Cultivo celular NIH3T3	Regula la localización nuclear de FOXO Interactúa con Sir2	Regula la respuesta al estrés oxidativo y al envejecimiento; duración de la vida promedio significativamente mayor	Kitani <i>et al.</i> , 2007
DHR-5 + Salidroside	<i>Rhodiola rosea</i> (Raíz de oro)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Caenorhabditis elegans</i> <i>Drosophila melanogaster</i>	Induce la translocación del factor de transcripción DAF-16 al núcleo	Incrementa la duración de la vida, la resistencia a estrés por calor, a la exposición UV y al estrés oxidativo	Wiegant <i>et al.</i> , 2009
EGb761	<i>Ginkgo biloba</i> (Ginkgo)	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Suprime la expresión de la proteína de choque térmico hsp-16-2	Incrementa la resistencia al estrés térmico; atenúa los niveles intracelulares del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; incrementa la tasa de supervivencia	Strayer <i>et al.</i> , 2003
Fisetina	Plantas comestibles	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Caenorhabditis elegans</i>	Traslaca el factor de transcripción DAF-16 al núcleo	Protege contra el estrés oxidativo y termal; incrementa la duración de la vida máxima y promedio	Howitz <i>et al.</i> , 2003 Kampkötter <i>et al.</i> , 2007

## Continuación del Anexo 1.

Nombre del compuesto	Procedencia del compuesto	Organismo modelo donde muestra efecto	Mecanismo de acción del compuesto	Observaciones	Referencias
Glucarubinona	Familia Simaroubaceae (Simarubáceas)	<i>Caenorhabditis elegans</i>	ND	Induce el metabolismo mitocondrial; reduce el contenido de las grasas	Zarse <i>et al.</i> , 2011
Glucosa Pentagalóila (PGG)	<i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus urophylla</i> (Eucalipto)	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Relacionado con los genes DAF-16, AGE-1, EAT-2, SIR-2.1 e ISP-1	Incrementa la duración de vida media; incrementa la resistencia a estrés térmico	Chen <i>et al.</i> , 2014
HDTIC1/HDTIC2	<i>Astragalus membranaceus</i> var. <i>mongol</i> (Huáng qí/Bèi qí)	Fibroblastos humanos	ND	Retrasan la senescencia replicativa; mejoran la proliferación; inhiben la formación de productos finales de glicación; tienen actividad antioxidante	Wang <i>et al.</i> , 2003
Icariin (Icarisida II)	Género Epimedium	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Depende de INS/IGF-1 y DAF-2/FOXO	Incrementa la tolerancia al estrés oxidativo y térmico; alenta la disminución de la locomoción en la edad adulta tardía; retrasa el inicio de la parálisis mediada por proteotóxicos	Cai <i>et al.</i> , 2011
Kaempferol	<i>Hammamelis virginiana</i> (Avellano de bruja)	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Transloca el factor de transcripción DAF-16 al núcleo	Protección contra el estrés termal; suprime la acumulación de ROS intracelular y de lipofuscina	Kampkötter <i>et al.</i> , 2007
Luteína	Plantas verdes	<i>Drosophila melanogaster</i>	Induce la alta expresión de SOD y CAT	Prolonga la duración de la vida media; reducción significativa de los niveles de malondialdehído; incrementa la actividad enzimática de antioxidantes	Zhang <i>et al.</i> , 2014
Metformina	<i>Galega officinalis</i> (Galega)	<i>Caenorhabditis elegans</i> <i>Mus musculus</i>	Activa AMPK	A semeja una restricción calórica; incrementa la duración de la vida significativa y disminuye la tasa de mortalidad	Anisimov <i>et al.</i> , 2008
Miricetina	Uvas, bayas, frutas, vegetales, hierbas	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Causa la translocación nuclear de DAF-16	Prolonga la duración de la vida media en adultos; disminuye la acumulación de ROS y la formación de lipofuscina	Büchter <i>et al.</i> , 2013
Oleuropeína	<i>Olea europea</i> (Olivo)	Fibroblastos humanos	ND	Aumenta la actividad del proteosoma; disminuye los niveles intracelulares de ROS; reduce la cantidad de las proteínas oxidativas; mantiene la función del proteosoma durante la senescencia replicativa; retrasa la aparición de senescencia morfológica	Katsiki <i>et al.</i> , 2007
Proantocianidina	<i>Vaccinium angustifolium</i> (Arándano Lowbush)	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Retrasa el incremento de los niveles de mRNA de las proteínas de choque térmico (hsp)	Incrementa la duración de la vida media y máxima; mejora la termotolerancia	Wilson <i>et al.</i> , 2006
Quercetina	<i>Allium cepa</i> (Cebolla)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Caenorhabditis elegans</i>	Requiere del sensor de nutrientes daf-2	Incrementa la resistencia al estrés oxidativo y térmico	Belinha <i>et al.</i> , 2007 Kampkötter <i>et al.</i> , 2008

## Continuación del Anexo 1.

Nombre del compuesto	Procedencia del compuesto	Organismo modelo donde muestra efecto	Mecanismo de acción del compuesto	Observaciones	Referencias
Reserpina	<i>Rauwolfia serpentine</i> (Shégèn mù/Yìndù shémù)	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Asociado con vía de señalización a serotonina thp-1	Promueve la termotolerancia; gusanos de vida larga son activos (prolonga la motilidad)	Srivastava <i>et al.</i> , 2008
Resveratrol	<i>Vitis vinifera</i> (Uva)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Caenorhabditis elegans</i> <i>Drosophila melanogaster</i> <i>Mus musculus</i> <i>Nothobranchius furseri</i> Fibroblastos humanos	Inhibe TORC1 Reduce IGF-1 Incrementa la actividad catalítica de SIR2 Activa AMPK	Incrementa la duración de la vida al modular procesos relacionados con la longevidad (incrementa la sensibilidad a insulina, el número de mitocondrias, acelera el metabolismo de almacenamiento de grasas y activa autofagia)	Baur <i>et al.</i> , 2006
Sesamina	<i>Sesamum indicum</i> (Ajonjolí)	<i>Drosophila melanogaster</i>	Induce la sobreexpresión de SOD1, SOD2, CAT y Rpn11	Prolonga la duración de la vida media; alivia neurodegeneración	Zuo <i>et al.</i> , 2013
SHE-3 + Eleuterósida	<i>Eleutherococcus senticosus</i> (Eleuterococo)	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Induce la translocación del factor de transcripción DAF-16 al núcleo	Incrementa la duración de la vida, la resistencia al estrés por calor, a la exposición de UV y al estrés oxidativo	Wiegant <i>et al.</i> , 2009
Tanshinonas (Criptotanshiona)	<i>Salvia miltiorrhiza</i> (Salvia china)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Relacionado con la regulación de Tor1, Sch9, Gcn2 y Sod2	No muestra interrupción en el crecimiento celular; media resistencia a estrés por ROS	Wu <i>et al.</i> , 2014
Teflavonoides	<i>Theae nigraefolium</i> (Té negro)	<i>Drosophila melanogaster</i>	Induce la alta expresión de SOD y CAT	Extiende la duración de la vida media y máxima	Peng <i>et al.</i> , 2009
Tirosol	<i>Olea europea</i> (Olivo)	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Implicada a HSF-1 y las vías de la insulina (DAF-2 y DAF-16)	Induce una resistencia elevada al estrés oxidativo y térmico; retrasa la aparición de un biomarcador de la edad; no induce cambios en el desarrollo, tamaño o reproducción	Cañuelo <i>et al.</i> , 2012
Trisulfida de diallilo	<i>Allium sativum</i> (Ajo)	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Aumenta la función del factor de transcripción skn-1	Incrementa la duración de la vida media	Powolny <i>et al.</i> , 2011



## Referencias al Anexo 1

- Anisimov, V.N., Berstein, L.M., Egormin, P.A., Piskunova, T.S., Popovich, I.G., Zabezhinski, M.A., Tyndyk, M.L., Yurova, M.V., Kovalenko, I.G., Poposhina, T.E., Semchenko, A.V. 2008. Metformin slows down aging and extends life span of female SHR mice. *Cell Cycle* 7:17: 2769-2773.
- Argyropoulou, A., Aligiannis, N., Trougakos, I.P., Skaltsounis, A.L. 2013. Natural compounds with anti-ageing activity. *Natural Product Reports* 30:1412-1437.
- Bakshi, H.A., Sam, S., Feroz, A., Ravesh, Z., Shah, G.A., Sharma, M. 2009. Crocin from Kashmiri saffron (*Crocus sativus*) induces *in vitro* and *in vivo* xenograft growth inhibition of Dalton's lymphoma (DLA) in mice. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 10:887-890.
- Baur, J.A., Pearson, K.J., Price, N.L., Jamieson, H.A., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, V.V., Allard, J.S., Lopez-Lluch, G., Lewis, K., Pistell, P.J., Poosala, S., Becker, K.G., Boss, O., Gwinn, D., Wang, M., Ramaswamy, S., Fishbein, K.W., Spencer, R.G., Lakatta, E.G., Le Couteur, D., Shaw, R.J., Navas, P., Puigserver, P., Ingram, D.K., de Cabo, R., Sinclair, D.A. 2006. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 444:337-342.
- Belinha, I., Amorim, M.A., Rodrigues, P., de Freitas, V., Moradas-Ferreira, P., Mateus, N., Costa, V. 2007. Quercetin increases oxidative stress resistance and longevity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:2446-2451.
- Benedetti, M.G., Foster, A.L., Vantipalli, M.C., White, M.P., Sampayo, J.N., Gill, M.S., Olsen, A., Lithgow, G.J. 2008. Compounds that confer thermal stress resistance and extended lifespan. *Experimental Gerontology* 43:882-891.
- Büchter, C., Ackermann, D., Havermann, S., Honnen, S., Chovolou, Y., Fritz, G., Kampkötter, A., Wätjen, W. 2013. Myricetin-mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* is modulated by DAF-16. *International Journal of Molecular Sciences* 14:11895-11914.
- Cai, W.J., Huang, J.H., Zhang, S.Q., Wu, B., Kapahi, P., Zhang, X.M., Shen, Z.Y. 2011. Icaritin and its derivative icaraside II extend healthspan via insulin/IGF-1 pathway in *C. elegans*. *PLoS One* 6:e28835.
- Cañuelo, A., Gilbert-López, B., Pacheco-Liñán, P., Martínez-Lara, E., Siles, E., Miranda-Vizuete, A. 2012. Tyrosol, a main phenol present in extra virgin olive oil, increase lifespan and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Mechanisms of Ageing and Development* 133:563-574.
- Chen, W., Sudji, I.R., Wang, E., Joubert, E., van Wyk, B.E., Wink, M. 2013. Ameliorative effect of aspalathin from rooibos (*Aspalathus linearis*) on acute oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology* 20:380-386.
- Chen, Y., Onken, B., Chen, H., Xiao, S., Liu, X., Driscoll, M., Cao, Y., Huang, Q. 2014. Mechanism of longevity extension of *Caenorhabditis elegans* induced by pentagalloyl glucose isolated from eucalyptus leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62:3422-3431.
- Cho, S.C., Park, M.C., Keam, B., Choi, J.M., Cho, Y., Hyun, S., Park, S.C., Lee, J. 2010. DDS, 4, 4'-diaminodiphenylsulfone, extends organismic lifespan. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107:19326-19331.
- Choi, M.J., Kim, B.K., Park, K.Y., Yokozawa, T., Song, Y.O., Cho, E.J. 2010. Anti-aging effects of cyanidin under a stress-induced premature senescence cellular system. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 33:421-426.
- Eisenberg, T., Knauer, H., Schauer, A., Büttner, S., Ruckstuhl, C., Carmona-Gutierrez, D., Ring, J., Schroeder, S., Magnes, C., Antonacci, L., Fussi, H., Deszcz, L., Hartl, R., Schraml, E., Criollo, A., Megalou, E., Weiskopf, D., Laun, P., Heeren, G., Breitenbach, M., Grubeck-Loebenstien, B., Herker, E., Fahrenkrog, B., Fröhlich, K., Sinner, F., Tavernarakis, N., Minois, N., Kroemer, G., Madeo, F. 2009. Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nature Cell Biology* 11:1305-1314.
- Evason, K., Collins, J.J., Huang, C., Hughes, S., Kornfeld, K. 2008. Valporic acid extends *Caenorhabditis elegans* lifespan. *Aging Cell* 7:305-317.
- Havermann, S., Rohrig, R., Chovolou, Y., Humpf, H.U., Wätjen, W. 2013. Molecular effects of baicalein in HCt16 cells and *Caenorhabditis elegans*: activation of the Nrf2 signaling pathway and prolongation of lifespan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61:2158-2164.
- Howitz, K.T., Bitterman, K.J., Cohen, H.Y., Lamming, D.W., Lavu, S., Wood, J.G., Zipkin, R.E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L.L., Scherer, B., Sinclair, D.A. 2003. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425:191-196.

- Kampkötter, A., Gombitang-Nkwonkam, C., Zurawski, R.F., Timpel, C., Chovolou, Y., Wätjen, W., Kahl, R. 2007. Effects of the flavonoids kaempferol and fisetin on thermotolerance, oxidative stress and FoxO transcription factor DAF-16 in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Archives of Toxicology* 81:849-858.
- Kampkötter, A., Timpel, C., Zurawski, R.F., Ruhl, S., Chovolou, Y., Proksch, P., Wätjen, W. 2008. Increase of stress resistance and lifespan of *Caenorhabditis elegans* by quercetin. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology* 149:314-323.
- Katsiki, M., Chondrogianni, N., Chinou, I., Rivett, A.J., Gonos, E.S. 2007. The olive constituent oleuropein exhibits proteasome stimulatory properties in vitro and confers life span extension of human embryonic fibroblasts. *Rejuvenation Research* 10:157-172.
- Kiaei, M., Kipiani, K., Petri, S., Chen, J., Calingasan, N.Y., Beal, M.F. 2005. Celastrol blocks neuronal cell death and extends life in transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuro-degenerative Diseases* 2:246-254.
- Kitani, K., Osawa, T., Yokozawa, T. 2007. The effects of tetrahydrocurcumin and green tea polyphenol on the survival of male C57BL/6 mice. *Biogerontology* 8:567-573.
- Nakagawa-Yagi, Y., Sato, Y., Matsumoto, E., Nakatsuka, S., Sakaki, T., Muramatsu, Y., Hara, T., Aigaki, T. 2012. Pharmacological modulation of histone demethylase activity by a small molecule isolated from subcritical water extracts of *Sasa senanensis* leaves prolongs the lifespan of *Drosophila melanogaster*. *BMC. Complementary and Alternative Medicine* 12:101.
- Pan, W., Jiang, S., Luo, P., Wu, J., Gao, P. 2008. Isolation, purification and structure identification of antioxidant compound from the roots of *Incarvillea younghusbandii* Sprague and its life span prolonging effect in *Drosophila melanogaster*. *Natural Product Research* 22:719-725.
- Peng, C., Chan, H.Y.E., Li, Y.M., Huang, Y., Chen, Z.Y. 2009. Black tea theaflavins extend the lifespan of fruit flies. *Experimental Gerontology* 44:773-783.
- Powolny, A.A., Singh, S.V., Melov, S., Hubbard, A., Fisher, A.L. 2011. The garlic constituent diallyl trisulfide increases the lifespan of *C. elegans* via skn-1 activation. *Experimental Gerontology* 46:441-452.
- Rallis, C., Codlin, S., Bühler, J. 2013. TORC1 signaling inhibition by rapamycin and caffeine affect lifespan, global gene expression, and cell proliferation of fission yeast. *Aging Cell* 12:563-573.
- Saul, N., Pietsch, K., Menzel, R., Stürzenbaum, S.R., Steinberg, C.E. 2010. The longevity effect of tannic acid in *Caenorhabditis elegans*: Disposable Soma meets hormesis. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences* 65:626-635.
- Sayed, A.A. 2011. Ferulic acid attenuation of advanced glycation end products extends the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 63:423-428.
- Snell, T.W., Fields, A.M., Johnston, R.K. 2012. Antioxidants can extend lifespan of *Brachionus manjavacas* (Rotifera), but only in a few combinations. *Biogerontology* 13:261-275.
- Srivastava, D., Arya, U., Soundara-Rajan, T., Dwivedi, H., Humar, S., Subramaniam, J.R. 2008. Reserpine can confer stress tolerance and lifespan extension in the nematode *C. elegans*. *Biogerontology* 9:309-316.
- Strayer, A., Wu, Z., Christen, Y., Link, C.D., Luo, Y. 2003. Expression of the small heat-shock protein Hsp16-2 in *Caenorhabditis elegans* is suppressed by *Ginkgo biloba* extract EGb 761. *The FASEB Journal* 17:2305-2307.
- Strong, R., Miller, R.A., Astle, C.M., Floyd, R.A., Flurkey, K., Hensley, K.L., Javors, M.A., Leeuwenburgh, C., Nelson, J.F., Ongini, E., Nadon, N.L., Warner, H.R., Harrison, D.E. 2008. Nordihydroguaiaretic acid and aspirin increase lifespan of genetically heterogeneous male mice. *Aging Cell* 7:641-650.
- Wang, P., Zhang, Z., Ma, X., Huang, Y., Liu, X., Tu, P., Tong, T. 2003. HDTIC-1 and HDTIC-2, two compounds extracted from *Astragalus Radix*, delay replicative senescence of human diploid fibroblasts. *Mechanisms of Ageing and Development* 124:1025-1034.
- Wiegant, F.A.C., Surinova, S., Ytsma, E., Langelaar-Makkinje, M., Wikman, G., Post, J.A. 2009. Plant adaptogens increase lifespan and stress resistance in *C. elegans*. *Biogerontology* 10: 27:42.
- Wilson, M.A., Shukitt-Hale, B., Kalt, W., Ingram, D.K., Joseph, J.A., Wolkow, C.A. 2006. Blueberry polyphenols increase lifespan and thermotolerance in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 5:59-68.
- Wu, Z., Song, L., Liu, S.Q., Huang, D. 2014. Tanshinones extend chronological lifespan in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* DOI 10.1007/s00253-014-5890-5.

- Zarse, K., Bossecker, A., Müller-Kunrt, L., Siems, K., Hernandez, M.A., Berensdsohn, W.G., Birringer, M., Ristow, M. 2011. The phytochemical glaucarubinone promotes mitochondrial metabolism, reduces body fat, and extends lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Hormone and Metabolic Research* 43: 241-243.
- Zhang, Z., Han, S., Wang, H., Wang, T. 2014. Lutein extends the lifespan of *Drosophila melanogaster*. *Archives of Gerontology and Geriatrics* 58:153-159.
- Zuo, Y., Peng, C., Liang, Y., Ma, K.Y., Chan, H.Y.E., Huang, Y., Chen, Z.Y. 2013. Sesamin extends the mean lifespan of fruit flies. *Biogerontology* 14:107-119.

**Anexo 2. Base de datos de extractos crudos de plantas con efecto en la longevidad. (ND) Información no disponible.**

Nombre de la especie	Parte de la planta	Tipo de extracto	Organismo modelo donde muestra efecto	Observaciones	Referencias
<i>Aloe vera</i> (Aloe)	Hojas	Extracción de jugo	<i>Drosophila melanogaster</i>	Cambio significativo en la duración de la vida máxima; no afecta la fecundidad; incrementa la actividad de enzimas detoxificantes como SOD y CAT	Chandrashekara <i>et al.</i> , 2011
<i>Brassica oleracea</i> (Brócoli)	Cabeza floral	Extracción de jugo	<i>Drosophila melanogaster</i>	Prolongación de la duración de la vida en dietas muy calóricas	Li <i>et al.</i> , 2008
<i>Cinnamomum cassia</i> (Canela china)	Corteza	Decocción	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Extiende significativamente la duración de la vida; atenua niveles de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; aumenta la expresión de proteínas de choque térmico pequeñas (sHSP16); no tiene efecto en mutates daf-16, ser-1 y mev-1	Yu <i>et al.</i> , 2010
<i>Cynomorium songaricum</i> (Cipote de lobo)	Concentrado en polvo (Ko Da Pharmaceutical)	Disuelto en agua	<i>Drosophila melanogaster</i>	Aumenta el comportamiento cognitivo; incrementa la resistencia al estrés oxidativo; incrementa la fecundidad; extiende la duración de la vida media y máxima en hembras	Liu <i>et al.</i> , 2012
<i>Damnacanthus officinarum</i>	Raíz	Decocción	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Efecto de neuroprotección y extensión de la duración de la vida	Yang <i>et al.</i> , 2012
<i>Embllica officinalis</i> (Amla/Amalaki)	Fruto	Fruto completo	<i>Drosophila melanogaster</i>	Incremento significativo en la duración de la vida; incremento de la actividad de SOD y CAT	Rawal <i>et al.</i> , 2014
<i>Euterpe oleracea</i> (Palmera de asaí)	Fruto	Extracción de pulpa	<i>Drosophila melanogaster</i>	Incrementa la duración de la vida en hembras con dietas altamente grasa a través de la activación de rutas de estrés (Sod1)	Sun <i>et al.</i> , 2010
<i>Hedera hélix</i> (Hiedra)	Hojas	Extracto acuoso	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Prolongan la duración de la vida media	Ergen <i>et al.</i> , 2012
<i>Ilex paraguariensis</i> (Matte)	Concentrado en polvo (Yerba Mate toasted)	Infusión	<i>Mus musculus</i>	Disminuye los niveles de ROS y de nitrito; incrementa la duración de la vida y la salud pulmonar en ratones viejos	Lanzetti <i>et al.</i> , 2013
<i>Lobaria pulmonaria</i> (Líquén Epífita)	ND	ND	<i>Drosophila melanogaster</i>	Incrementa la longevidad	Kim <i>et al.</i> , 2011
<i>Lycium barbarum</i> (Arto)	Fruto	Extracción de polisacáridos	<i>Drosophila melanogaster</i>	Incrementa significativamente la duración de la vida máxima y promedio en los machos	Chang <i>et al.</i> , 2008
<i>Malus domestica</i> (Manzana)	Fruto	Extracto con etanol	<i>Drosophila melanogaster</i>	Extiende la duración de la vida media	Peng <i>et al.</i> , 2011

## Continuación del Anexo 2.

Nombre de la especie	Parte de la planta	Tipo de extracto	Organismo modelo donde muestra efecto	Observaciones	Referencias
<i>Morus nigra</i> (Morera negra)	ND	ND	<i>Drosophila melanogaster</i>	Prolonga la duración de la vida	Kim <i>et al.</i> , 2011
<i>Myrtus communis</i> (Mirto)	Hojas	Extracto acuoso	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Prolongan la duración de la vida media	Ergen <i>et al.</i> , 2012
<i>Ocimum sanctum</i> (Albahaca sagrada tailandesa)	Partes aéreas	Infusión temperatura ambiente	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Extiende significativamente la duración de la vida; fuerte inactivador de radicales libres; incrementa la resistencia contra el estrés térmico	Pandey <i>et al.</i> , 2013
<i>Origanum vulgare</i> (Orégano)	Hojas	Extracto acuoso	<i>Anastrepha ludens</i>	Extiende la duración de la vida y promueve la reproducción	Zou <i>et al.</i> , 2012
<i>Panax ginseng</i> (Ginseng radix)	Raíz	Decocción	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Extiende la duración de la vida significativamente; atenúa los niveles de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; incrementa la expresión de las proteínas de choque térmico	Yu <i>et al.</i> , 2010
<i>Phaseolus vulgaris</i> (Frijol)	Semilla	Extracto con cloroformo, metanol y agua	<i>Caenorhabditis elegans</i>	La fracción hidrofílica incrementa la duración de la vida, mientras que la fracción hidrofóbica induce la reducción de la longevidad	Mensack <i>et al.</i> , 2010
<i>Platycladus orientalis</i> (Tuya)	Semilla	Extracto con n-butanol	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Inactiva ROS; reduce la cantidad de lipofuscina; incrementa la expresión de los genes asociados al estrés	Liu <i>et al.</i> , 2012
<i>Psoralea corylifolia</i> (Psoralea)	Fruto	Extracto con metanol	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Dosis bajas incrementa la duración de la vida y decrece los niveles de ROS	Pun <i>et al.</i> , 2010
<i>Pronus pérsica</i> (Nectarina)	Fruto	Fruto completo	<i>Drosophila melanogaster</i>	Reduce el daño oxidativo en hembras con dieta altamente grasa y mutantes de sod1; incrementa la fecundidad; promueve la longevidad y la duración de la salud por modulación del metabolismo de la glucosa	Boyd <i>et al.</i> , 2011
<i>Radix ginseng</i> (Ginseng chino)	Raíz	ND	<i>Mus musculus</i>	Retarda el proceso del envejecimiento asociándolo con la protección contra alteraciones asociadas con la edad en el estado antioxidante mitocondrial y la capacidad funcional en diversos tejidos	Ko <i>et al.</i> , 2010
<i>Rosa damascena</i> (Rosa de Damasco)	Pétalos	Infusión	<i>Drosophila melanogaster</i>	Decremento en la tasa de mortalidad estadísticamente significativo	Jafari <i>et al.</i> , 2008
<i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero)	Hojas	Extracto de metanol	<i>Drosophila melanogaster</i>	Mejora la actividad de las enzimas antioxidantes; inhibe la peroxidación lipídica; retraso del envejecimiento prolongando la duración de la vida	Zhang <i>et al.</i> , 2012

## Continuación del Anexo 2.

Nombre de la especie	Parte de la planta	Tipo de extracto	Organismo modelo donde muestra efecto	Observaciones	Referencias
<i>Rubus sanctus</i> (Zarzamora)	Hojas	Extracto acuoso	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Prolongan la duración de la vida media	Ergen <i>et al.</i> , 2012
<i>Spinaca oleracea</i> (Espinaca)	Hojas	Extracto con metanol	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Incrementa significativamente la supervivencia en condiciones de estrés oxidativo y de altas temperaturas	Fan <i>et al.</i> , 2011
<i>Stachys lavandulifolia</i> (Madera de Betony)	Flores/Hojas	Infusión	<i>Drosophila melanogaster</i>	Extiende la duración de la vida máxima	Altun <i>et al.</i> , 2010
<i>Theobroma cacao</i> (Cacao)	Fruto	Disuelto en agua	<i>Drosophila melanogaster</i>	Efectos antioxidativos, pro-oxidativos y quelante de metales; incrementa la duración de la vida promedio	Bahadorani <i>et al.</i> , 2008
<i>Usnea longissima</i> (Líquén Ule)	ND	Infusión	<i>Drosophila melanogaster</i>	Aumenta la duración de la vida y la fecundidad en dosis bajas	Kim <i>et al.</i> , 2011
<i>Vaccinium angustifolium</i> <i>Vaccinium corymbosum</i> <i>Vaccinium myrtillus</i> (Arándanos)	Extracto comercial (Tianjin Jianfeng Natural Product)	Disuelto en agua	<i>Drosophila melanogaster</i>	Extiende la duración de la vida media; incrementa la expresión de los genes SOD, CAT y Rpn11	Peng <i>et al.</i> , 2012
<i>Vaccinium corymbosum</i> (Arándano azul)	Fruto	Extracto con metanol	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Incrementa la duración de la vida en presencia de la vía CaMKII; incrementa la termotolerancia	Wilson <i>et al.</i> , 2006
<i>Vaccinium oxycoccos</i> (Pequeño arándano agrio)	Fruto	Extracción de jugo	<i>Anastrepha ludens</i> <i>Caenorhabditis elegans</i>	Contribuyen al incremento de la duración de la salud y la longevidad; correlacionado con el incremento de la actividad de DAF-16/FOXO	Argyropoulou <i>et al.</i> , 2013 Zou <i>et al.</i> , 2012
<i>Viscum album coloratum</i> (Múerdago coreano)	Hojas	Decocción	<i>Drosophila melanogaster</i> <i>Caenorhabditis elegans</i>	Extiende la duración de la vida media	Lee <i>et al.</i> , 2014
<i>Withania somnifera</i> (Bufera)	Raíz	Extracto con etanol	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Aumenta la duración de la vida en mutantes para nAChR y acr-16, pero no en silvestre	Kumar <i>et al.</i> , 2013

## Referencias al Anexo 2

- Altun, D., Ayar, A., Uysal, H., Kara, A.A., Ünal, E.L. 2010. Extended longevity of *Drosophila melanogaster* by water and ethanol extracts of *Stachys lavandulifolia*. *Pharmaceutical Biology* 48:1291-1296.
- Argyropoulou, A., Aliannis, N., Trougakos, I.P., Skaltsounis, A.L. 2013. Natural compounds with anti-ageing activity. *Natural Product Reports* 30:1412-1437.
- Bahadorani, S., Hilliker, A.J. 2008. Cocoa confers life span extension in *Drosophila melanogaster*. *Nutrition Research* 28: 377-382.
- Boyd, O., Weng, P., Sun, X., Alberico, T., Laslo, M., Obenland, D.M., Kern, B., Zou, S. 2011. Nectarine promotes longevity in *Drosophila melanogaster*. *Free Radical Biology & Medicine* 50:1669-1678.
- Chandrashekar, K.T., Shakarad, M.N. 2011. Aloe vera or resveratrol supplementation in larval diet delays adult aging in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*. *The Journals of Gerontology, Series A, Biological Sciences and Medical Sciences* 66:965-971.
- Chang, R.C., So, K.F. 2008. Use of anti-aging herbal medicine, *Lycium barbarum*, against aging-associated diseases. What do we know so far? *Cellular and Molecular Neurobiology* 28:643-652
- Ergen, N., Hosbas, S., Atalay, A., Orhan, D.D., Aslan, M., Sezik, E. 2012. Investigation of the effects of Turkish folk medicine on *Caenorhabditis elegans* lifespan. *Planta Medica* 78:1106-1107.
- Fan, D., Hodges, D.M., Zhang, J., Kirby, C.W., Ji, S., Locke, S.J., Critchley, A.T., Prithiviraj, B. 2011. Commercial extract of the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* enhances phenolic antioxidant content of spinach (*Spinacia oleracea* L.) which protects *Caenorhabditis elegans* against oxidative and thermal stress. *Food Chemistry* 124:195:202.
- Jafari, M., Zarban, A., Pham, S., Wang, T. 2008. *Rosa damascena* decreased mortality in adult *Drosophila*. *Journal of Medicinal Food* 11:9-13.
- Kim, S.I., Jung, J.W., Ahn, Y.J., Restifo, L.L., Kwon, H.W. 2011. *Drosophila* as a model system for studying lifespan and neuroprotective activities of plant-derived compounds. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 14:509-517.
- Ko, K.M., Chiu, P.Y., Leung, H.Y., Siu, A.H., Chen, N., Leong, E.P., Poon, M.K. 2010. Long-term dietary supplementation with a yang-invigorating Chinese herbal formula increases lifespan and mitigates age-associated declines in mitochondrial antioxidant status and functional ability of various tissues in male and female C57BL/6J mice. *Rejuvenation Research* 13:168-171.
- Kumar, R., Gupta, K., Saharia, K., Pradhan, D., Subramaniam, J.R. 2013. *Withania somnifera* root extract extends lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Annals of Neurosciences* 20.
- Lanzetti, M., Pereira Pires, K.M., Cardoso Santos, J., Lima Ribeiro, M., Moreira Borges, R., Ribeiro da Silva, A.J., Porto, L.C., Farias Benjamim, C., Santos Valenca, S. 2013. Ready-to-drink Matte ® tea (diet and regular) increased life span and pulmonary health in aged mice. *Food Research International* 54: 675-682.
- Lee, S.H., An, H.S., Jung, Y.W., Lee, E.J., Lee, H.Y., Choi, E.S., An, S.W., Son, H., Lee, S.J., Kim, J.B., Min, K.J. 2014. Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extracts extends the lifespan of nematodes and fruit flies. *Biogerontology* 15:153-164.
- Li, Y.M., Chan, H.Y.E., Yao, X.Q., Huang, Y., Chen, Z.Y. 2008. Green tea catechins and broccoli reduce fat-induced mortality in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Nutritional Biochemistry* 19:376-383.
- Liu, H., Liang, F., Su, W., Wang, N., Lv, M., Li, P., Pei, Z., Zhang, Y., Xie, X.Q., Wang, L., Wang, Y. 2013. Lifespan extension by n-butanol extract from seed of *Platycladus orientalis* in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Ethnopharmacology* 147:366-372.
- Liu, H.P., Chang, R.F., Wu, Y.S., Lin, W.Y., Tsai, F.J. 2012. The Yang-Tonifying herbal medicine *Cynomorium songaricum* extends lifespan and delays aging in *Drosophila*. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM* 2012:735481.
- Mensack, M.M., Fitzgerald, V.K., Lewis, M.R., Thompson, H.J. 2010. Characterization of low molecular weight chemical fractions of dry bean (*Phaseolus vulgaris*) for bioactivity using *Caenorhabditis elegans* longevity and metabolite fingerprinting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58:6697-6705.
- Pandey, R., Gupta, S., Shukla, V., Tandon, S., Shukla, V. 2013. Antiaging, antistress and ROS scavenging activity of crude extract of *Ocimum sanctum* (L.) in *Caenorhabditis elegans* (Maupas, 1900). *Indian Journal of Experimental Biology* 51:515-521.
- Peng, C., Chan, H.Y.E., Huang, Y., Yu, H., Chen, Z.Y. 2011. Apple polyphenols extend the mean lifespan of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59:2097-2106.

- Peng, C., Zou, Y., Kwan, K.M., Liang, Y., Ma, K.Y., Chan, H.Y., Huang, Y., Yu, H., Chen, Z.Y. 2012. Blueberry extract prolongs lifespan of *Drosophila melanogaster*. *Experimental Gerontology* 47:170-178.
- Pun, P.B., Gruber, J., Tang, S.Y., Schaffer, S., Ong, R.L., Fong, S., Ng, L.F., Cheah, I., Halliwell, B. 2010. Ageing in nematodes: do antioxidants extend lifespan in *Caenorhabditis elegans*? *Biogerontology* 11:17-30.
- Rawal, S., Singh, P., Gupta, A., Mohanty, S. 2014. Dietary intake of *Curcuma longa* and *Emblica officinalis* increases life span in *Drosophila melanogaster*. *BioMed Research International* 2014:910290.
- Sun, X., Seeberger, J., Alberico, T., Wang, C., Wheeler, C.T., Schauss, A.G., Zou, S. 2010. Açai palm fruit (*Euterpe oleracea Mart.*) pulp improves survival of flies on a high fat diet. *Experimental Gerontology* 45:243-251.
- Wilson, M.A., Shukitt-Hale, B., Kalt, W., Ingram, D.K., Joseph, J.A., Wolkow, C.A. 2006. Blueberry polyphenols increase lifespan and thermotolerance in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 5:59-68.
- Yang, X., Zhang, P., Wu, J., Xiong, S., Jin, N., Huang, Z. 2012. The neuroprotective and lifespan-extension activities of *Damnacanthus officinarum* extracts in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Ethnopharmacology* 141:41-47.
- Yu, Y. B., Dosanjh, L., Lao, L., Tan, M., Shim, B.S., Luo, Y. 2010. *Cinnamomum cassia* bark in two herbal formulas increases life span in *Caenorhabditis elegans* via insulin signaling and stress response pathways. *PLoS One* 5:e9339.
- Zhang, Y., Wen, S.P., Zhang, Z.S. 2012. Effects of Rosemary extract on the lifespan and antioxidant system of *Drosophila*. *International Conference on Nutrition and Food Sciences* 39:87-91.
- Zou, S., Carey, J.R., Liedo, P., Ingram, D.K., Yu, B. 2012. Prolongevity effects of a botanical with oregano and cranberry extracts in Mexican fruit flies: examining interactions of diet restriction and age. *Age (Dordrecht, Netherlands)* 34: 269-279.



**Anexo 3. Base de datos de plantas medicinales.** [] Otros nombres científicos con los que se conoce a la especie; (/) Simboliza “y”; (ND) No disponible.

Nombre de la especie	Familia	Parte de la planta	Tipo de extracto	Enfermedades que contrarresta	Referencias
<i>Abelmoschus esculentus</i> [ <i>Hibiscus esculentus</i> ] (Okra)	Malvaceae	Semilla/Cáscara	Extracto con hexano	Antioxidante Antihiperlipidémico Hipoglucémico	Khomsug <i>et al.</i> , 2010 Sabitha <i>et al.</i> , 2011
<i>Acosmium panamense</i> [ <i>Sweetia panamensis</i> ] (Bálsamo amarillo/guayacán)	Fabaceae	Corteza	Infusión	Hipoglucémico	Andrade-Cetto <i>et al.</i> , 2005
<i>Acrocomia mexicana</i> (Coyul)	Arecaceae	Raíz	Extracto con metanol	Hipoglucémico	Andrade-Cetto <i>et al.</i> , 2005
<i>Aesculus hippocastanum</i> (Castaño de las indias)	Sapindaceae	Corteza	ND	Antioxidante Inactivador de radicales libres Antiinflamatorio	Braga <i>et al.</i> , 2012
<i>Agarista mexicana</i> (Palo santo)	Ericaceae	Hojas Corteza	Infusión Extracto con cloroformo	Hipoglucémico	Andrade-Cetto <i>et al.</i> , 2005 Perez-G <i>et al.</i> , 1996
<i>Alpinia galanga</i> (Galanga)	Zingiberaceae	Rizoma	Extracto con etanol/ Extracto con metanol	Analgésico Hipoglucémico	Acharya <i>et al.</i> , 2011 Akhtar <i>et al.</i> , 2002
<i>Alpinia purpurata</i> (Alpinia)	Zingiberaceae	Hojas	Solventes (petróleo éter-Cloroformo- Acetato éter-Etanol-Agua)	Antibacterial Anticancerígeno contra células de cáncer de ovario	Arul-Raj <i>et al.</i> , 2012
<i>Annona glabra</i> (Corcho)	Annonaceae	Semilla	Extracto con etanol	Anticancerígeno contra células leucémicas	Cochrane <i>et al.</i> , 2008
<i>Annona muricata</i> (Guanábana)	Annonaceae	Cogollos Hojas Fruto	Infusión Extracto con etanol Liofilización	Aniconvulsionante Antioxidante Hipoglucémico Antiinflamatorio Confiere protección contra cáncer de próstata	N’Gouemo <i>et al.</i> , 1997 N’gueuim <i>et al.</i> , 2014 Ishola <i>et al.</i> , 2014 Yang <i>et al.</i> , 2015
<i>Annona squamosa</i> (Chirimoyo)	Annonaceae	Partes aéreas	Extracto con etanol	Antioxidante Hipoglucémico Antitumoral contra linfoma de Dalton	Ganesan <i>et al.</i> , 2011 Ruiz-Terán <i>et al.</i> , 2008
<i>Arbutus unedo</i> (Madroño)	Ericaceae	Hojas maduras	Infusión	Antiinflamatorio Antioxidante Inactivador de radicales libres	Mariotto <i>et al.</i> , 2008 Mendes <i>et al.</i> , 2011
<i>Argania spinosa</i> (Aragán)	Sapotaceae	Semilla	Macerado en agua	Antihipertensivo Hipoglucémico	Bellahcen <i>et al.</i> , 2013
<i>Astronium graveolens</i> (Gateado)	Anacardiaceae	Hojas	Extracto con metanol	Inactivador de radicales libres	Hernández <i>et al.</i> , 2014

### Continuación del Anexo 3.

Nombre de la especie	Familia	Parte de la planta	Tipo de extracto	Enfermedades que contrarresta	Referencias
<i>Averrhoa carambola</i> (Carambola)	Oxalidaceae	Raíz	Extracto con etanol	Hipoglucémico	Xu <i>et al.</i> , 2014
<i>Baccharis coridifolia</i> (Mío-Mío/Romerillo)	Asteraceae	Partes aéreas	Infusión	Antioxidante	Mongelli <i>et al.</i> , 1997
<i>Bidens pilosa</i> (Aceitilla)	Asteraceae	Partes aéreas Néctar de flor	Infusión/Extracto con etanol/ Extracto con metanol	Antitumoral contra carcinoma de Ehrlich Hipoglucémico Antiinflamatorio Antioxidante	Alarcon-Aguilar <i>et al.</i> , 2002 Fotso <i>et al.</i> , 2014 Kwiecinski <i>et al.</i> , 2008 Liu <i>et al.</i> , 2013
<i>Bixa Orellana</i> (Achiote)	Bixaceae	Hojas	Infusión	Antimicrobiano Antiinflamatorio Antioxidante Hipoglucémico	Stohs, 2013
<i>Brickellia veronicaefolia</i> (Orégano del monte)	Asteraceae	Partes aéreas	Decocción	Antioxidante Hipoglucémico	Andrade-Cetto <i>et al.</i> , 2005
<i>Bunchosia canescens</i> (Nanche de perro)	Malpighiaceae	Partes aéreas	Extracto con etanol	Antioxidante	Ruiz-Terán <i>et al.</i> , 2008
<i>Bursera grandifolia</i> (Palo mulato)	Burseraceae	Partes aéreas	Extracto con etanol	Inactivador de radicales libres Antipirético	Ruiz-Terán <i>et al.</i> , 2008 Velázquez <i>et al.</i> , 2009
<i>Bursera simaruba</i> (Chakah)	Burseraceae	Hojas	Extracto con hexano	Antiinflamatorio	Carretero <i>et al.</i> , 2008
<i>Byrsonima bucidaefolia</i> (Nance agrio)	Malpighiaceae	Hojas Corteza	ND Extracto con etanol	Antioxidante	Castillo-Ávila <i>et al.</i> , 2009
<i>Calendula officinalis</i> (Caléndula)	Asteraceae	Flor	Infusión	Antiinflamatorio Antioxidante Antitumoral contra cáncer de mama, próstata, cérvix, pulmón, páncreas, colonocrectal, melanoma y fibrosarcoma	Jiménez-Medina <i>et al.</i> , 2006 Preethi <i>et al.</i> , 2009
<i>Capparis spinosa</i> (Alcaparra)	Capparaceae	Fruto Brote	Decocción Infusión con metanol	Hipoglucémico Antiobesidad Antioxidante	Germanó <i>et al.</i> , 2002 Kumar <i>et al.</i> , 2005
<i>Carthamus tinctorius</i> (Cártamo)	Asteraceae	Flor	Extracto con etanol	Antiinflamatorio Hipoglucémico	Qazi <i>et al.</i> , 2014 Wang <i>et al.</i> , 2014
<i>Carum carvi</i> (Alcaravea)	Apiaceae	Semilla	Decocción	Hipolipidémico Antihiperglicémico	Haidari <i>et al.</i> , 2011

### Continuación del Anexo 3.

Nombre de la especie	Familia	Parte de la planta	Tipo de extracto	Enfermedades que contrarresta	Referencias
<i>Caryota urens</i> (Cola de pescado)	Arecaceae	Hojas	Extracto con metanol	Antioxidante Antibacterial	Arul Ananth <i>et al.</i> , 2013
<i>Cecropia obtusifolia</i> (Chan cario/Guarumbo)	Cecropiaceae	Hojas	Decocción/Infusión	Hipoglucémico	Andrade-Cetto <i>et al.</i> , 2005
<i>Ceiba aesculifolia</i> (Pochote)	Bombacaceae	Corteza	Extracto con metanol	Antioxidante Antibacterial	Orozco <i>et al.</i> , 2013
<i>Centaurea ainetensis</i>	Asteraceae	Flor	Decocción	Antiinflamatorio	Talhok <i>et al.</i> , 2008
<i>Centaurea aspera</i> (Centaurea)	Asteraceae	Flor	Infusión	Hipoglucémico (ratones con diabetes y normales)	Massó <i>et al.</i> , 1976
<i>Chamaemelum nobile</i> (Manzanilla)	Asteraceae	Capítulos florales Fruto	Infusión	Hipoglucémico Antiobesidad	Lemhadri <i>et al.</i> , 2007
<i>Cichorium intybus</i> (Achicoria)	Asteraceae	Hojas	Extracto con etanol/ Extracto con metanol	Hipoglucémico Antioxidante	D'evoli <i>et al.</i> , 2013 Pushparaj <i>et al.</i> , 2007
<i>Cinchona sp</i> (Copalquin)	Rubiaceae	Corteza	Infusión	Antioxidante Combate la malaria	VanderJagt <i>et al.</i> , 2002
<i>Cirsium pazuarensense</i>	Asteraceae	Hojas	Extracto con hexano	Hipoglucémico	Andrade-Cetto <i>et al.</i> , 2005
<i>Cissampelos pareira</i> (Guaco)	Menispermaceae	Raíz	Extracto con etanol	Antiinflamatorio	Amresh <i>et al.</i> , 2007
<i>Cnidocolus aconitifolius</i> (Chaya)	Euphorbiaceae	Hojas	Extracto con etanol	Hipoglucémico	Oyagbemi <i>et al.</i> , 2010
<i>Coix lachryma-jobi</i> (Lágrima de San Pedro)	Gramineae	Hojas	Decocción	Antiobesidad Hipoglucémico	Kim <i>et al.</i> , 2007 Yeh <i>et al.</i> , 2006
<i>Comocladia engleriana</i> (Teclate)	Anacardiaceae	Partes aéreas	Extracto con etanol	Inactivador de radicales libres	Ruiz-Terán <i>et al.</i> , 2008
<i>Cordia sebestena</i> (Anacahuite)	Boraginaceae	Corteza Hojas	Hidroestilación Extracto con etanol	Inactivador de radicales libres Hipoglucémico	Adeosun <i>et al.</i> , 2013 Sarathchandiran <i>et al.</i> , 2013
<i>Costus spicatus</i> (Costus)	Costaceae	Hojas	Extracto con metanol	Antiinflamatorio	Quintas Júnior <i>et al.</i> , 2010
<i>Crataegus mexicana</i> (Tejocote)	Rosaceae	Raíz Hojas	Decocción Extracto con hexano	Efecto relajante	Arrieta <i>et al.</i> , 2010

### Continuación del Anexo 3.

Nombre de la especie	Familia	Parte de la planta	Tipo de extracto	Enfermedades que contrarresta	Referencias
<i>Crithmum maritimum</i> (Hinojo marino/Perejil marino)	Apiaceae	Partes aéreas	Extracto con acetona	Antioxidante Antibacterial	Jallali <i>et al.</i> , 2014
<i>Cucurbita ficifolia</i> (Chilacayote)	Cucurbitaceae	Fruto	Macerado en agua	Hipoglucémico Antioxidante Antiinflamatorio	Andrade-Cetto <i>et al.</i> , 2005 Roman-Ramos <i>et al.</i> , 2012
<i>Cuminum cyminum</i> (Comino)	Apiaceae	Semilla	Extracto con metanol	Antihiperglicémico Control del estrés oxidativo	Jagtap <i>et al.</i> , 2010
<i>Cuscuta reflexa</i> (Akashabela)	Convolvulaceae	Partes aéreas	Infusión temperatura ambiente	Antiinflamatorio Anticancerígeno en células de carcinoma hepatocelular	Suresh <i>et al.</i> , 2011
<i>Cynara dactylon</i> (Grama)	Asteraceae	Hojas	Decocción/Extracto con etanol	Hipoglucémico Antioxidante	Karthik <i>et al.</i> , 2011
<i>Cynara scolymus</i> (Alcachofa)	Asteraceae	Hojas	Decocción	Hipoglucémico Antioxidante	Heidarian <i>et al.</i> , 2011
<i>Emilia sonchifolia</i> (Botón rosado/Hierba socialista)	Asteraceae	Hojas	Infusión/Extracto con metanol	Antiinflamatorio Antioxidante Antitumoral contra linfoma de Dalton y carcinoma de Ehrlich	Muko <i>et al.</i> , 2000 Shylesh <i>et al.</i> , 2000
<i>Equisetum myriochaetum</i> (Cola de caballo)	Equisetaceae	Partes aéreas	Decocción	Hipoglucémico	Andrade-Cetto <i>et al.</i> , 2005
<i>Eriobotrya japonica</i> (Níspero)	Rosaceae	Hojas Tallo	Decocción/Extracto con etanol Extracto con metanol	Hipoglucémico Antioxidante Antimicrobiano Antiinflamatorio	Cha <i>et al.</i> , 2011 Chen <i>et al.</i> , 2008 Rashed <i>et al.</i> , 2014
<i>Eucalyptus globulus</i> (Eucalipto)	Myrtaceae	Hojas	Extracto con etanol	Antioxidante Hipoglucémico	Ahlem <i>et al.</i> , 2009
<i>Garcinia kola</i> (Cola amarga/Orobó)	Clusiaceae	Semilla	Extracto con metanol	Hipoglucémico Antioxidante Resistencia a inflamación	Adaramoye, 2012 Ayepola <i>et al.</i> , 2014
<i>Globularia alypum</i> (Coronilla de fraile)	Plantaginaceae	Hojas	Infusión	Antioxidante Hipoglucémico Antiegotóxico	Harzallah <i>et al.</i> , 2010 Skim <i>et al.</i> , 1999
<i>Guazuma ulmifolia</i> (Akeichta/guacima)	Sterculaceae	Corteza Hojas	Decocción/ Extracto con metanol	Hipoglucémico Inactivador de radicales libres	Alarcon-Aguilara <i>et al.</i> , 1998 Maldini <i>et al.</i> , 2013
<i>Hylocereus undatus</i> (Pitahaya)	Cactaceae	Fruto	Macerado en agua (pulpa)	Controla el daño oxidativo	Anand Swarup <i>et al.</i> , 2010

### Continuación del Anexo 3.

Nombre de la especie	Familia	Parte de la planta	Tipo de extracto	Enfermedades que contrarresta	Referencias
<i>Inula crithmoides</i>	Asteraceae	Partes aéreas	Extracto con acetona	Antioxidante Antibacterial	Jallali <i>et al.</i> , 2014
<i>Justicia spicigera</i> (Muicle)	Acanthaceae	Hojas	Extracto con etanol	Antitumoral contra cáncer cérvico-uterino	Alonso-Castro <i>et al.</i> , 2012
<i>Laurus nobilis</i> [ <i>Laurel nobilis</i> ] (Laurel)	Lauraceae	Hojas	Decocción	Antiinflamatorio Antioxidante	Orlando <i>et al.</i> , 2010
<i>Lavandula angustifolia</i> (Lavanda inglesa)	Lamiaceae	Hojas Flor	Extracto hidroalcohólico Infusión	Antiinflamatorio Analgésico Antioxidante Mejora el rendimiento espacial en Alzheimer	Hajhashemi <i>et al.</i> , 2003 Kashani <i>et al.</i> , 2011 Spiridon <i>et al.</i> , 2011
<i>Lepechinia caulescens</i> (Salvia)	Lamiaceae	Flor	Decocción	Hipoglucémico	Alarcon-Aguilara <i>et al.</i> , 1998
<i>Lepidium meyenii</i> (Maca)	Brassicaceae	Hipocotiledones	Decocción	Revierde la hiperplasia benigna de próstata Reduce presión Antidepresivo Previene la osteoporosis	Gonzales <i>et al.</i> , 2014 Stojanovska <i>et al.</i> , 2014
<i>Licania arborea</i> (Cacahuate)	Chrysobalanaceae	Partes aéreas	Extracto con etanol	Antioxidante	Ruiz-Terán <i>et al.</i> , 2008
<i>Mahonia fortunei</i> (Mahonia china/Uva sagrada)	Berberidaceae	Hojas	Decocción	Antiinflamatorio	Zhang <i>et al.</i> , 2011
<i>Malvastrum coromandelianum</i> (Malvavisco)	Malvaceae	Hojas	Decocción	Hipoglucémico Antiinflamatorio	Khonsung <i>et al.</i> , 2006
<i>Marrubium vulgare</i> (Mestranzo)	Lamiaceae	Hojas	Infusión	Antioxidante Hipotensivo	VanderJagt <i>et al.</i> , 2002
<i>Melissa officinalis</i> (Melisa)	Lamiaceae	Hojas	Infusión	Antitumoral en cáncer de mama Mejora funciones cognitivas en el Alzheimer Antioxidante	Akhondzadeh <i>et al.</i> , 2003 Saraydin <i>et al.</i> , 2012
<i>Murraya koenigii</i> (Árbol de hojas del curry)	Rutaceae	Hojas	Infusión temperatura ambiente	Hipoglucémico Antioxidante	El-Amin <i>et al.</i> , 2013 Gill <i>et al.</i> , 2014
<i>Musa x paradisiaca</i> [ <i>Musa x sapientum</i> ] (Flor de plátano)	Musaceae	Raíz Flor	Macerada Decocción	Hipoglucémico	Alarcon-Aguilara <i>et al.</i> , 1998
<i>Oenothera biennis</i> (Onagra/Primrosa)	Onagraceae	Partes aéreas Semillas	Extracto con metanol Extracto con etanol	Antioxidante Antiinflamatorio Antitumoral contra carcinoma de Ehrlich	Arimura <i>et al.</i> , 2004 Granica <i>et al.</i> , 2013

### Continuación del Anexo 3.

Nombre de la especie	Familia	Parte de la planta	Tipo de extracto	Enfermedades que contrarresta	Referencias
<i>Oenothera paradoxa</i> (Primavera de tarde)	Onagraceae	Partes aéreas	Extracto con metanol	Antioxidante Antiinflamatorio Anticancerígeno contra cáncer de próstata y de mama	Granica <i>et al.</i> , 2013 Lewandowska <i>et al.</i> , 2014
<i>Parmentiera aculeata</i> [ <i>Parmentiera edulis</i> ] (Cuajilote)	Pinaceae	Raíz Corteza	Decocción	Hipoglucémico	Andrade-Cetto <i>et al.</i> , 2005
<i>Paullinia cupana</i> (Guaraná)	Sapindaceae	Semilla	Extracto con etanol	Antibacteriano Antioxidante	Basile <i>et al.</i> , 2005
<i>Piper nigrum</i> (Pimienta negra)	Piperaceae	Fruto	Extracto con metanol	Antioxidante Mejora la memoria en el Alzheimer	Hritcu <i>et al.</i> , 2014
<i>Plumeria rubra</i> [ <i>Plumeria acutifolia</i> ] (Cacaloxóchitl/Flor de mayo)	Apocynaceae	Flor Corteza de raíz	Decocción Extracto con metanol	Antianafiláctico Antiinflamatorio Antioxidante Hipolipidémico	Alakshmi <i>et al.</i> , 2011 Merina <i>et al.</i> , 2010
<i>Prunus armeniaca</i> (Chabacano)	Rosaceae	Raíz Grano	Decocción Infusión	Antioxidante Antimicrobiano	Yigit <i>et al.</i> , 2009
<i>Prunus spinosa</i> (Endrino)	Rosaceae	Fruto	Jugo fresco de fruto	Antioxidante	Fraternale <i>et al.</i> , 2009
<i>Psacalium peltatum</i> (Matarique)	Asteraceae	Raíz (Rizoma)	Extracto con etanol	Antiinflamatorio Antioxidante Hipoglucémico	Alarcon-Aguilar <i>et al.</i> , 2002 Alarcon-Aguilar <i>et al.</i> , 2010
<i>Psittacanthus calyculatus</i> (Injerito)	Loranthaceae	Partes aéreas	Decocción	Vasodilatador Antioxidante	Ibarra-Alvarado <i>et al.</i> , 2010
<i>Quassia amara</i> (Cuasia)	Simaroubaceae	Partes aéreas	Decocción Extracto con metanol	Hipoglucémico Combate la malaria	Husain <i>et al.</i> , 2011
<i>Rheum officinale</i> (Ruibarbo)	Polygonaceae	Rizoma	Decocción	Antioxidante Inactivador de radicales libres	Zhang <i>et al.</i> , 2011
<i>Rhizophora mangle</i> (Mangle)	Rhizophoraceae	Corteza	Decocción	Antioxidante Inactivador de radicales libres Hipoglucémico	Alarcon-Aguilara <i>et al.</i> , 1998 Sánchez <i>et al.</i> , 2010
<i>Rosa sp.</i> (Rosa de castillo)	Rosaceae	Flor	Infusión	Antioxidante Antiinflamatorio	Orlando <i>et al.</i> , 2010 VanderJagt <i>et al.</i> , 2002
<i>Rumex hymenosepalus</i> (Cana agria)	Polygonaceae	Raíz	Infusión	Antioxidante Antitumoral contra sarcoma	VanderJagt <i>et al.</i> , 2002

### Continuación del Anexo 3.

Nombre de la especie	Familia	Parte de la planta	Tipo de extracto	Enfermedades que contrarresta	Referencias
<i>Santalum album</i> (Sándalo)	Santalaceae	Madera	Extracto con metanol	Antioxidante Analgésico Antiinflamatorio Antihiper glucémico	Kulkarni <i>et al.</i> , 2012 Saneja <i>et al.</i> , 2009
<i>Sapium macrocarpum</i> (Palo verde)	Euphorbiaceae	Partes aéreas	Extracto con etanol	Antioxidante	Ruiz-Terán <i>et al.</i> , 2008
<i>Sedum dendroideum</i> (Siempre viva)	Crassulaceae	Jugo de hojas	Extracto con etanol	Antiinflamatorio Hipoglucémico	Da Silva <i>et al.</i> , 2014 De Melo <i>et al.</i> , 2009
<i>Sedum praealtum</i> (Siempre viva)	Crassulaceae	Flor	Extracto de metanol	Antioxidante	Beltrán-Orozco <i>et al.</i> , 2013
<i>Sophora flavescens</i> (Ku shen)	Fabaceae	Raíz	Decocción	Antiinflamatorio	Zhang <i>et al.</i> , 2011
<i>Styphnolobium japonicum</i> [ <i>Sophora japonica</i> ] (Hauí hua)	Fabaceae	Flor	Decocción	Antioxidante Inactivador de radicales libres Antiinflamatorio	Zhang <i>et al.</i> , 2011
<i>Swertia chirata</i> [ <i>Swertia chirayita</i> ] (Chireta)	Gentianaceae	Planta completa	Extracto con etanol	Antioxidante Hipoglucémico	Baipai <i>et al.</i> , 1991 Chen <i>et al.</i> , 2011
<i>Syzygium caryophyllatum</i> (Ciruela negra salvaje)	Myrtaceae	Hojas	Extracto con metanol/ Extracto con etil acetato	Antimicrobiano Antioxidante Hipoglucémico Anticancerígeno contra cáncer cérvico-uterino	Annaduria <i>et al.</i> , 2012 Savitha-Rrabeque <i>et al.</i> , 2013
<i>Tabebuia rosea</i> (Maculis rosa)	Bignoniaceae	Hojas	Extracto con metano	Antioxidante Anticancerígeno contra linfoma de Dalton	Hemamalini <i>et al.</i> , 2012
<i>Taxillus chinensis</i> (Sang ji sheng)	Loranthaceae	Partes aéreas	Decocción	Antioxidante Inactivador de radicales libres Antiinflamatorio	Zhang <i>et al.</i> , 2011
<i>Tecoma stans</i> (Histoncle)	Bignoniaceae	Hojas	Infusión	Hipoglucémico	Aguilar-Santamaría <i>et al.</i> , 2009
<i>Trigonella foenum-graecum</i> (Alholva)	Fabaceae	Semilla	Infusión	Anticancerígeno contra cáncer de mama Hipoglucémico	Amin <i>et al.</i> , 2005 Kumar <i>et al.</i> , 2005
<i>Uncaria tomentosa</i> [ <i>Nuclea tomentosa</i> ] (Uña de gato)	Rubiaceae	Corteza	Extracto con cloroformo	Antiinflamatorio	Rojas-Duran <i>et al.</i> , 2012
<i>Verbesina persicifolia</i> (Huachín)	Asteraceae	Hojas	Extracto con cloroformo	Hipoglucémico	Andrade-Cetto <i>et al.</i> , 2005 Perez-G <i>et al.</i> , 1996

### Continuación del Anexo 3.

Nombre de la especie	Familia	Parte de la planta	Tipo de extracto	Enfermedades que contrarresta	Referencias
<i>Ziziphus mauritiana</i> (Ciruela babosa)	Rhamnaceae	Hojas Semilla	Extracto con etanol	Antioxidante Hipoglucémico	Adeyemo, 2011 Bhatia <i>et al.</i> , 2012
<i>Zygophyllum gaetulum</i> (Zigofila)	Zygophyllaceae	Partes aéreas	Infusión	Antiinflamatorio Hipoglucémico	Ait El Cadi <i>et al.</i> , 2012 Skim <i>et al.</i> , 1999



## Referencias al Anexo 3

- Acharya, S.D., Ullal, S.D., Padiyar, S., Rao, Y.D., Upadhyaya, K., Pillai, D., Raj, V. 2011. Analgesic effect of extracts of *Alpinia galanga* rhizome in mice. *Journal of Chinese Integrative Medicine* 9:100-104.
- Adaramoye, O.A. 2012. Antidiabetic effect of kolaviron, a biflavonoid complex isolated from *Garcinia kola* seeds, in Wistar rats. *African Health Sciences* 12:498-506.
- Adeosun, C.B., Olaseinde, S., Opeifa, A.O., Atolani, O. 2013. Essential oil from the stem bark of *Cordia sebestena* scavenges free radicals. *Journal of Acute Medicine* 3:138-141.
- Adeyemo, S.O. 2011. Studies on in-vitro antioxidant and free radical scavenging potential and phytochemical screening of leaves of *Ziziphus mauritiana* L. and *Ziziphus spina-christi* L. compared with ascorbic acid. *Journal of Medical Genetics and Genomics* 3:28-34.
- Aguilar-Santamaría, L., Ramírez, G., Nicasio, P., Alegría-Reyes, C., Herrera-Arellano, A. 2009. Antidiabetic activities of *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth. *Journal of Ethnopharmacology* 124:284-288.
- Ahlem, S., Khaled, H., Wafa, M., Sofiane, B., Mohamed, D., Jean-Claude, M., Abdelfattah el, F. 2009. Oral administration of *Eucalyptus globulus* extract reduces the alloxan-induced oxidative stresses in rats. *Chemico-biological Interactions* 181:71-76.
- Ait El Cadi, M., Makram, S., Ansar, M., Khabbal, Y., Alaoui, K., Faouzi, M.A., Cherrah, Y., Taoufik, J. 2012. Anti-inflammatory activity of aqueous and ethanolic extracts of *Zygophyllum gaetulum*. *Annales Pharmaceutiques Françaises* 70:113-116.
- Akhondzadeh, S., Noroozian, M., Mohammadi, M., Ohadinia, S., Jamshidi, A.H., Khani, M. 2003. *Melissa officinalis* extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomised. Placebo controlled trial. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 74:863-866.
- Akhtar, M.S., Khan, M.A., Malik, M.T. 2002. Hypoglycaemic activity of *Alpinia galanga* rhizome and its extracts in rabbits. *Fitoterapia* 73:623-628.
- Alakshmi, V., Chandiran, R., Velraj, M., Hemalatha, Jayakumari. 2011. Anti-anaphylactic and anti-inflammatory activities of a bioactive alkaloid from the root bark of *Plumeria acutifolia* Poir. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 10:525-533.
- Alarcon-Aguilar, F.J., Fortis-Barrera, A., Angeles-Mejia, S., Banderas-Dorantes, T.R., Jasso-Villagomez, J.C., Alamanza-Perez, J.C., Blancas-Flores, G., Zamilpa, A., Diaz-Flores, M., Roman-Ramos, R. 2010. Anti-inflammatory and antioxidant effects of a hypoglycemic fructan fraction from *Psacalium peltatum* (H.B.K.) Cass. in streptozotocin-induced diabetes mice. *Journal of Ethnopharmacology* 132: 400-407.
- Alarcon-Aguilar, F.J., Roman-Ramos, R., Flores-Saenz, J.L., Aguirre-Garcia, F. 2002. Investigation of the hypoglycaemic effects of extracts of four mexican medicinal plants in normal and alloxan-diabetic mice. *Phytotherapy Research* 16:383-386.
- Alarcon-Aguilar, F.J., Roman-Ramos, R., Perez-Gutierrez, S., Aguilar-Contreras, A., Contreras-Weber, C.C., Flores-Saenz, J.L. 1998. Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. *Journal of Ethnopharmacology* 61: 101-110.
- Alonso-Castro, A.J., Ortiz-Sánchez, E., Domínguez, F., Arana-Argáez, V., Juárez-Vázquez, M.C., Chávez, M., Carranza-Álvarez, C., Gaspar-Ramírez, O., Espinosa-Reyes, G., López-Toledo, G., Ortiz-Andrade, R., García-Carracá, A. 2012. Antitumor and immunomodulatory effects of *Justicia spicigera* Schltdl (Acanthaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 141: 888-894.
- Amin, A., Alkaabi, A., Al-Falasi, S., Daoud, S.A. 2005. Chemopreventive activities of *Trigonella foenum graecum* (Fenugreek) against breast cancer. *Cell Biology International* 29:687-694.
- Amresh, G., Reddy, G.D., Rao, Ch.V., Singh, P.N. 2007. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Cissampelos pareira* root in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 110:526-531.
- Anand Swarup, K.R., Sattar, M.A., Abdullah, N.A., Abdulla, M.H., Salman, I.M., Rathore, H.A., Johns, E.J. 2010. Effect of dragon fruit extract on oxidative stress and aortic stiffness in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Pharmacognosy Research* 2:31-35.
- Andrade-Cetto, A., Heinrich, M. 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology* 99:325-348.
- Annaduria, G., Masilla, B.R., Jothiramshekar, S., Palanisami, E., Puthiyapurayil, S., Parida, A.K. 2012. Antimicrobial, antioxidant, anticancer activities of *Syzygium caryophyllatum* (L.) Alston. *International Journal of Green Pharmacy* 6:285.
- Arimura, T., Kojima-Yuasa, A., Kennedy, D.O., Matsui-Yuasa, I. 2004. Reactive oxygen species-independent G1 arrest induced by evening primrose extract in Ehrlich ascites tumor cells. *Cancer letters* 207:19-25.

- Arrieta, J., Siles-Barrios, D., García-Sánchez, J., Reyes-Trejo, B., Sánchez-Mendoza, M.E. 2010. Relaxant effect of the extracts of *Crataegus mexicana* on guinea pig tracheal smooth muscle. *Pharmacognosy Journal* 2: 40-46.
- Arul Ananth, D., Sivasudha, T., Rameshkumar, A., Jeyadevi, R., Aseervatham, S.B. 2013. Chemical constituents in vitro antioxidant and antimicrobial potential of *Caryota urens* L. *Free Radicals and Antioxidants* 3:107-112.
- Arul-Raj, C., Sophia, D., Ragavendran, P., Starlin, T., Rathi, M.A., Gopalakrishnan, V.K. 2012. Leaf extract of *Alpinia purpur* (Vieill.) Schum screened for its phytochemical constituents and antibacterial and anticancer activities. *Journal of Chinese Integrative Medicine* 10:1460-1464.
- Ayepola, O.R., Brooks, N.L., Oquntibeju, O.O. 2014. Kolaviron improved resistance to oxidative stress and inflammation in the blood (erythrocyte, serum and plasma) of streptozotocin-induced diabetic rats. *The Scientific World Journal* 2014.
- Baipai, M.B., Asthana, R.K., Sharma, N.K., Chatterjee, S.K., Mukherjee, S.K. 1991. Hypoglycemic effect of swerchirin from the hexane fraction of *Swertia chirayita*. *Planta Medica* 57:102-104.
- Basile, A., Ferrara, L., Del Pezzo, M., Mele, G., Sorbo, S., Bassi, P., Montesano, D. 2005. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paulliana cupana* Mart. *Journal of Ethnopharmacology* 102:32-36.
- Bellahcen, S., Hakkou, Z., Ziyat, A., Legssyer, A., Mekhfi, H., Aziz, M., Bnouham, M. 2013. Antidiabetic and antihypertensive effect of Virgin Aragan Oil in model of neonatal streptozotocin-induced diabetic and I-nitroarginine methylester (I-NAME) hypertensive rats. *Journal of Complementary & Integrative Medicine* 10:29-36.
- Beltrán-Orozco, MC., Ocampo-Rascón, J.J., Díaz-Cedillo, F., Silva-Torres, R. 2013. Chemical composition and antioxidant ability of the crude extract of *Sedum praealtum* flowers. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 5:778-784.
- Bhatia, A., Mishra, T. 2010. Hypoglycemic activity of *Ziziphus mauritiana* aqueous ethanol seed extract in alloxan-induced diabetic mice. *Pharmaceutical Biology* 48:604-610.
- Braga, P.C., Marabini, L., Wang, Y.Y., Lattuada, N., Caló, R., Bertelli, A., Falchi, M., Dal Sasso, M., Bianchi, T., 2012. Characterisation of the antioxidant effects of *Aesculus hippocastanum* L. bark extract on the basis of radical scavenging activity, the chemiluminescence of human neutrophil bursts and lipoperoxidation assay. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 16, Suppl. 3:1-9.
- Carretero, M.E., López-Pérez, J.L., Abad, M.J., Bermejo, P., Tillet, S., Israel, A., Noguera-P, B. 2008. Preliminary study of the anti-inflammatory activity of hexane extract and fractions from *Bursera simaruba* (Linneo) Sarg. (Burseraceae) leaves. *Journal of Ethnopharmacology* 116:11-15.
- Castillo-Ávila, G.M., García-Sosa, K., Peña-Rodríguez, L.M. 2009. Antioxidants from the leaf extract of *Byrsonima bucidiaefolia*. *Natural Product Communications* 4:83-86.
- Cha, D.S., Eun, J.S., Jeon, H. 2011. Anti-inflammatory and antinociceptive properties of the leaves of *Eriobotrya japonica*. *Journal of Ethnopharmacology* 134:305-312.
- Chen, J., Li, W.L., Wu, J.L., Ren, B.R., Zhang, H.Q. 2008. Hypoglycemic effects of a sesquiterpene glycoside isolated from leaves of loquat (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.). *Phytomedicine* 15: 98-102.
- Chen, Y., Huang, B., He, J., Han, L., Zhan, Y., Wang, Y. 2011. *In vitro* and *in vivo* antioxidant effects of the ethanolic extracts of *Swertia chirayita*. *Journal of Ethnopharmacology* 136:309-315.
- Cochrane, C.B., Nair, P.K., Melnick, S.J., Resek, A.P., Ramachandran, C. 2008. Anticancer effects of *Annona glabra* plant extracts in human leukemia cell lines. *Anticancer Research* 28:965-971.
- Da Silva, D., Casanova, L.M., Marcondes, M.C., Espindola-Netto, J.M., Paixão, L.P., De Melo, G.O., Zancan, P., Sola-Penna, M., Costa, S.S. 2014. Antidiabetic activity of *Sedum dendroideum*: metabolic enzymes as putative targets for the bioactive flavonoid kaempferitin. *IUBMB life* 66:361-370.
- De Melo G.O., Malvar Ddo, C., Vanderlinde, F.A., Rocha, F.F., Pires, P.A., Costa, E.A., de Matos, L.G., Kaiser, C.R., Costa, S.S. 2009. Antinociceptive and anti-inflammatory kaempferol glycosides from *Sedum dendroideum*. *Journal of Ethnopharmacology* 124:228-232.
- D'evoli, L., Morroni, F., Lombardi-Boccia, G., Lucarini, M., Hrelia, P., Cantelli-Forti, G., Tarozzi, A. 2013. Red chicory (*Cichorium intybus* L. cultivar) as a potential source of antioxidant anthocyanins for intestinal health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2013.
- El-Amin, M., Virk, P., Elobeid, M.A., Almarhoon, Z.M., Hassan, Z.K., Omer, S.A., Merghani, N.M., Daghestani, M.H., Al-Olayan, E.M. 2013. Anti-diabetic effect of *Murraya koenigii* (L) and *Olea europaea* (L) leaf extracts on streptozotocin induced diabetic rats. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 26:359-365.

- Fotso, A.F., Longo, F., Djomeni, P.D., Louam, S.F., Spitteller, M., Dongmo, A.B., Savineau, J.P. 2014. Analgesic and antiinflammatory activities of the ethyl acetate fraction of *Bidens pilosa* (Asteraceae). *Inflammopharmacology* 22:105-114.
- Fraternal, D., Giamperi, L., Bucchini, A., Sestili, P., Paolillo, M., Ricci, D. 2009. *Prunus spinosa* fresh fruit juice: antioxidant activity in cell-free and cellular systems. *Natural Product Communications* 4:1665-1670.
- Ganesan, R.M., Muthuchelian, K. 2011. Antitumor potential of an acetogenin isolated from the seed extracts of *Annona squamosa* Linn. *Journal of Cancer Research and Experimental Oncology* 3:95-104.
- Germanó, M.P., De Pasquale, R., D'Angelo, V., Catania, S., Silvani, V., Costa, C. 2002. Evaluation of extracts and isolated fraction from *Capparis spinosa* L. buds as an antioxidant source. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:1168-1171.
- Gill, N.S., Sharma, B. 2014. Study on antioxidant potential of *Murraya koenigii* leaves in Wistar rats. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 17:126-129.
- Gonzales, G.F., Villaorduña, L., Gasco, M., Rubio, J., Gonzales, C. 2014. Maca (*Lepidium meyenii* Walp), a review of its biological properties. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 31:100-110.
- Granica, S., Czerwinska, M.E., Piwowarski, J.P., Ziąja, M., Kiss, A.K. 2013. Chemical composition, antioxidative and anti-inflammatory activity of extracts prepared from aerial parts of *Oenothera biennis* L. and *Oenothera paradoxa* Hudziok obtained after seeds cultivation. *Jornal of Agricultural and Food Chemistry* 61:801-810.
- Haidari, F., Seyed-Sadjadi, N., Taha-Jalali, M., Mohammed-Shahi, M. 2011. The effect of oral administration of *Carum carvi* on weight, serum glucose, and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats. *Saudi Medical Journal* 7:695-700.
- Hajhashemi, V., Ghannadi, A., Sharif, B. 2003. Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. *Journal of Ethnopharmacology* 89:67-71.
- Harzallah, H.J., Neffati, A., Skandrani, I., Maaloul, E., Chekir-Ghedira, L., Mahjoub, T. 2010. Antioxidant and antigenotoxic activities of *Globularia alypum* leaves extracts. *Journal of Medicinal Plants Research* 4:2048-2053.
- Heidarian, E., Soofiniya, Y. 2011. Hypolipidemic and hypoglycemic effects of aerial part of *Cynara scolymus* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Medicinal Plants Research* 5: 2717-2723.
- Hemamalini, K., Soujanya, G.L., Bhargav, A., Vasireddy, U. 2012. *In vivo* anticancer activity of *Tabebuia rosea* (Bertol) DC leaves on Dalton's ascetic lymphoma in mice. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 3:4496-4502.
- Hernández, V., Malafrente, N., Mora, F., Pesca, M.S., Aquino, R.P., Mencherini, T. 2014. Antioxidant and antiangiogenic activity of *Astronium graveolens* Jacq. Leaves. *Natural Product Research* 28:917-922.
- Hritcu, L., Noumedem, J.A., Cioanca, O., Hancianu, M., Kuete, V., Mihasan, M. 2014. Methanolic extract of *Piper nigrum* fruits improves memory impairment by decreasing brain oxidative stress in amyloid beta (1-42) rat model of Alzheimer's disease. *Cellular and Molecular Neurobiology* 34:437-449.
- Husain, G.M., Singh, P.N., Singh, R.K., Kumar, V. 2011. Antidiabetic activity of standardized extract of *Quassia amara* in nicotinamide-streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytotherapy Research* 25:1806-1812.
- Ibarra-Alvarado, C., Rojas, A., Mendoza, S., Bah, M., Gutiérrez, D.M., Hernández-Sandoval, L., Martínez, M. 2010. Vasoactive and antioxidant activities of plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of cardiovascular diseases. *Pharmaceutical Biology* 48:732-739.
- Ishola, I.O., Awodele, O., Olusayero, A.M., Ochieng, C.O. 2014. Mechanisms of analgesic and anti-inflammatory properties of *Annona muricata* Linn. (Annonaceae) fruit extract in rodents. *Journal of Medicinal Food* 17:1375-1382.
- Jagtap, A.G., Patil, P.B. 2010. Antihyperglycemic activity and inhibition of advanced glycation end product formation by *Cuminum cyminum* in streptozotocin induced diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology* 48:2030-2036.
- Jallali, I., Zaouali, Y., Missaoui, I., Smeoui, A., Abdelly, C., Ksouri, R. 2014. Variability of antioxidant and antibacterial effects of essential oils and acetonetic extracts of two edible halophytes: *Crithmum maritimum* L. and *Inula crithmoides* L. *Food Chemistry* 145:1031-1038.
- Jiménez-Medina, E., García-Lora, A., Paco, L., Algarra, I., Collado, A., Garrido, F. 2006. A new extract of the plant *Calendula officinalis* produces a dual in vitro effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. *BMC Cancer* 6:119.
- Karthik, D., Ravikumar, S. 2011. A study on the protective effect of *Cynodon dactylon* leaves extract in diabetic rats. *Biomedical and Environmental Sciences* 24: 190-199.
- Kashani, M.S., Tavirani, M.R., Talaei, S.A., Salami, M. 2011. Aqueous extract of lavender (*Lavandula angustifolia*) improves the spatial performance of a rat model of Alzheimer's disease. *Neuroscience Bulletin* 27:99-106.

- Khomsug, P., Thongjaroenbuangam, W., Pakdeenarong, N., Suttajit, M., Chantiratikul, P. 2010. Antioxidative activities and phenolic content of extracts from okra (*Abelmoschus esculentus* L.). *Research Journal of Biological Sciences* 5:310-313.
- Khonsung, P., Nantsupawat, S., Jesadanont, S.N., Chantharatepawan, V., Panthong, A. 2006. Anti-inflammatory and analgesic activities of water extract of *Malvastrum coromandelianum* (L.) Garcke. *Thai Journal of Pharmacology* 28:8-15.
- Kim, S.O., Yun, S.J., Lee, E.H. 2007. The water extract of adlay seed (*Coix lachrymajobi* var. Mayuen) exhibits anti-obesity effects through neuroendocrine modulation. *The American Journal of Chinese Medicine* 35: 297-308.
- Kulkarni, C.R., Joglekar, M.M., Patil, S.B., Arvindekar, A.U. 2012. Antihyperglycemic and antihyperlipidemic effect of *Santalum album* in streptozotocin induced diabetic rats. *Pharmaceutical Biology* 50:360-365.
- Kumar, G.S., Shetty, A.K., Sambaiah, K., Salimath, P.V. 2005. Antidiabetic property of fenugreek seed mucilage and spent turmeric in streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutrition Research* 25: 1021-1028.
- Kwiecinski, M.R., Bettega Felipe, K., Schoenfelder, T., de Lemos Wiese, L.P., Rossi, M.H., Gonçalez, E., D'arc Felicio, J., Wilhelm Filho, D., Curi Pedrosa, R., 2008. Study of the antitumor potential of *Bidens pilosa* (Asteraceae) used in brazilian folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 117:69-75.
- Lemhadri, A., Eddouks, M., Sulpice, T., Burcelin, R. 2007. Anti-hyperglycemic and anti-obesity effects of *Capparis spinosa* and *Chamaemelum nobile* aqueous extracts in HFD mice. *American Journal of Pharmacology and Toxicology* 2:106-110.
- Lewandowska, U., Owczarek, K., Szewczyk, K., Podsedek, A., Koziolkiewicz, M., Hrabec, E. 2014. Influence of polyphenol extract from evening primrose (*Oenothera paradoxa*) seeds on human prostate and breast cancer cell lines. *Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej* 68:110-118.
- Liu, J.R., Ye, Y.L., Lin, T.Y., Wang, Y.W., Peng, C.C. 2013. Effect of floral sources on the antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of honeys in Taiwan. *Food Chemistry* 15;139:938-943.
- Maldini, M., Di Micco, S., Montoro, P., Darra, E., Mariotto, S., Bifulco, G., Pizza, C., Piacente, S. 2013. Flavanocoumarins from *Guazuma ulmifolia* bark and evaluation of their affinity for STAT1. *Phytochemistry* 86:64-71.
- Mariotto, S., Ciampa, A.R., de Prati, A.C., Darra, E., Vincenzi, S., Sega, M., Cavalieri, E., Shoji, K., Suzuki, H. 2008. Aqueous extract of *Arbutus unedo* inhibits STAT1 activation in human breast cancer cell line MDA-MB-231 and human fibroblast through SHP2 activation. *Medicinal Chemistry* 4:219-228.
- Massó, J.L., Adzet, T. 1976. Hypoglycaemic activity of *Centaurea aspera* L. *Revista Española de Fisiología* 32:313-316.
- Mendes, L., de Freitas, V., Baptista, P., Carvalho, M. 2011. Comparative antihemolytic and radical scavenging activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf and fruit. *Food and Chemical Toxicology* 49:2285-2291.
- Merina, A.J., Sivanesan, D., Begun, V.H., Sulochana, N. 2010. Antioxidant and hypolipidemic effect of *Plumeria rubra* L. in alloxan induced hyperglycemic rats. *Journal of Chemistry* 7:1-5.
- Mongelli, E., Desmarchelier, C., Rodríguez-Talou, J., Coussio, J., Ciccía, G. 1997. *In vitro* antioxidant and cytotoxic activity of extracts of *Baccharis cordifolia* DC. *Journal of Ethnopharmacology* 58:157-163.
- Muko, K.N., Ohiri, F.C. 2000. A preliminary study on the anti-inflammatory properties of *Emilia sonchifolia* leaf extracts. *Fitoterapia* 71:65-68.
- N'Gouemo, P., Koudogbo, H., Pambou Tchivounda, H., Akono-Nguema, C., Etoua, M.M. 1997. Effects of ethanol extract of *Annona muricata* on pentylenetetrazol-induced convulsive seizures in mice. *Phytotherapy Research* 11:243-245.
- Ngueguim, T. F., Massa, Z.B., Kouamou, J., Tchuidjang, A., Dzeufiet, D.P.D., Kamtchouing, P., Dimo, T. 2014. Antidiabetic and antioxidant effects of *Annona muricata* (Annonaceae), aqueous extract on streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 151:784-790.
- Orlando, R.A., Gonzales, A.M., Hunsaker, L.A., Franco, C.R., Royer, R.E., Vander Jagt, D.L., Vander Jagt, D.J. 2010. Inhibition of nuclear factor kB activation and cyclooxygenase-2 expression by aqueous extracts of hispanic medicinal herbs. *Journal of Medicinal Food* 13:888-895.
- Orozco, J., Rodríguez-Monroy, M.A., Martínez, K.E., Flores, C.M., Jiménez-Estrada, M., Durán, A., Rosas-López, R., Hernández, L.B., Canales, M. 2013. Evaluation of some medicinal properties of *Ceiba aesculifolia* subsp. parvifolia. *Journal of Medicinal Plants Research* 7:309-314.
- Oyagbemi, A.A., Odetola, A.A., Azeez, O.I. 2010. Antidiabetic properties of ethanolic extract of *Cnidioscolus aconitifolius* on alloxan induced diabetes mellitus in rats. *African Journal of Medicine & Medical Sciences* 39:171-178.
- Perez-G, R.M., Perez-G, S., Zavala, M.A., Perez-G, S.C. 1996. Effect of *Agarista mexicana* and *Verbesina persicifolia* on blood glucos level of normoglycaemic and alloxan-diabetic mice and rats. *Phytotherapy Research* 10:351-353.

- Preethi, K.C., Kuttan, G., Kuttan, R. 2009. Anti-inflammatory activity of flower extract of *Calendula officinalis* Linn. and its possible mechanism of action. *Indian Journal of Experimental Biology* 47:113-120.
- Pushparaj, P.N., Low, H.K., Mankandan, J., Tan, B.K.H., Tan, C.H. 2007. Anti-diabetic effects of *Cichorium intybus* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 111:430-434.
- Qazi, N., Khan, R.A., Riwani, G.H., Feroz, Z. 2014. Effect of *Carthamus tinctorius* (Safflower) on fasting blood glucose and insulin levels in alloxan induced diabetic rabbits. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 27:377-380.
- Quintas Júnior, L.J., Santana, M.T., Melo, M.S., de Sousa, D.P., Santos, D.P., Siqueira, R.S., Lima, T.C., Silveira, G.O., Antonioli, A.R., Ribeiro, L.A., Santos, M.R. 2010. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Costus spicatus* in experimental animals. *Pharmaceutical Biology* 48:1097-1102.
- Rashed, K.N., Butnariu, M. 2014. Isolation and antimicrobial and antioxidant evaluation of bio-active compounds from *Eriobotrya japonica* stems. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* 4:75-81.
- Rojas-Duran, R., González-Aspajo, G., Ruiz-Martel, C., Bourdy, G., Doroteo-Ortega, V.H., Alban-Castillo, J., Robert, G., Auberge, P., Deharo, E. 2012. Anti-inflammatory activity of mitraphyllin isolated from *Uncaria tomentosa* bark. *Journal of Ethnopharmacology* 143:801-804.
- Roman-Ramos, R., Alamza-Perez, J.C., Fortis-Barrera, A., Angeles-Mejia, S., Banderas-Dorantes, T.R., Zamilpa-Alvarez, A., Diaz-Flores, M., Jasso, I., Blancas-Flores, G., Alarcon-Aguilar, F.J. 2012. Antioxidant and anti-inflammatory effects of a hypoglycemic fraction from *Cucurbita ficifolia* Bouché in streptozotocin-induced diabetes mice. *American Journal of Chinese Medicine* 40:97-110.
- Ruiz-Terán, F., Medrano-Martínez, A., Navarro-Ocaña, A. 2008. Antioxidant and free radical scavenging activities of plant extracts used in traditional medicine in Mexico. *African Journal of Biotechnology* 7:1886-1893.
- Sabitha, V., Ramachandran, S., Naveen, K.R., Panneerselvam, K. 2011. Antidiabetic and antihyperlipidemic potential of *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench. in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences* 3:397-402.
- Sánchez, J.C., García, R.F., Cors, M.T. 2010. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical and superoxide anion scavenging activity of *Rhizophora mangle* (L.) bark. *Pharmacognosy Research* 2:279-284.
- Saneja, A., Kaushik, P., Kaushik, D., Kumar, S., Kumar, D. 2009. Antioxidant, analgesic and anti-inflammatory activities of *Santalum album* Linn. *Planta Medica* 75:102.
- Sarathchandiran, I., Gnanavel, M. 2013. Anti-diabetic activity of the isolated compounds of *Cordia sebestena* in high fat diet fed-Streptozotocin-induced diabetic rats. *International Journal of Biological & Pharmaceutical Research* 4:1050-1056.
- Saraydin, S.U., Tuncer, E., Tepe, B., Karadavi, S., Özer, H., Sen, M., Karadayi, K., Inan, D., Elagöz, S., Polat, Z., Duman, M., Turan, M. 2012. Antitumoral effects of *Melissa officinalis* on breast cancer *in vitro* and *in vivo*. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 13:2765-2770.
- Savitha-Rrabegue, C., Padmavathy, S. 2013. Hypoglycaemic effect of *Syzygium caryophyllatum* (L.) Alston on alloxan induced diabetic albino mice. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 6.
- Shylesh, B.S., Padikkala, J. 2000. *In vitro* cytotoxic and antitumor property of *Emilia sonchifolia* (L.) DC in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 73: 459-500.
- Skim, F., Lazrek, H.B., Kaaya, A., el Amri, H., Jana, M. 1999. Pharmacological studies of two antidiabetic plants: *Globularia alypum* and *Zygophyllum gaetulum*. *Thérapie* 54:711-715.
- Spiridon, I., Colceru, S., Anghel, N., Teaca, C.A., Bodirlau, R., Armatu, A. 2011. Antioxidant capacity and total phenolic contents of oregano (*Origanum vulgare*), lavender (*Lavandula angustifolia*) and lemon balm (*Melissa officinalis*) from Romania. *Natural Product Research* 25:1657-1661.
- Stohs, S.J. 2013. Safety and efficacy of *Bixa orellana* (Achiote, Annatto) leaf extracts. *Phytotherapy Research* DOI: 10.1002/ptr.5088.
- Stojanovska, L., Law, C., Lai, B., Chung, T., Nelson, K., Day, S., Apostolopoulos, V., Haines, C. 2014. Maca reduces blood pressure and depression, in a pilot study in postmenopausal woman. *Climacteric: The Journal of the International Menopause Society* 16:1-26.
- Suresh, V., Sruthi, V., Padmaja, B., Asha, V.V. 2011. *In vitro* anti-inflammatory and anti-cancer activities of *Cuscuta reflexa* Roxb. *Journal of Ethnopharmacology* 134:872-877.
- Talhok, R.S., El-Jouni, W., Baalbaki, R., Gali-Muhtasib, H., Kogan, J., Talhok, S.N. 2008. Anti-inflammatory bio-activities in water extract of *Centaurea aietensis*. *Journal of Medicinal Plants Research* 2:24-33.

- VanderJagt, T.J., Ghattas, R., VanderJagt, D.J., Crossey, M., Glew, R.H. 2002. Comparison of the total antioxidant content of 30 widely used medicinal plants of New Mexico. *Life Sciences* 70:1035-1040.
- Velázquez, F., Manríquez, R., Maya, L., Barrientos, L., López-Dellamary, F. 2009. Phenacetin isolated from *Bursera grandifolia*, a herbal remedy with antipyretic properties. *Natural Product Communications* 4:1575-1576.
- Wang, Y., Chen, P., Tang, C., Wang, Y., Li, Y., Zhang, H. 2014. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of extract and two isolated flavonoids of *Carthamus tinctorius* L. *Journal of Ethnopharmacology* 151:944-50.
- Xu, X., Liang, T., Wen, Q., Lin, X., Tang, J., Zuo, Q., Tao, L., Xuan, F., Huang, R. 2014. Proactive effects of total extracts of *Averrhoa carambola* L. (Oxalidaceae) roots on Streptozotocin-induced diabetic mice. *Cellular Physiology and Biochemistry* 33:1272-1282.
- Yang, C., Gundala, S.R., Mukkavilli, R., Vangala, S., Reid, M.D., Aneja, R. 2015. Synergistic interactions among flavonoids and acetogenins in Graviola (*Annona muricata*) leaves confer protection against prostate cancer. *Carcinogenesis* 10.1093/bgv046.
- Yeh, P.H., Chiang, W., Chiang, M.T. 2006. Effects of dehulled adlay on plasma glucose and lipid concentrations in streptozotocin-induced diabetic rats fed a diet enriched in cholesterol. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 76: 299-305.
- Yigit, D., Yigit, N., Mavi, A. 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of bitter and sweet apricot (*Prunus armeniaca* L.) kernels. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 42: 346-352.
- Zhang, L., Ravipati, A.S., Koyyalamudi, S.R., Jeong, S.C., Reddy, N., Smith, P.T., Bartlett, J., Shanmugam, K., Münch, G., Wu, M.J. 2011. Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected medicinal plants containing phenolic and flavonoid compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59:12361-12367.

## Apéndice. Lista de medios.

<i>Medio SC-Aging</i>	<i>g/L</i>	<i>Medio YNB-1f</i>	<i>g/L</i>
YNB sin aminoácidos	6.7	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5
Glucosa	20	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
Aminoácidos	2	MgSO <sub>4</sub>	0.5
Cold spring harbor		NaCl	0.1
		CaCl <sub>2</sub>	0.1
		Glucosa	20
		Aminoácidos - Complete	0.79
		Supplement Mixture	
		Stock de vitaminas 1000X	1 mL/L
		Stock de elementos traza	1 mL/L
		1000X	

<i>Stock de elementos traza</i> <i>1000X</i>	<i>mg/100 mL</i>	<i>Stock de vitaminas 1000X</i>	<i>mg/100 mL</i>
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	50	Biotina	0.2
CuSO <sub>4</sub>	4	Pantotenato de calcio	40
KI	10	Inositol	200
FeCl <sub>3</sub>	20	Niacina	40
MnSO <sub>4</sub>	40	Ácido para-amino benzoico	20
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	20	Pyroxidina – HCl	40
ZnSO <sub>4</sub>	40	Thiamina – HCl	40