



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

**Facultad de Estudios Superiores  
Iztacala**

Propiedades biológicas de  
*Psittacanthus calyculatus*  
(Loranthaceae)

T E S I S

Que para obtener el título de  
B I Ó L O G O  
P R E S E N T A :

**FELIPE MARTÍNEZ RAMÍREZ**

ASESOR:

Dr. José Guillermo Avila Acevedo



Tlalnepantla de Baz, Estado de México

2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*Do you ever feel already buried deep?  
Six feet under screams but no one seems to hear a thing.*

*Do you know that there's still a chance for you?  
'Cause there's a spark in you...*

*You just gotta ignite the light and let it shine  
Just own the night like the 4th of July.*

*'Cause baby you're a firework,  
c'mon show'em what your worth,*

*Make'em go, Oh, oh, oh!  
as you shoot across the sky!*

*You don't have to feel like a waste of space,  
you're original, cannot be replaced.*

*If you only knew what the future holds,  
after a hurricane comes a rainbow.*

*Maybe you're reason why all the doors are closed,  
so you can open one that leads you to the perfect road.*

*Like a lightning bolt, your heart will blow  
and when it's time, you'll know.*

## INDICE GENERAL

Índice de tablas .....	III
Índice de figuras .....	IV
Agradecimientos.....	VII
Dedicatorias.....	VIII
Resumen.....	1
Abstract .....	2
Introducción .....	3
Justificación .....	8
Hipótesis .....	10
Objetivo general .....	10
Objetivos particulares .....	10
Materiales y métodos .....	11
Preparación del extracto .....	12
Determinación cualitativa de las sustancias presentes en el extracto.....	13
Animales .....	13
Bioensayos de hipertensión .....	13
Inducción de la diabetes .....	14

Bioensayos de diabetes .....	15
Ensayo agudo .....	15
Ensayo subcrónico .....	15
Ensayo de citotoxicidad .....	16
Ensayo con DPPH .....	18
Resultados y Discusión .....	19
Datos generales de la planta .....	19
Rendimientos obtenidos .....	20
Reacciones coloridas .....	22
Bioensayo de hipertensión .....	24
Bioensayo de diabetes (agudo) .....	29
Bioensayo de diabetes (subcrónico) .....	35
Ensayo de citotoxicidad (cáncer) .....	43
Capacidad antioxidante (ensayo frente al DPPH) .....	50
Conclusiones .....	57
Apéndices .....	58
Apéndice 1: Diabetes mellitus .....	59
Apéndice 2: Hipertensión .....	61
Apéndice 3: Cáncer .....	63
Apéndice 4: Estrés oxidativo y su relación con algunos padecimientos....	67
Referencia Bibliográfica .....	73
Ciberografía citada .....	83

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Ficha de datos generales de <i>P. calyculatus</i> .....	15
Tabla 2.- Resultados de las pruebas de identificación cualitativa hechas al extracto metanólico de <i>P. calyculatus</i> .....	16
Tabla 3.- Mediciones obtenidas de la presión arterial sistólica en el ensayo de hipertensión con el extracto metanólico de <i>P. calyculatus</i> .....	20
Tabla 4.- Mediciones obtenidas de la presión arterial diastólica en el ensayo de hipertensión con el extracto metanólico de <i>P. calyculatus</i> .....	21
Tabla 5.- Mediciones obtenidas en el ensayo agudo de diabetes mellitus del grupo experimental tratado con el extracto metanólico de <i>P. calyculatus</i> .....	25
Tabla 6.- Mediciones obtenidas en el ensayo agudo de diabetes mellitus del grupo control negativo tratado solo con el vehículo.....	25
Tabla 7.- Mediciones obtenidas en el ensayo agudo de diabetes mellitus del grupo control farmacológico tratado con insulina.....	26
Tabla 8.- Mediciones obtenidas en el ensayo agudo de diabetes mellitus del grupo control farmacológico tratado con glibenclamida.....	26
Tabla 9.- Datos obtenidos en el ensayo subcrónico de diabetes mellitus para el grupo experimental tratado con el extracto metanólico de <i>P. calyculatus</i> a una dosis de 200 mg/Kg .....	32
Tabla 10.- Datos obtenidos en el ensayo subcrónico de diabetes mellitus para el grupo experimental tratado con el extracto metanólico de <i>P. calyculatus</i> a una dosis de 400 mg/Kg .....	34

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1.- Morfología general y principales estructuras de <i>Psittacanthus calyculatus</i> (DC.) G. Don.....	6
Fig. 2.- Metodología (Diagrama de flujo) .....	9
Fig. 3.- Ilustración de <i>P. calyculatus</i> de manera aislada y como hemiparásita de algunas especies de <i>Quercus sp.</i> .....	15
Figura 4.- Rendimientos obtenidos de los diferentes extractos hechos de <i>P. calyculatus</i> .....	17
Figura 5.- Representación de las medias observadas de presión sistólica y diastólica en el bioensayo de hipertensión para el extracto metanólico de <i>P. calyculatus</i> .....	22
Figura 6.- Representación de los niveles de glucosa en sangre que presentaron los diferentes grupos control (negativo, insulina y glibenclamida) y experimental (extracto metanólico de <i>P. calyculatus</i> ), en el bioensayo agudo de diabetes.....	27
Figura 7.- Representación de los niveles de glucosa en sangre que presentó el grupo control y experimental, en el bioensayo subcrónico de diabetes con el extracto metanólico de <i>P. calyculatus</i> (dosis: 200 mg/Kg) .....	33
Figura 8.- Representación de los niveles de glucosa en sangre que presentó el grupo control y experimental, en el bioensayo subcrónico de diabetes con el extracto metanólico de <i>P. calyculatus</i> (dosis: 400 mg/Kg).....	35
Figura 9.- Actividad citotóxica del extracto metanólico de <i>P. calyculatus</i> contra la línea celular de cáncer de mama (MCF-7) .....	40

Figura 10.- Actividad citotóxica del extracto metanólico de <i>P. calyculatus</i> contra la línea celular de cáncer de colon (KB) .....	41
Figura 11.- Actividad citotóxica del extracto metanólico de <i>P. calyculatus</i> contra la línea celular de cáncer nasofaríngeo (HF6) .....	42
Figura 12.- Porcentaje de reducción del DPPH contra diferentes concentraciones del extracto metanólico de <i>P. caclyculatus</i> .....	47

*Que tu vida esté plena de:*

*ENTÚSIASMO, para ver hacia adelante.*

*FELICIDAD, para mantenerte dulce.*

*PROBLEMAS, para mantenerte fuerte.*

*PENAS, para mantenerte humano.*

*ESPERANZAS, para mantenerte feliz.*

*FRACASOS, para mantenerte humilde.*

*ÉXITOS, para mantenerte anhelante.*

*RIQUEZA, para satisfacer tus necesidades.*

*DECISIÓN, para hacer que cada día sea mejor que ayer.*

*El agradecimiento es la parte principal de un hombre de bien.  
- Francisco de Quevedo*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la UNAM, la máxima casa de estudios, por darme la oportunidad de ser parte de ella.

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, por ser el pilar fundamental durante mi formación profesional.

Al laboratorio de Fitoquímica de la Unidad de Biotecnología y Prototipos.

Al Laboratorio 3 de la Unidad de Biomedicina.

Al laboratorio de Plantas medicinales del Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma del Estado de Morelos.

A todos los profesores que durante mis 4 años de carrera me brindaron su apoyo y colaboración que contribuyó en gran medida a mi formación profesional.

A la Dr. Maria Luisa Villarreal por su asesoría y especial compañía durante mi estancia en la UAEM.

En especial al Dr. José Guillermo Ávila Acevedo por todo su apoyo, enseñanza y amistad, así como su asesoría tanto a la realización de esta tesis, como a mi formación como Biólogo.

*"El mejor homenaje que puede tributarse a las personas buenas es imitarlas"*  
- Concepción Arenal

## DEDICATORIAS

A mi familia, con la mayor gratitud, respeto y admiración por los esfuerzos realizados para que yo lograra terminar mi carrera profesional, siendo para mí la mejor herencia.

A mis hermanas y hermanos: Graciela, Jair, Raciél y Darinka, quienes con su cariño y alegría llenan mi vida de amor y cuidado, que con su apoyo y amistad hacen que día con día sonrío y siga adelante.

A mi madre: Yazmín Ramírez Velázquez, que es el ser más maravilloso del mundo, gracias por el apoyo moral, su cariño y comprensión que desde pequeño me ha brindado, por guiar mi camino y estar siempre junto a mí en los momentos más difíciles.

A mi padre: Felipe Martínez Nava, por que desde que yo era pequeño ha sido para mí un hombre grande y maravilloso que siempre he admirado. Gracias por guiar mi vida con energía, esto es lo que ha hecho de mí lo que soy.

A mis abuelitos: María Sadoth Velázquez y Raciél Ramírez, por llenar mi vida de paciencia y amor, por que con su ejemplo de tenacidad me han demostrado lo que hace a un gran hombre.

A mis otros abuelitos: Anita y Manuel, por que su ánimo, amor y confianza, me hicieron sentirme fuerte a cada paso que daba.

A mis tíos y tías: Elvia, Essex, Maru, Raciél, Ilia, Baldemar, Sofía, Cuauhtémoc, Elba, Samuel y Audrey, por que su ejemplo, apoyo, cariño, comprensión y enseñanza me hicieron seguir adelante con mi carrera profesional.

*¿Sabes cuál es la diferencia entre un hombre inteligente y uno sabio?  
Que el inteligente sabe lo que dice y el sabio sabe cuando decirlo.*

A mi papá académico: Memo, quien puso en mí la confianza que necesité para salir adelante día a día, que con paciencia y fortaleza me enseñó grandes cosas durante mi carrera, incluida la humildad. A él que más que mi asesor se ha vuelto un amigo invaluable.

A mis mamis académicas: Tazásna, Margarita y Anita, quienes con paciencia y ánimo me guiaron a lo largo de mi carrera, brindándome su confianza y cariño para que llegara a ser el profesionalista que ahora soy. A ellas que más que mis asesoras se volvieron mis confidentes.

A mi profesora estrella: María Luisa Villarreal, quién me brindó su apoyo incondicional en mi estancia en la UAEM y de quien aprendí grandes cosas sobre la biología.

A mi gran profesor: Maximiliano Ibarra, quien me otorgó su confianza al entrar al laboratorio y me guió con entusiasmo durante la realización de esta tesis.

A los profesores que marcaron mi carrera profesional: Beatriz Vázquez, Samuel Meraz, Ángel Durán, Patricia Escobar, Hugo Perales, Irma Delfín, entre otros, por que gracias a ellos tuve la fortaleza de seguir adelante y redescubrí mi verdadera vocación.

*“Los mejores amigos son como las estrellas, aunque no siempre se ven, sabes que están ahí”.*

A la mejor de mis amigas: Selma Medina, quien me enseñó lo que significa la verdadera amistad, que con cariño me hizo saber que con humildad, respeto y paciencia todo se puede lograr, que la fé también forma parte de nuestra vida y que cada persona vale por lo que es y no solo por lo que hace. Por sus sabios consejos y estar conmigo en los buenos y malos momentos. A ella, que se convirtió en otra de mis hermanas.

A mis amigas: Carmen Martín, Diana Alvarado y Susana Botello, con quienes compartí grandes experiencias a lo largo de la carrera y que gracias al cariño entre nosotros se volvieron amigas invaluable.

A mis amigos: Pepe, Edgar, Wily y Adrián, con quienes viví muy buenos momentos y me divertí a lo grande en cada salida que teníamos.

A mis amigas: Las moustras (Noemí, Aby, Perlita, Evelin y Metzli) por que siempre estuvieron ahí para brindarme su apoyo incondicional y disfrutamos de carcajadas que marcaron una amistad eterna.

A mis amig@s perrys: Fabiola García y César Sixto, con quienes reía a carcajadas y pasamos grandes momentos juntos, por que hicieron de mi año de tesis uno de los mejores en la carrera.

A Alejandra Barenas Razo, una amiga incondicional que siempre será mi angelito en la vida. Por ella que se volvió una estrella en mi camino.

Y a todos aquellos que de una u otra manera contribuyeron a este gran proyecto.

## RESUMEN

Dentro de las enfermedades que representan un problema de salud pública, encontramos: la diabetes mellitus, la hipertensión y el cáncer. En los diversos métodos alternativos para el control de estos padecimientos se encuentran los fitoterapéuticos, en donde el hombre hace uso de los vegetales a su alcance. *Psittacanthus calyculatus* es una planta que contiene sustancias con distintas propiedades biológicas. El objetivo del presente trabajo fue determinar si los extractos presentan actividad hipotensora, hipoglucemiante, antioxidante y citotóxica. Se obtuvieron extractos de distintas polaridades por percolación. Se evaluó la actividad hipotensora e hipoglucemiante del extracto metanólico en ratas SHR (spontaneously hypertensive rats) y diabéticas inducidas con estreptozotocina. Así mismo se determinó la actividad citotóxica en 3 líneas celulares de cáncer de mama, colon y nasofaringe, mientras que la actividad antioxidante se evaluó frente al radical DPPH (difenil picril hidracilo).

El extracto no tuvo actividad hipotensora a la dosis de 100 mg/Kg; sin embargo, se observó que provoca un descenso en la glucemia del 31.8%, 8 horas después de su administración (200 mg/Kg); concluyendo que *P. calyculatus* presenta actividad hipoglucemiante. En cuanto a la citotoxicidad se obtuvieron diversos valores de dosis efectiva media (DE<sub>50</sub>): 7.0032 µg/mL (MCF-7), 9.0045 µg/mL (HF-6) y 18.002 µg/mL (KB). Por otra parte, el extracto presentó actividad como antioxidante obteniendo una CA<sub>50</sub> de 13.66 ppm.

Palabras clave: *Psittacanthus calyculatus*, fitoquímica, fitoterapia, hipoglucemiantes, citotóxico, antioxidantes.

## ABSTRACT

Among the diseases that pose a public health problem are: diabetes mellitus, hypertension and cancer. The various alternative methods for controlling these diseases are the phytotherapeutic ones, in which the man uses the plants within his reach. *Psittacanthus calyculatus* is a plant that contains substances with different biological properties. The aim of this study was to determine whether extracts have hypotensive activity, hypoglycemic, antioxidant and cytotoxic. Extracts were obtained by percolation with solvents of different polarities. We evaluated the antihypertensive and hypoglycemic activity of the methanol extract in SHR (spontaneously hypertensive rats) and streptozotocin-induced diabetic rats. In addition to this, cytotoxic activity was determined in 3 cell lines of breast, colon, and nasopharynx, while the antioxidant activity was tested against DPPH· radical (diphenyl picril hidracil).

The extract did not have hypotensive effect at dose of 100 mg/Kg; however, it was found that it causes a decrease in blood glucose of 31.8% 8 hours after the administration (200 mg/Kg), it was concluded that *P. calyculatus* has hypoglycemic activity. In terms of cytotoxicity, it was obtained different values of middle effective dose (ED<sub>50</sub>): 7.0032 mg/mL (MCF-7), 9.0045 mg/mL (HF-6) and 18,002 ug/mL (KB). Moreover, the extract showed antioxidant activity as getting an AC<sub>50</sub> 13.66 ppm.

Keywords: *Psittacanthus calyculatus*, phytochemistry, phytotherapy, hipoglucemiantes, citotoxic, antoixidants.

*Contra cada padecimiento crece una planta...*  
*Paracelso, siglo XVI*

## **Introducción**

En el mundo, el uso de las plantas medicinales ha sido una práctica que ha estado siempre presente en la vida del hombre. En la actualidad ha resurgido el interés por los beneficios que ofrece la herbolaria, tanto para la búsqueda de preparados a base del vegetal íntegro, de fracciones activas (fitofármacos) o mediante el descubrimiento de estructuras prototipo, atractivas para la industria farmacéutica debido a la simplicidad de la molécula, su actividad biológica y el bajo costo que pueda representar su síntesis química artificial (Farnsworth, 1993).

Históricamente, México tiene una gran riqueza de conocimientos sobre la flora debido a la gran cantidad de etnias que la usan en su medicina tradicional; lo que hace que este conocimiento sea reconocido por la etnobotánica como una ciencia prehispánica (Gómez-Pompa, 2002).

La medicina tradicional ocupa un lugar importante en la realidad médica del país ya que la medicina alópata cubre sólo el 40 % de los servicios de salud (Eloff, 1998); de ahí la importancia de los estudios etnobotánicos como precursores de investigaciones fitoquímicas y farmacológicas, que permitan encontrar nuevos fármacos contra diversas enfermedades (Hernández *et al.*, 2003). Es así que la medicina tradicional mexicana puede ser un importante campo para implementar nuevos planes de salud, que combinen el conocimiento popular con el conocimiento científico (Tascon, 1997).

Los estudios fitoquímicos son una parte importante dentro de la investigación encaminada a encontrar nuevos compuestos y formas de preparación de medicamentos. Así, la enorme diversidad fitoquímica y el largo tiempo de evolución del metabolismo vegetal han resultado en interacciones de complejidad creciente (Vivanco *et al.*, 2005), poniendo atención en esta área debido a la gran

variedad de sustancias orgánicas que son elaboradas y almacenadas por las plantas, la estructura química de esos compuestos, su biosíntesis, metabolismo, distribución natural y su función biológica (Harborne, 1973).

En este sentido, la importancia del estudio de las plantas sobre todo en el campo medicinal, radica en las ventajas de asimilación del hombre de formas más naturales como son las infusiones, cataplasmas, etc., que son utilizadas y que representan nuevas formas para la realización de productos farmacéuticos (Nice, 1993).

Las plantas poseen dos tipos de metabolitos denominados: primarios y secundarios. Los primeros incluyen clorofilas, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, etc., los cuales son comunes en todas las plantas. Los metabolitos secundarios, como: flavonoides, alcaloides, cumarinas, taninos, etc., por lo general se biosintetizan a partir de los primarios y son parte importante de las investigaciones fitoquímicas junto con muchas otras sustancias que pueden ser mezclas de compuestos. Estas sustancias se restringen a ciertas especies de plantas y ayudan de alguna forma a la interacción ecológica entre las plantas y su medio (Gros *et al.*, 1985; Croteau *et al.*, 2000).

Nuestro país presenta cerca de 5,000 a 7,000 especies vegetales (Caballero, 1978), éstas representan un gran potencial para satisfacer diferentes necesidades del hombre (Rosas, 2003). En la actualidad cerca de 3000 especies son empleadas en la medicina tradicional (Linares *et al.*, 1999), lo cual ha incrementado el interés tanto por la utilidad comercial, como por su actividad biológica, siendo una gran fuente económica explotable sobre todo en el control de enfermedades que tienen su origen en trastornos metabólicos. En este sentido, una de las enfermedades metabólicas más frecuentes es la diabetes mellitus (DM). Este padecimiento es un desorden metabólico caracterizado por los altos niveles de glucosa en la sangre, resultado de la ausencia o inadecuada secreción

de insulina por parte del páncreas, con o sin deterioro coexistente en la acción de insulina (WHO, 1999; Ortiz-Andrade *et al.*, 2006) (Apéndice 1).

Si bien diferentes padecimientos se encuentran ligados a la DM, uno íntimamente relacionado a ésta es la hipertensión (HT), la cual constituye un factor de riesgo de enfermedad cardiovascular con el mayor impacto epidemiológico en el mundo. Aunado a lo anterior, también representa un factor importante para el desarrollo de otras enfermedades como disfunción renal, insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedad coronaria y accidente cerebro vascular (Ogihara, 2005) (Apéndice 2).

Otra enfermedad importante, que se ha asociado a diversos factores de riesgo comunes es el cáncer, el cual es un proceso de reproducción y diseminación incontrolada de células que puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo. Este crecimiento celular incontrolado suele invadir el tejido circundante y puede provocar metástasis en puntos distantes al sitio de inicio del proceso (OMS, 2009a) (Apéndice 3).

Existe un aspecto central que es categórico en las tres enfermedades antes mencionadas, el estrés oxidativo, descrito como un desequilibrio entre los agentes antioxidantes y los prooxidantes a favor de estos últimos (Halliwell & Gutteridge, 2007). Es en este aspecto que el estrés oxidativo es determinante en muchos padecimientos, destacando en la DM (Wiernsperger, 2003), la HT (Briones & Touyz, 2010), el cáncer (Valko *et al.*, 2006), entre otros (Apéndice 4).

Para cada uno de los padecimientos mencionados, se tienen métodos farmacológicos de control, como: hipoglucemiantes orales, insulina, antihipertensivos, antineoplásicos, radioterapia, etc. (Osadebe *et al.*, 2004; Staffileno, 2005; OMS & UICC, 2005), pero también se presentan los métodos poco convencionales, dentro de estos métodos de control se encuentran los fitoterapéuticos en donde se hace uso de las plantas medicinales que tiene a su alcance el hombre (Anandharajan *et al.*, 2005; Alarcón *et al.*, 1998).

Actualmente en México se ha generado un vasto conocimiento sobre las propiedades preventivas y curativas de los vegetales, conocimiento invaluable que ha llevado al medio académico nacional e internacional a emprender el estudio multidisciplinario de los recursos vegetales del país, ya que las plantas medicinales continúan sirviendo como agentes terapéuticos tanto de la medicina moderna como en la tradicional. Además las dudas generadas recientemente acerca de la eficacia y seguridad de los fármacos actuales utilizados para el tratamiento de diversas enfermedades, ha promovido la búsqueda de estructuras más eficaces y con menos efectos secundarios, debido a que muchos fármacos producen reacciones adversas en su uso terapéutico, como: reacciones anafilácticas, prurito, entre otras reacciones de hipersensibilidad (David, 2002; Alarcón *et al.*, 1998).

Como se ha mencionado anteriormente, las plantas medicinales siguen formando la base común en el tratamiento de diversas enfermedades (Anandharajan *et al.*, 2005). Una de las plantas utilizadas particularmente en el control de la presión arterial (Rodríguez-Cruz *et al.*, 2003) y la DM (Espinoza-Aguilar, 2007; Anandharajan *et al.*, 2005) es el muérdago, esta planta pertenece a la familia de las Loranthaceas (Cetto-Andrade & Heinrich, 2005).

Las especies de esta familia son de hecho una de las familias endémicas del continente americano. Crecen desde México hasta Argentina y a la fecha, 14 especies han sido identificadas en México, siendo una de ellas *Psittacanthus calyculatus* (DC.) G. Don, llamada comúnmente “muérdago verdadero” (Rodríguez-Cruz, *et al.*, 2003) o “injerto de muérdago”. Esta planta es usada por sus propiedades hipoglucemiantes (Espinoza-Aguilar, 2007; Anandharajan *et al.*, 2005) en algunas regiones de México (Pérez, *et al.*, 1984).

*P. calyculatus* suele ser un arbusto pequeño rara vez terrestre, hemiparásito sobre dicotiledóneas leñosas. Se caracteriza por la presencia de ramas verdes quebradizas o a veces con ramificación dicotómica, tiene hojas simples, opuestas

rara vez alternas o verticiladas, con venación pinnada u oscura (Fig. 1) (Bello & Gutiérrez, 1985; Rzedowsky & Rzedowsky, 1985). Este tipo de hemiparásito en ocasiones provoca problemas económicos serios, principalmente cuando parasita o infesta plantaciones o sembradíos. La biología de estas plantas es interesante, por el desarrollo de estructuras llamadas haustorios que usan para parasitar a su hospedero y las semillas cubiertas por una materia gelatinosa y pegajosa que les permite adherirse casi a cualquier superficie (Smirnof, 2002).



Fig.1. Se muestra de manera esquemática la morfología que presenta *P. calyculatus*, junto con las estructuras que forman parte de ésta (Tomada de Bello & Gutiérrez, 1985).

*P. calyculatus*, ha sido utilizada a lo largo de Latinoamérica en la medicina tradicional (Serrato-Barajas, 1997), reconociendo las propiedades terapéuticas de esta planta incluidas la acción antitumoral (antineoplásica), inmunomoduladora, antiinflamatoria, antimicrobiana y sus resultados contra la hipertensión (Rodríguez-Cruz *et al.*, 2003); así como los efectos que contrarrestan los síntomas de la

diabetes y contra el cáncer, cuya forma de utilización para todos los padecimientos es en infusiones (Kafaru, 1993). De manera breve, Kafaru (1993) describe al muérdago como “hierba para todo propósito” debido a sus numerosos usos algunos de los cuales incluso han sido verificados (Obatomi, *et al.*, 1996; Obatomi, *et al.*, 1994), como los antes mencionados.

## **Justificación**

Las plantas son una fuente de nuevas moléculas con actividades biológicas y terapéuticas, que pueden ser más eficaces y con menos efectos adversos que los medicamentos actuales empleados en el tratamiento de la DM, la hipertensión y el cáncer.

A pesar de que se dispone de fármacos como la insulina, los hipoglucemiantes orales, los antihipertensores y antineoplásicos, no se ha desarrollado un tratamiento concreto y específico para cada uno de los padecimientos a tratar, que abarque efectivamente los aspectos relativos al costo, alcance y efectos colaterales. Así, la incorporación como agentes terapéuticos de nuevas drogas de origen natural ha ido en aumento y se siguen validando científicamente los usos medicinales de algunos productos vegetales de uso tradicional. En este concepto, los extractos vegetales son mezclas de moléculas tan específicas y complejas que han desafiado a la síntesis química. Esta complejidad de compuestos químicos presentes en las plantas es la que ha dado nuevo impulso a las exploraciones etnobotánicas encaminadas a la búsqueda de plantas medicinales con acción hipoglucemiante, antihipertensora y citotóxica.

Dado que los padecimientos antes mencionados (DM, HT y cáncer) son problemas de salud que involucran a todos los sectores sociales, toma importancia este proyecto ya que podrá contribuir al conocimiento de la especie, así como a validar su uso en la medicina tradicional de nuestro país; además de la búsqueda de compuestos de origen vegetal con diversas propiedades biológicas, que vean

la posibilidad de encontrar sustancias con mecanismos novedosos de acción que podrán utilizarse en la disección farmacológica de las vías metabólicas involucradas en el control de la hiperglucemia e hipertensión.

Debido a lo anterior, la pregunta científica fue: ¿Los extractos obtenidos de *P. calyculatus* presentan actividad hipotensora, hipoglucemiante, citotóxica y antioxidante? Entonces, se buscó evaluar estas propiedades para ampliar las posibilidades de encontrar drogas que sirvan de materia prima para el desarrollo de fármacos útiles en el tratamiento de la DM, HT y el cáncer.

**Hipótesis:**

- ❖ Existen antecedentes en la medicina tradicional del uso de *P. calyculatus* para el tratamiento de la diabetes y la hipertensión, así como antineoplásico; es probable que alguno de sus extractos presente actividad hipoglucemiante, hipotensora, citotóxica y antioxidante.

**Objetivo General:**

- ❖ Determinar algunas de las propiedades biológicas de *Psittacanthus calyculatus*.

**Objetivos Particulares:**

- ❖ Obtener extractos herbales de distinta polaridad a partir de las hojas de *P. calyculatus* mediante la técnica de percolación.
- ❖ Determinar de manera cualitativa la naturaleza química de los principales componentes de los extractos herbales.
- ❖ Determinar que extracto presenta mayor actividad hipotensora.
- ❖ Determinar que extracto presenta mayor actividad hipoglucemiante, mediante ensayos agudos y sub-crónicos.
- ❖ Determinar la actividad citotóxica en 3 líneas celulares de cáncer.
- ❖ Determinar la capacidad antioxidante media del extracto frente al radical DPPH.

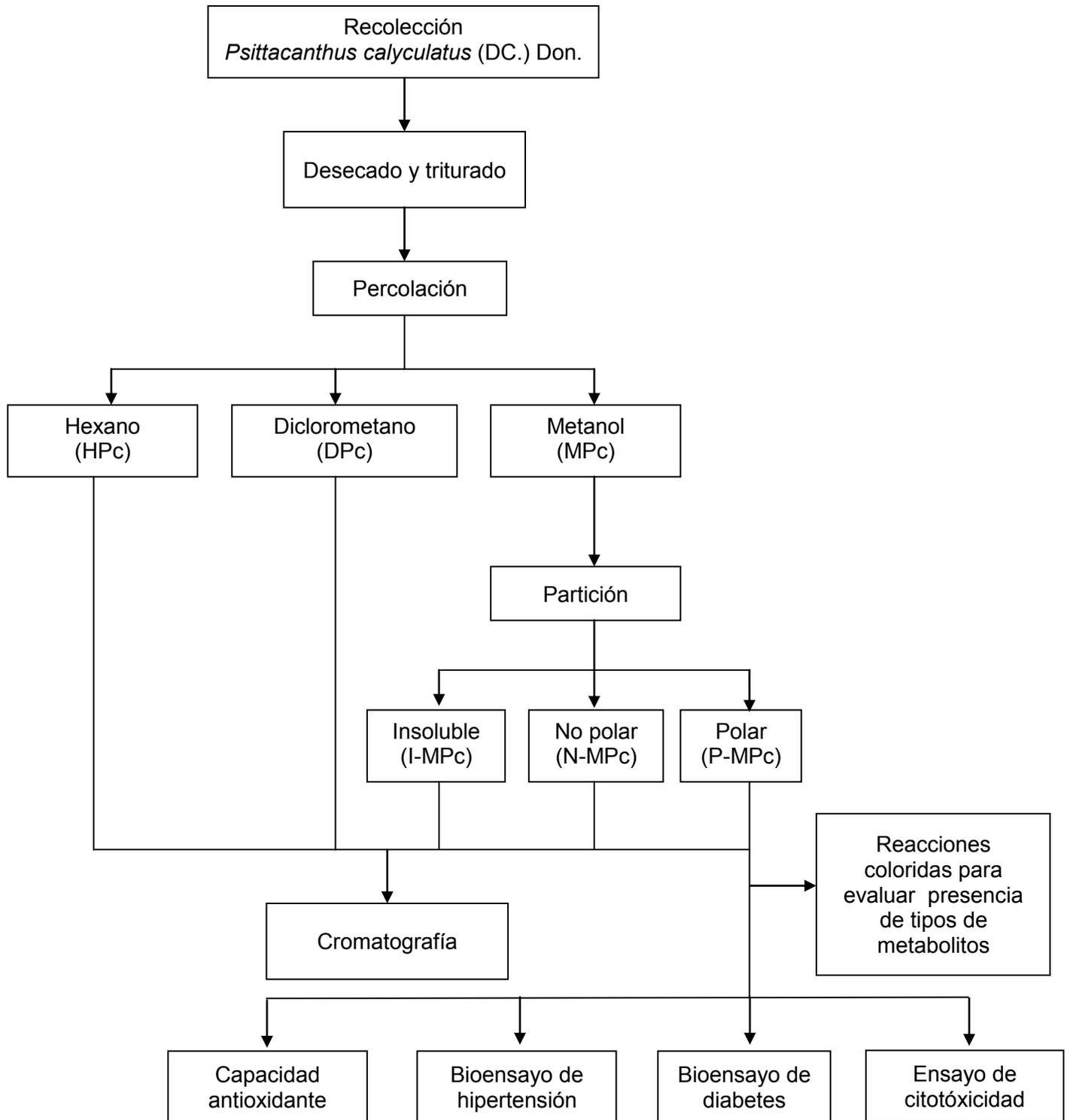


Fig. 2.- Diagrama de flujo que muestra la metodología usada para la evaluación de las propiedades biológicas de *Psittacanthus calyculatus*.

## Material y Método

Se procedió de acuerdo al diagrama de flujo descrito en la figura 2, durante el proceso de investigación se desarrollaron las siguientes técnicas:

- **Preparación del extracto**

De acuerdo al diagrama de flujo que describe la metodología (Fig. 2), los extractos se obtuvieron de la siguiente manera: se recolectó la planta hemiparásita *Psittacanthus calyculatus* (DC.) Don. que parasita a los mezquites (*Prosopis culiflora*) ubicados a un costado del km. 3 de la carretera Chupícuaro-Jerécuaro, en el estado de Guanajuato; que se localiza entre las coordenadas geográficas 100° 34' y 101° 00' de longitud oeste, y los 20° 13' y 19° 54' de latitud norte; se sitúa a una altura de 1,860 msnm, el tipo de suelo predominante es limo-arcilloso. De esta colecta se tomaron 100 g de hojas secas de la planta, para su posterior trituración. Se colocaron en una columna de percolación donde se agregaron solventes (1L) en orden creciente de polaridad (hexano, diclorometano y metanol) dejando reposar éstos durante 24 hrs y recuperando el volumen total cada 30 minutos, este proceso se repitió durante 5-7 días, para todos los solventes utilizados. Cada una de las soluciones obtenidas se filtró y posteriormente se concentró a presión reducida en rotavapor. Los extractos se colocaron en recipientes de vidrio para completar la evaporación del solvente a temperatura ambiente. El contenido sólido de cada extracto se calculó mediante diferencia de peso, entre el recipiente vacío y los sólidos; de esta manera se determinó el rendimiento de cada extracto por diferencia entre el peso de los mismos y el peso total de la planta utilizada.

Para la partición del extracto metanólico (MPc) se utilizó un embudo de separación en donde se colocó la solución metanólica del extracto y se le agregó hexano, de donde se obtuvo una parte polar (P-MPc), otra no polar (N-MPc) y una parte insoluble (I-MPc). Para la identificación de componentes de cada extracto se hicieron separaciones cromatográficas en capa fina con cromatofolios de sílica gel.

- **Determinación cualitativa de las sustancias presentes en el extracto**

Con la partición polar del extracto metanólico de *P. calyculatus* (P-MPc), se hicieron una serie de reacciones coloridas para la identificación de diferentes tipos de metabolitos secundarios como: alcaloides, esteroides y fenilpropanoides. Las reacciones que se realizaron fueron: adición de  $\text{FeCl}_3$ , exposición a vapores de amoníaco, prueba de Shinoda ( $\text{Mg} + \text{HCl}$ ), reacción de Molish ( $\text{H}_2\text{SO}_4 + \alpha$ -naftol) y reacción de Dimroth (ácido bórico + anhídrido acético), Dragendorff y Mayer (Dominguez, 1988).

- **Animales**

Para la evaluación de hipertensión se usaron ratas (*Ratus norvegicus*) machos SHR (Spontaneous Hypertensive Rats) de 6 mese de edad, cuyos pesos estaban entre 200 y 250 g y cuya presión arterial estuvo por encima de los valores 140/90 mmHg. En el caso de la evaluación de la actividad hipoglucemiante se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar, cuyos valores de peso oscilaron entre 200 y 250 g. Los animales fueron colocados en cajas de mantenimimientto a temperaturas que oscilan de 22° a 24 °C, con un ciclo regular de 12 hrs luz/12 hrs oscuridad y una humedad relativa del 40% - 60%. Las ratas (de ambos diseños experimentales) tuvieron libre acceso a comida y agua durante el transcurso de los bioensayos.

- **Bioensayos de Hipertensión**

Se realizaron bioensayos en donde se evaluaron las propiedades hipotensoras del extracto metanólico de *P. calyculatus*; para la evaluación de ésta actividad se usaron ratas SHR (n = 4). Fueron separadas en dos grupos: control y experimental, al primero se le administró por vía oral; mediante una sonda mezogástrica (SM), solamente agua y vehículo (Tween 20X, 10% v/v), mientras que al grupo experimental se le administró el extracto metanólico (MPc) a una dosis de 100 mg/Kg por la misma vía que al grupo control. Se tomó la presión arterial basal (sistólica/diastólica) y seguido de la administración del extracto, se realizaron mediciones a distintos tiempos (1 h, 3 h, 5 h y 8 h) (Vergara-Galicia, 2009).

La medición de la presión arterial se llevó a cabo en un cuarto cerrado a 25 ° C . Con la finalidad de dilatar las arterias y permitir un mejor flujo sanguíneo a través de la arteria caudal, los animales se colocaron en jaula provista de un sistema de calefacción que mantiene la temperatura interior entre 34 °C y 38 °C.

El sistema de registro (marca LETICIA, PanLAB, España) consta de un sensor de movimiento que capta el latido cardiaco y un manguillo de hule latex inflable, en donde se introduce la cola de la rata. El esfigomanómetro conectado al manguillo suministra la presión necesaria para que se infle rápidamente, obstruya la arteria caudal y posteriormente se desinfe de manera gradual y constante. Las señales provenientes del sensor y del esfigomanómetro son captadas simultáneamente por una computadora.

- **Inducción de la Diabetes**

La diabetes fue inducida por una sola administración de Streptozotocina (STZ, Sigma-Aldrich® Chem. Co.) solubilizada en buffer de citratos (0.1 M, pH: 4.5), a una dosis de 60 mg/Kg por vía intra peritoneal (i.p.). Cuarenta y ocho horas después de la administración de STZ, se midieron los niveles de glucosa en sangre, seleccionando para el bioensayo aquellas ratas que tuvieron valores superiores a 350 mg/dL y que aún se encontraban en un estado adecuado para realizar los experimentos (Rerup & Tarding, 1969).

- **Bioensayo diabetes**

Para la evaluación de las propiedades hipoglucemiantes se realizaron dos tipos de ensayos: agudo y subcrónico.

**a) Ensayo agudo**

En este ensayo (8 h), se utilizaron ratas previamente inducidas (con STZ) para diabetes ( $n = 18$ ). Éstas fueron separadas en cuatro grupos: control positivo, control negativo, grupo con fármaco y experimental. Al primero se le administró insulina recombinante de acción intermedia (NovoRapid®) por vía subcutánea (5 U/Kg). Al segundo se le administró agua y vehículo (Tween 20X, 10% v/v) por vía oral (5 mg/Kg) mediante SM. El grupo control con fármaco fue tratado con glibenclamida (Euglucon®) por vía oral (0.1 mg/Kg) mediante SM y finalmente el grupo experimental fue administrado con el extracto metanólico (P-MPc) a una dosis de 200 mg/Kg por la misma vía que el grupo control negativo. La glucosa sérica fue medida mediante tiras reactivas y glucómetro portátil (Roche®). Se realizó una medición basal de la concentración de glucosa en sangre y tras la administración se midieron los niveles de glucemia a distintos tiempos (1 h, 2 h, 4 h, 6h. y 8 h) reportando los cambios observados. Tras los bioensayos se procedió al tratamiento estadístico de los resultados, mediante una prueba de hipótesis pareadas ( $p \leq 0.05$ ).

**b) Ensayo subcrónico**

Estos ensayos siguieron la misma metodología que en el ensayo agudo, pero se extendió dicho procedimiento hasta 5 días consecutivos (8 h/día). Las dosis utilizadas para este ensayo fueron: 200 mg/Kg y 400 mg/Kg para el grupo experimental, realizando la administración cada 24 hrs (Ibañez-Camacho, 1983). Después de dichos bioensayos se procedió al tratamiento estadístico de los resultados, por medio de una prueba de hipótesis pareadas ( $p \leq 0.05$ ).

- **Ensayo de citotoxicidad**

Las líneas celulares que se utilizaron fueron: MCF-7 (cáncer de mama), HF-6 (cáncer de colon) y KB (cáncer nasofaríngeo). Se utilizaron cajas de cultivo T-25 que contuvieron a las células. Se lavó la capa celular con 10 ml de PBS estéril y se adicionaron 0.5 ml de tripsina. Se incubaron a 37 °C por 5 minutos para despegar la monocapa y separar las células (se monitoreó dicha separación en microscopio invertido). Se contaron las células en el microscopio invertido usando la cámara de Neubauer, haciendo un cálculo para obtener el número total de células en un mililitro de medio. Se calculó el volumen de suspensión celular requerido para resembrar 1.5 millones de células/ml. Se adicionó medio RMPI ajustado a un volumen de 15 mL. Se incubó a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad (Oyama & Eagle, 1956).

Tras observar un crecimiento celular a 60 – 70% de confluencia se procedió al ensayo en cajas de ELISA (96 pozos). Con una multipipeta se agregaron 190 µL de medio con células en cada pozo, dividiendo la caja según tratamiento, en controles, experimental y blanco, depositando en cada pozo 10 µL de la sustancia a evaluar. Las concentraciones del extracto metanólico utilizadas para las muestras experimentales fueron: 20 µg/mL, 4 µg/mL, 0.8 µg/mL y 0.16 µg/mL. Las concentraciones utilizadas para los controles positivos: elipticina, vinblastina y camptotecina (Sigma-Aldrich®) fueron: 2 µg/mL, 0.4 µg/mL, 0.08 µg/mL y 0.02 µg/mL.

Para la fijación celular se utilizó ácido tricloroacético al 30 %, aplicando 10 µL directamente en cada uno de los pozos en donde se encuentran las células tratadas, tras dejar que actúe por 30 minutos a 4 °C, se lavó intensamente de 2 a 3 veces con agua corriente fría, revisando que no queden restos de agua en los pozos. Para la tinción celular se utilizó sulfurodamina (SFM). Se aplicaron 100 µL de SFM a cada pozo previamente fijado, se dejaron reposar por 10 minutos a

temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo se enjuagaron las placas de ELISA con ácido acético al 30%.

Se determinaron los valores de actividad mediante la lectura de absorbancia obtenida con cada uno de los tratamientos y el día cero (Densidad óptica, DO). Para esto, a las placas previamente teñidas con SFM, se les agregaron 190 µL de DMSO al 10%.y se leyó la absorbancia (DO) en un lector de ELISA. Se calculó en porcentaje de crecimiento con la siguiente ecuación (Popoca, *et al.*, 1998; Hernández, *et al.*, 1999):

$$\% \text{ de crecimiento} = \frac{\text{DO (células + muestra)} - \text{DO (día cero)}}{\text{DO (células + DMSO 10\%)} - \text{DO (día cero)}} \times 100$$

Para determinar los valores de DE<sub>50</sub> se utilizó el análisis de regresión lineal mediante el ajuste de rectas de la forma  $y=mx+b$  (Oda, 2005), graficando el % de crecimiento contra el logaritmo de las concentraciones evaluadas en los controles y grupo experimental.

De acuerdo a las guías instauradas por el Instituto Nacional de Cáncer (EUA), se considera activo al compuesto, si los valores de DE<sub>50</sub> están dentro de los siguientes rangos (Suffness & Pezzuto, 1991):

Para extractos \_\_\_\_\_ DE<sub>50</sub> < 20 µg/mL

Para compuestos puros \_\_\_\_\_ DE<sub>50</sub> < 5µg/mL

- **Ensayo con DPPH**

La capacidad para atrapar radicales libres de los extractos se determinó midiendo el grado de decoloración de una solución metanólica de difenil-picril-hidracilo (DPPH, Sigma D-9132) al 0.2%. El DPPH en su forma radical (DPPH<sup>·</sup>) tiene un máximo de absorción a los 517 nm, cuando es reducido por un compuesto antioxidante la coloración desaparece, decrementando con ello su absorbancia.

El extracto metanólico se evaluó a diferentes concentraciones (5, 10, 20, 40, 80 y 160 ppm). Como controles positivos se usaron ácido ascórbico y tocoferol en las mismas concentraciones que los problemas. Como blanco se utilizó metanol. El porcentaje de decoloración se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación (Joyeux *et al.*, 1995; Mathiesen *et al.*, 1995):

$$\% \text{ de decoloración} = 1 - \frac{\text{Absorbancia problema}}{\text{Absorbancia del blanco}}$$

Para la determinación de la capacidad antioxidante media (CA<sub>50</sub>) se utilizó el análisis de regresión con la relación potencial de la forma  $y=ax^n$  (Oda, 2005), graficando el porcentaje de decoloración contra las concentraciones evaluadas (en ppm).

## Resultados y Discusión

### 1.- Datos generales de la planta

De acuerdo a la investigación bibliográfica y etnobotánica, la planta se describe como lo muestra la tabla 1 y la figura 1.

<b>Familia</b>	Loranthaceae.
<b>Nombre científico</b>	<i>Psittacanthus calyculatus</i> (DC.) Don.
<b>Nombre común</b>	Injerto de muérdago o Muérdago verdadero.
<b>Parte utilizada</b>	Hojas y ramas.
<b>Forma de vida</b>	Hemiparásita
<b>Forma de utilización</b>	Té o Infusión.
<b>Padecimientos tratados</b>	Hipertensión, diabetes y cáncer.

Tabla 1.- Ficha de datos generales de la planta.



Fig. 3. Se muestra el aspecto que presenta *P. calyculatus* de manera aislada, sus hojas y frutos (izq.) y como hemiparásita de algunas especies de *Quercus* sp. (der.).

De acuerdo a lo descrito en la tabla 1, las características morfológicas y las actividades biológicas de *P. calyculatus* coinciden con los datos ya reportados por otros autores (Anandharajan *et al.*, 2005; Rodríguez-Cruz *et al.*, 2003; Kafaru, 1993).

A nivel de inventario se ubica a la planta dentro de la familia de las Lorantaceas, cuyo rasgo representativo es su forma de vida: hemiparásita (Solis-Gracia & Gómez-Sánchez, 2007; García-Regalado, 1998). Esta forma de vida es de hecho una manera en que los pobladores identifican a la planta, sobre todo por el hospedero que utilizan; además de fijarse en la morfología de las hojas y sobre todo en las flores y frutos de la misma (Linares *et al.*, 1999; Kafaru, 1993; Gutierrez, 1986).

La forma de uso hace alusión a la vía de administración por la cual el extracto es utilizado en las comunidades donde es conocida la planta (Linares *et al.*, 1999; Nice, 1993), es de hecho la vía oral la manera en que fueron realizadas las diversas formas de administración en los ensayos *in vivo* intentando imitar la forma en que es utilizada la planta.

## **2.- Rendimientos obtenidos**

En relación a la extracción de los diversos compuestos de *P. calyculatus*, se obtuvieron los rendimientos descritos en la Gráfica 1. Se destaca mayoritariamente el extracto metanólico (18.9 %) del hexánico (3.8 %), o aquel de diclorometano (4.03 %). Tras la partición del extracto metanólico (MPc) con hexano, se obtuvieron 2 fases: la no polar (N-MPc) y la polar (P-MPc), destacando nuevamente la parte polar con el mayor rendimiento (9.10%)

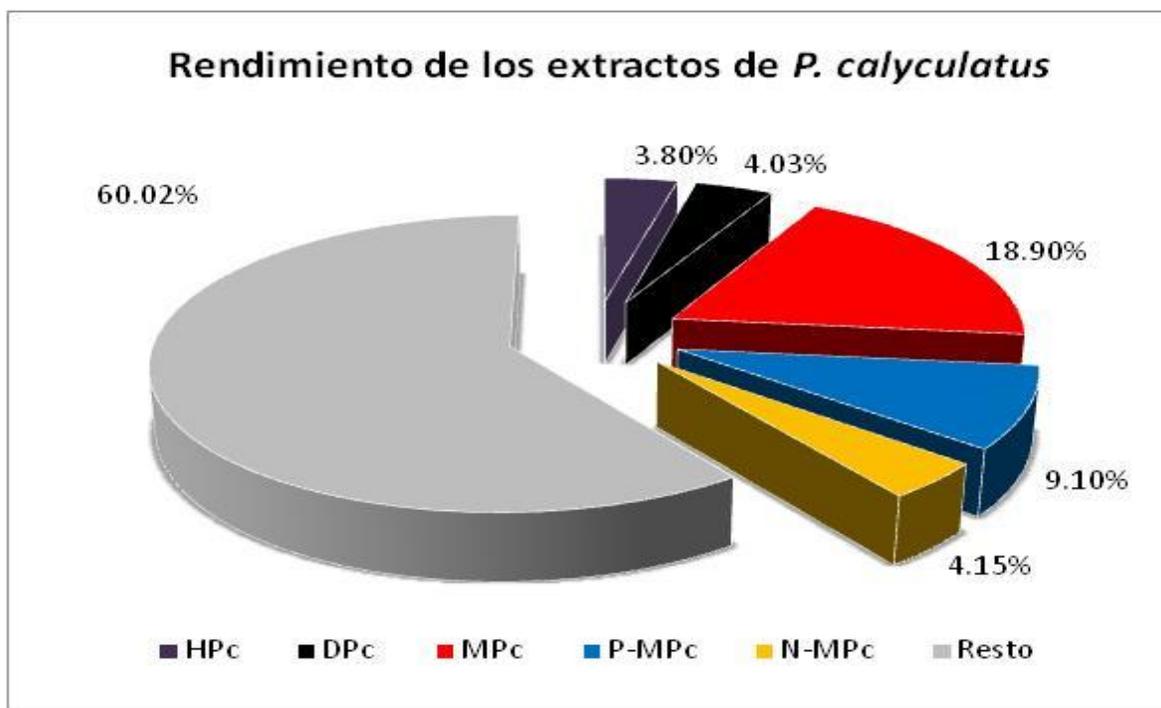


Fig. 4.- Representa los rendimientos (en porcentaje) obtenidos para los extracto de *P. calyculatus*, mismo que fue calculado a partir de 100 g de hojas.

Tal como se observa en la Figura 4 el mayor rendimiento está registrado en las fracciones extraídas con metanol, por ello es posible afirmar que los compuestos polares son mayoritarios en *P. calyculatus* (Harvey, 2007). En este sentido podemos suponer que algunos de los metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico pudieran ser: metabolitos con grupos hidroxilo o glicósidos de fenilpropanoides, lignanos, cumarinas, taninos, entre otros (Croteau, 2000; Graziano, *et al.*, 1967).

### 3.- Reacciones coloridas

Para la caracterización cualitativa de los metabolitos secundarios se realizaron las pruebas de identificación descritas en la metodología, obteniendo así los resultados observados en la tabla 2. En el extracto metanólico de *P. calyculatus* se observa la presencia de fenilpropanoides, en donde destacan resultados positivos para flavonoides y flavonas, así como glucósidos; pudiendo ver un resultado negativo para alcaloides.

Reacción	Resultado
FeCl <sub>3</sub>	Positivo para fenilpropanoides (precipitado, color azul marino)
Vapor de amoniaco	Positivo, presencia de flavonas o flavonoles (coloración amarilla)
Prueba Shinoa	Positivo, presencia de flavonas (coloración anaranjada)
Prueba de Molish	Positivo, presencia de glucósidos (formación de anillo morado)
Reacción de Dimroth	Positivo, presencia de taninos (ligera precipitación naranja)
Reactivo de Dragendorft	Negativo para alcaloides (sin precipitación)
Reacción de Mayer	Negativo para alcaloides

Tabla 2.- Resultados de las pruebas coloridas para la identificación cualitativa.

Como se observa en la Tabla 2, los compuestos que se identificaron con base al método, son los flavonoides y fenilpropanoides destacando el hecho de que son un grupo de compuestos polifenólicos diverso en estructura química y características, que se producen de forma natural en frutas, verduras, semillas, flores y corteza, éstas son una parte integral de la dieta humana. Se ha reportado que exhiben una amplia gama de propiedades biológicas, incluida la antibacteriana, antiviral, antiinflamatoria, antialérgica y acciones vasodilatadoras (Cook & Samman, 1996). Estos metabolitos secundarios se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas, encontrándolos inclusive en talofitas – como musgos–, en casi todas las familias de plantas superiores e incluso en otros organismos (Romo de Vivar, 2006). Es entonces evidente que *P. calyculatus* tenía grandes posibilidades de presentar estos compuestos, tanto por lo antes mencionado como por su forma de vida, en donde la planta requiere presentar ciertos mecanismos de defensa y ataque (Gutierrez, 1986).

Las diferentes formas en que podemos hallar a los flavonoides, hacen alusión a su ruta de biosíntesis, pero aunado a ello está la necesidad que presenta la planta de sintetizarlos y almacenarlos, éstos generalmente se encuentran como O-glicósidos en su fuente natural, aunque también como agliconas o como C-glicósidos (Céspedes-Acuña & Reyes-Chilpa, 2006), esto es evidente puesto que en el caso del extracto de *P. calyculatus* una de las reacciones coloridas (reacción de Molish) para identificación cualitativa fue positiva para la presencia de glucósidos (Domínguez, 1988).

Los alcaloides como un grupo de sustancias orgánicas nitrogenadas se encuentran principalmente en vegetales, aunque también a baja escala en otros organismos. Debido a que la mayoría posee alguna actividad fisiológica, ya sea curativa o tóxica, las plantas que los contiene han sido utilizadas bajo esta cualidad (Céspedes-Acuña, & Reyes-Chilpa, 2006). Sin embargo, las reacciones coloridas realizadas al extracto metanólico de *P. calyculatus* no revelaron la presencia de alcaloides, tal es el caso de la adición de reactivo de Mayer y

Drangendorft (Domínguez, 1988); esto puede deberse al escaso contenido de alcaloides presentes en el extracto (en trazas) lo que hizo poco evidente su presencia o en todo caso no los contenía. Esta última afirmación es radical y no debe tenerse tal grado de certeza, ya que así como otros metabolitos secundarios, los alcaloides también forman parte del metaboloma común en plantas y se han descrito en muchas familias (Jorgensen *et al.*, 2005; Srere, 1985), evidentemente sólo se puede sugerir que la concentración de alcaloides está en trazas y por eso dichas reacciones no resultaron positivas.

#### 4.- Bioensayo de Hipertensión

Para el bioensayo de hipertensión se realizaron mediciones a distintos tiempos como lo describe la metodología, en donde se obtuvieron los resultados descritos en la tabla 3 para presión arterial sistólica y en la tabla 4 para presión arterial diastólica. En ninguna de las dos categorías se observa diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre las muestras a diferentes tiempos, para las ratas SHR tratadas con el extracto metanólico de *P. calyculatus* (Fig. 5).

	<b>Basal</b>	<b>1 h</b>	<b>3 h</b>	<b>5 h</b>	<b>8 h</b>
<b>Rata 1</b>	151.30	163.60	156.00	176.60	173.00
<b>Rata 2</b>	168.00	158.60	155.75	176.60	164.00
<b>Rata 3</b>	124.30	148.75	127.25	116.75	107.00
<b>Rata 4</b>	142.00	126.66	115.75	104.33	114.50
<b>Promedios</b>	146.40 ± 18.24	149.40 ± 16.36	138.68 ± 20.39	143.57 ± 38.47	139.62 ± 33.68

Tabla 3.- Mediciones obtenidas para la presión arterial sistólica, representadas en mmHg

	<b>Basal</b>	<b>1 h</b>	<b>3 h</b>	<b>5 h</b>	<b>8 h</b>
<b>Rata 1</b>	127.30	118.60	137.16	149.00	129.00
<b>Rata 2</b>	140.00	127.00	136.50	131.00	119.50
<b>Rata 3</b>	93.60	122.00	114.00	101.50	92.66
<b>Rata 4</b>	100.50	113.00	90.00	86.00	88.75
<b>Promedios</b>	115.35 ± 21.93	120.15 ± 5.88	119.41 ± 22.30	116.87 ± 28.40	107.47 ± 19.81

Tabla 4.- Mediciones obtenidas para la presión arterial diastólica, representadas en mmHg.

Sabiendo que la hipertensión es un factor de riesgo relativo al sistema circulatorio y que su alta incidencia la ha convertido en un problema de salud pública es que cobran importancias las investigaciones que al respecto se produzcan y sobre todo aquellas que tengan que ver con su profilaxis y tratamiento (Ogihara, 2005).

Los estudios etnobotánicos referidos a la hipertensión no son escasos y de hecho se tiene una amplia gama de los mismos (Harvey, 2007; Fabricant & Farnsworth, 2001), sin embargo no todos son avalados con bases científicas y en modelos vivos, de hecho la gran mayoría se realizan en modelos *in situ* o *in vitro* (Vergara-Galicia *et al.*, 2009; Rodríguez-Cruz, *et al.*, 2003; Serrato-Barajas, 1997; Winterferld & Dorle, 1992); esto lleva a recapitular la forma en que las estrategias metodológicas deben realizarse para comprobar el uso de una especie vegetal con base a la forma en que es utilizada en una comunidad, de donde se extrajo el conocimiento étnico relativo a la planta en cuestión.

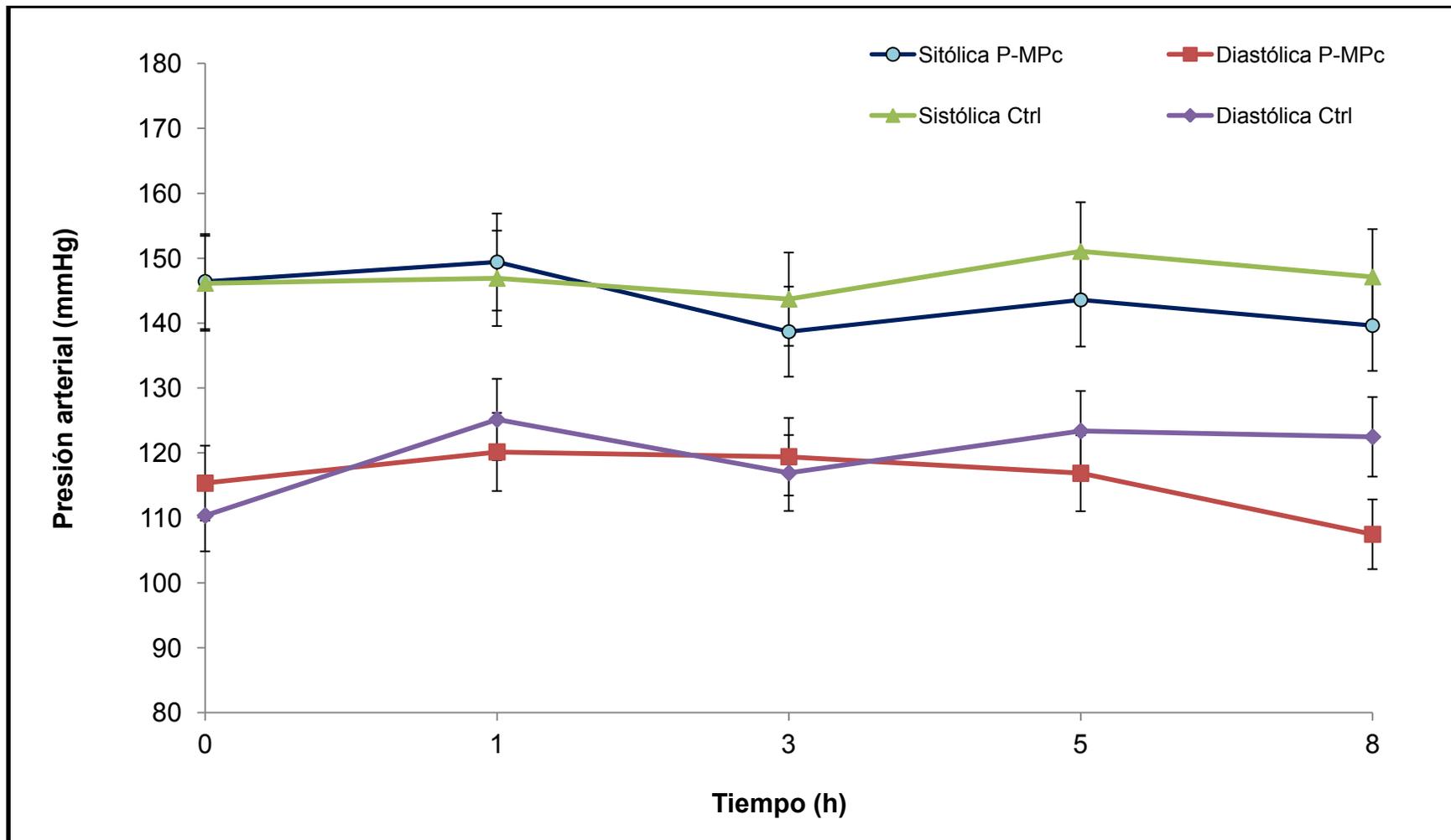


Figura 5.- Medidas observadas para la presión arterial sistólica y diastólica (expresada en mmHg) de ratas SHR. Cada punto representa la media  $\pm$  eem; n=4.

Ahora bien, relativo a los resultados obtenidos para el bioensayo de hipertensión (Tabla 3 y 4), se observa claramente que no se encontraron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) a los distintos tiempos después de la administración del extracto metanólico de *P. calyculatus* (100 mg/Kg), ni en la presión sistólica, ni en la diastólica (Figura 5).

Estos resultados satisfacen la necesidad de comprobación de actividad hipotensora por parte de *P. calyculatus*, ya que si bien se reporta este tipo de actividad, algunos de los estudios se realizan en anillos aórticos de rata en donde se comprueba que la acción hipotensora del extracto es dependiente del endotelio (Rodríguez-Cruz, 2003).

Sin embargo, al no existir pruebas concluyentes en modelos *in vivo* podemos plantear otros motivos para el hecho de no presentar actividad hipotensora, una de las primeras razones que se tiene que resolver es relativo a la vía por la cual fue administrado el extracto –vía oral-; si bien, es una de las formas de administración más sencillas y prácticas, presenta diversas desventajas en un organismo eugástrico (Solomon et al., 2008) como lo es el modelo murino SHR.

El primer problema al que se enfrenta una molécula al ingresar al estómago es la presencia del ácido gástrico (HCl) y sus diversas enzimas. De hecho muchos principios activos pierden su “efecto” en este primer evento derivado de la digestión, puesto que se hidrolizan por la acción de las enzimas y el HCl; así pues, aquellas moléculas que conservan sus propiedades y estructura deben circular hacia el hígado mediante el sistema porta hepático en donde pueden sufrir una biotransformación que puede dejar sin actividad alguna, que de hecho es lo que ocurre con los fármacos denominados de primer paso (Vázquez et al., 2009)

Si bien es cierto también, que muchas moléculas al ser biotransformadas adquieren efectos tóxicos para el organismo (Goodman & Gilman, 1996), difícilmente se le atribuye esta adquisición de actividad a los metabolitos

secundarios contenidos en el extracto metanólico de *P. calyculatus*, puesto que para llegar a esta conclusión haría falta hacer otro tipo de estudios que comprobasen esta teoría; sin embargo, se descarta la posibilidad de ser tan nocivo que como efecto secundario de su biotransformación llegue a provocar la muerte, ya que esto no fue observado en ninguno de los bioensayos realizados al evaluar el efecto hipotensor.

Otro de los motivos al cual se le puede atribuir la nulidad del efecto hipotensor, es la falta o escases del metabolito secundario responsable de esta actividad biológica (Vázquez *et al.*, 2009). Puede suceder que durante la extracción diferenciada como lo es la percolación los metabolitos secundarios queden separados en los diversos solventes, entonces se podría suponer que la molécula de interés no se encontraba en el extracto metanólico o quedó en trazas dentro del mismo, con lo que la concentración requerida para ejercer un efecto hipotensor no pudo ser alcanzada dentro del organismo en el que se evaluó, incluso pudiese haber quedado en otra de las fracciones con lo que restaría probar éstas y descartar esta posibilidad.

Evidentemente pueden existir otras posibilidades para explicar el por que de la falta en el efecto hipotensor, ya que cada razón hace alusión a un evento fisiológico distinto y a la metodología seguida; sin embargo, cabe destacar que el registro etnobotánico refiere el uso en Té o infusión de *P. calyculatus* (Anandharajan *et al.*, 2005; Rodriguez-Cruz, 2003) y es aquí donde surgen nuevas incógnitas, puesto que esa vía es por la cual ejerce su efecto y es la misma vía por la cual se administró el extracto, entonces la perspectiva para este trabajo se debe guiar por 3 líneas: una en donde se prueben de la misma manera los demás extractos obtenidos (diclorometano y hexano), la segunda que haga referencia al tipo de metabolitos secundarios que se encuentren en los extractos y una tercera que tome en cuenta los efectos relativos a la biotrasformación y biodisponibilidad.

### 5.- Bioensayo de Diabetes (Agudo)

Para el bioensayo agudo de diabetes se realizaron mediciones a distintos tiempos como lo describe la metodología, en donde se obtuvieron los resultados descritos en las tablas 5 y 6, para los dos grupos que se tuvieron: experimental y control negativo respectivamente. Se observan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el grupo experimental y el control, así como la reducción de la glucemia a partir de las 6 horas obteniendo la menor concentración de glucosa sérica a las 8 horas después de la administración del extracto metanólico de *P. calyculatus*.

	Basal	1 h	2 h	4 h	6 h	8 h
<b>Rata 1</b>	600	600	585	569	390	360
<b>Rata 2</b>	500	500	539	543	410	400
<b>Rata 3</b>	540	600	536	545	428	350
<b>Promedio</b>	546.7 ± 25.16	566.7 ± 28.86	553.3 ± 13.73	552.3 ± 7.23	409.3 ± 9.05	370.0 ± 13.22

Tabla 5.- Mediciones obtenidas para los niveles de glucosa (representadas en mg/dL) del grupo experimental (Extracto P-MPc a 200mg/Kg).

	Basal	1 h	2 h	4 h	6 h	8 h
<b>Rata 4</b>	572	540	600	558	531	558
<b>Rata 5</b>	432	438	446	374	393	390
<b>Rata 6</b>	480	430	444	600	600	600
<b>Promedio</b>	494.7 ± 35.57	469.3 ± 30.66	496.7 ± 44.74	510.7 ± 60.10	508.0 ± 52.69	516.0 ± 50.02

Tabla 6.- Mediciones obtenidas para los niveles de glucosa (representadas en mg/dL) del grupo control negativo (vehículo).

Se obtuvieron los resultados descritos en las tablas 7 y 8, para el grupo control positivo (Insulina) y el grupo tratado con fármaco (Glibenclamida). Se observan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el grupo control positivo y el tratado con fármaco, mientras que éste último no presenta diferencia con respecto al control negativo.

	<b>Basal</b>	<b>1 h</b>	<b>2 h</b>	<b>4 h</b>	<b>6 h</b>	<b>8 h</b>
<b>Rata 7</b>	558	381	366	218	260	289
<b>Rata 8</b>	600	281	212	197	208	298
<b>Rata 9</b>	421	268	257	182	219	282
<b>Rata 10</b>	413	85	82	59	87	237
<b>Promedio</b>	498 ± 47.57	253.75 ± 61.60	229.25 ± 48.03	164 ± 35.77	193.5 ± 37.22	276.50 ± 13.56

Tabla 7.- Mediciones obtenidas para los niveles de glucosa (representadas en mg/dL) del grupo control positivo (Insulina, 5U/kg)

	<b>Basal</b>	<b>1 h</b>	<b>2 h</b>	<b>4 h</b>	<b>6 h</b>	<b>8 h</b>
<b>Rata 11</b>	560	540	580	558	531	540
<b>Rata 12</b>	432	438	446	374	393	386
<b>Rata 13</b>	480	430	444	520	535	560
<b>Rata 14</b>	450	455	447	440	432	428
<b>Rata 15</b>	490	496	510	480	480	495
<b>Promedio</b>	482.4 ± 24.59	481.8 ± 22.92	485.4 ± 22.89	474.4 ± 35.67	474.2 ± 30.95	481.8 ± 36.86

Tabla 8.- Mediciones obtenidas para los niveles de glucosa (representadas en mg/dL) del grupo tratado con fármaco (Glibenclamida)

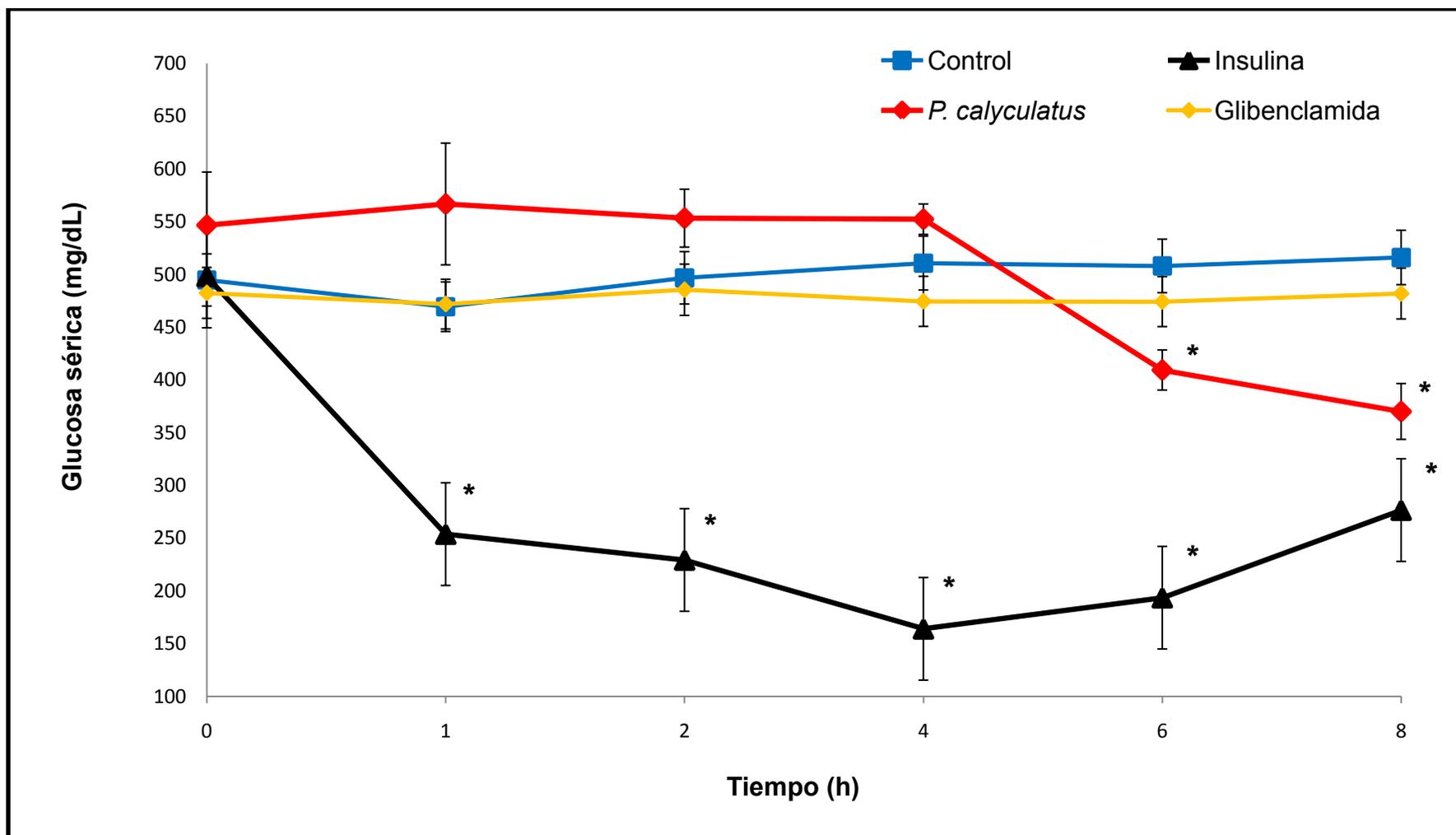


Fig. 6.- Niveles de glucosa en sangre de ratas diabéticas (inducidas con STZ) tratadas con el extracto metanólico *P. calyculatus* (grupo experimental), así como aquellas que sirvieron como controles (insulina, glibenclamida y vehículo). Cada punto representa la media  $\pm$  eem; (\*  $p \leq 0.05$ ).

Se pueden observar de manera clara (Figura 6) las diferencias que existen entre los grupos control y el grupo experimental (*P. calyculatus*). Mientras que el grupo tratado con insulina, debido al descenso que produjo de la glucemia, se encuentra marcadamente separado de los demás, también se puede notar que el grupo tratado con glibenclamida no presenta diferencias con respecto al control negativo. Sin embargo, el grupo al que se administró el extracto metanólico de *P. calyculatus* si presentó diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) tanto con el grupo control negativo como con el grupo tratado con el fármaco, a partir de las 6 hrs.

Ahora bien, entrando en el entendido de que alrededor del 8% de las personas adultas en México padecen diabetes y la cuarta parte de los individuos afectados no sabe que sufre este trastorno. Lo anterior es una de las razones por lo que actualmente la diabetes se ha consolidado como una de las primeras causas de decesos en México, ocasionando el 12% de las muertes de todo el país (Secretaría de Salud México, 2007); esto repercute hoy en día en la necesidad de búsqueda de nuevas alternativas en el tratamiento de la DM con lo que se recurre a las plantas y principalmente a realizar una investigación cada vez más minuciosa de compuestos puros; ya sea para encontrar sustancias que tengan mayor efecto y menor costo o simplemente como una ayuda al tratamiento de control con fármacos que actualmente se conoce (Goodman & Gilman, 1996).

Dado lo anterior, se realizó este estudio, para poder aportar mayor conocimiento al tratamiento de la DM con plantas medicinales utilizadas para este padecimiento, en exclusiva refiriéndose al enriquecimiento del conocimiento científico relativo a *P. calyculatus*. Cabe mencionar que la planta que se evaluó es usada empíricamente en nuestro país. Además, en otras partes del mundo, especies de esta familia -Loranthaceae- ya han tenido estudios para corroborar su efecto hipoglucemiante (Espinoza-Aguilar, 2007; Cetto-Andrade & Heinrich, 2005; Obatomi *et al.*, 2004; Alarcon *et al.*, 1998) o hipotensor (Aguirre-Crespo *et al.*, 2005; Rodríguez-Cruz *et al.*, 2003; Obatomi, *et al.*, 1996).

Algunas de las plantas que se conocen desde hace tiempo por su uso empírico para el tratamiento de la DM y que no existen estudios científicos serios que validen su acción, así como aquellas de las que se redescubren sus propiedades hipoglucemiantes, como el nopal y la sábila; entre otras, pueden ser objeto de estudios etnobotánicos y más adelante validar su uso ayudados de otras disciplinas, con lo que nos permitan saber la utilización popular de las plantas que existen en nuestro país y así posteriormente pueden realizarse estudios farmacológicos para poder evaluar y validar su eficiencia terapéutica; estudios fitoquímicos para conocer sus componentes activos y realizar también ensayos toxicológicos que permitan vislumbrar si la planta es inocua o si tiene efectos secundarios que pudiera causar algún daño en el organismo del paciente (Cetto-Andrade & Heinrich, 2005).

Para validar el efecto de *Psittacanthus calyculatus* se eligieron animales de experimentación (*Ratus norvegicus* cepa Wistar) con glucemias normales, la hiperglucemia fue inducida con estreptozotocina (60 mg/kg), logrando una diabetes experimental con valores de: 432 a 600 mg/dL., los cuales podrían ser observados en un paciente con DM en etapa muy avanzada (López-Candales, 2001).

En el bioensayo agudo realizado se comprobó el efecto hipoglucemiante de *P. calyculatus* ya que el extracto metanólico polar (P-MPc) redujo los niveles de glucemia en el grupo experimental (dosis de: 200 mg/Kg) de  $546.7 \pm 50.33$  a  $370 \pm 26.45$  mg/dL. a las 8 hrs de la administración del extracto (P-MPc). Esto es referido como el hecho de presentar una reducción de la glucemia del 32.32%. Esta afirmación es debida al hecho de presentar diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto a los grupos control negativo y control con fármaco.

Es evidente (Figura 6) la reducción que se observa entre el grupo experimental y los grupos control mencionados, de hecho la diferencia más evidente se puede observar a las 6 y 8 horas después de la administración; sin embargo, hay una

diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) considerable con respecto al control positivo (insulina). En este caso observamos que la insulina pudo reducir a niveles a un mas bajos la glucemia de las ratas diabéticas, observando el punto de mayor reducción a las 4 horas después de la administración. Con este resultado debemos retomar el hecho de que a la dosis empleada de estreptozotocina (60 mg/Kg) se obtiene un modelo de diabetes mellitus 1 (autoinmune o insulín dependiente) (WHO, 1999; Rerup & Tardin, 1960) y es de hecho que para este tipo de padecimiento se indica la utilización de la insulina recombinante como método de control, por tanto, no es extraño que haya habido tal grado de reducción de la glucemia, muy por debajo de los niveles que logró el extracto y en menor tiempo.

Por otra parte se hace referencia al uso de fármacos hipoglucemiantes, como la glibenclamida, dicho fármaco pertenece al grupo de las sulfonilureas, es utilizado como estimulador de las células beta pancreáticas para producir insulina. Este medicamento está indicado en pacientes con diabetes mellitus 2, en donde aun existen células que puedan producir insulina (Goodman & Gilman, 1996). He aquí una de las razones por las que dicho fármaco no presentó ningún efecto sobre el modelo biológico utilizado, sin presentar diferencias significativas con respecto al control negativo.

El uso de los controles antes mencionados (glibenclamida e insulina) nos da una fuerte idea del tipo de diabetes que estamos induciendo, así de acuerdo a la posible reacción que se obtenga utilizándolos, se corrobora el tipo de Diabetes con que se esta trabajando (WHO, 1999; Rerup & Tarding, 1960), que en este caso fue evidenciada como Diabetes Mellitus tipo 1.

Con base a la evidencia experimental se determinó la necesidad de realizar un ensayo sub-crónico que revelara a largo plazo la acción del extracto de *P. calyculatus*.

## 6.- Bioensayo de Diabetes (Sub-crónico)

Para los bioensayos sub-crónicos de diabetes se realizaron mediciones a distintos tiempos y durante 5 días tal como lo describe la metodología. Se realizó un ensayo con dosis similar a la que se utilizó en el ensayo agudo y otro en el que se duplicó la dosis. En el ensayo con 200 mg/kg se obtuvieron los resultados descritos en la tabla 9, mientras que la tabla 10 describe los resultados obtenidos a dosis de 400 mg/Kg, para los grupos experimental y control respectivamente.

Se pudo comprobar que a la dosis de 200 mg/Kg existe un descenso en la glucosa sérica del grupo experimental respecto al tiempo, éste se presenta de las 2 o 4 horas (dependiendo el día) en adelante, observando diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al control, a partir de las 6 horas. Se obtuvo el descenso máximo perceptible cada 8 horas después de la administración del extracto; sin embargo, hay un aumento en la glucemia cada 24 horas. De igual manera se observa que la glucemia disminuye progresivamente conforme transcurre el tiempo del bioensayo (Figura 7).

Hrs	Día 1						Día 2			
	0	2	4	6	8	24	26	28	32	
Control	584.8	585	587	582	586	589.2	592	600	595	
Experimental	593.5	578	568	566	565	600	598	554	545	

48	Día 3				Día 4				Día 5			
	50	52	56	72	74	76	80	96	98	100	104	
580.4	580	596	600	584.6	588	597	599	592.6	596	598	599	
567.8	569	553	537	589.7	555	537	521	587.2	558	539	515	

Tabla 9.- Mediciones obtenidas para los niveles de glucosa en sangre (representadas en mg/dL) del grupo experimental tratado con el extracto metanólico de *P. calyculatus* (200 mg/Kg) y el grupo control negativo.

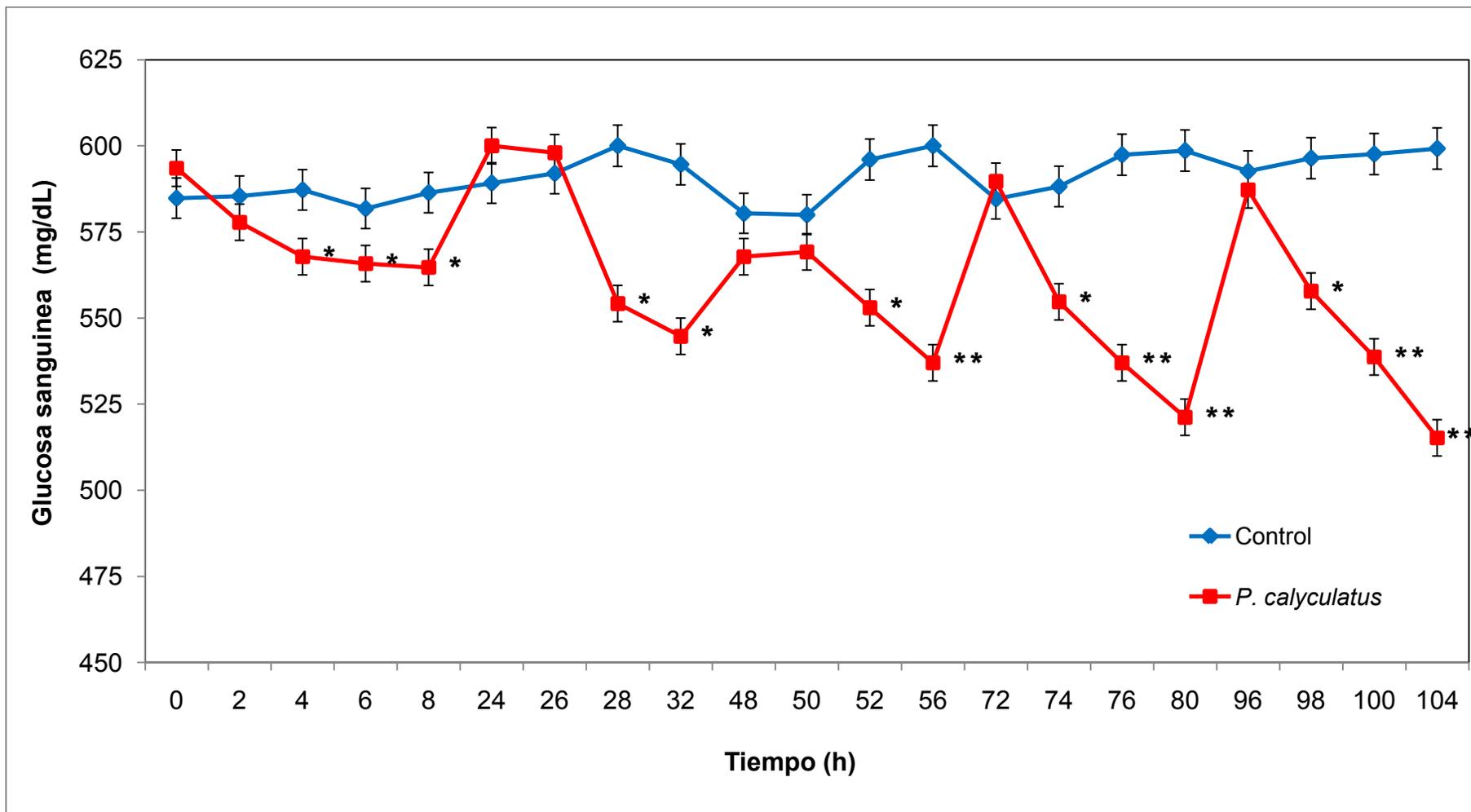


Fig. 7.- Niveles de glucosa en sangre de ratas diabéticas tratadas con el extracto metanólico de *P. calyculatus* (grupo experimental), así como del grupo control negativo. La administración en este caso fue 200 mg/Kg. Cada punto representa la media  $\pm$  eem; n= 6 (\* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ ).

Hrs	Día 1						Día 2						
	0	2	547.5	6	8	24	26	28	30	32	48		
Control	481.2	477.0	498.2	477.8	491.2	521.7	561.7	545.0	544.7	546.5	547.5		
Experimental	496.2	472.8	48	405.2	414.8	504.0	463.2	419.5	390.2	389.2	498.2		
Día 3													
Día 3			Día 4				Día 5						
50	52	54	56	72	74	76	78	80	96	98	100	102	104
548.7	555.7	551.7	553.8	547.8	550.5	550.2	553.3	557.3	548.8	555.7	552.0	555.5	561.8
441.8	417.0	396.0	388.5	397.7	453.3	387.2	379.3	336.7	479.8	419.2	389.2	340.2	338.8

Tabla 10.- Mediciones obtenidas para los niveles de glucosa sérica (representadas en mg/dL) del grupo experimental, tratado con el extracto metanólico de *P. calyculatus* (400 mg/Kg) y el grupo control negativo

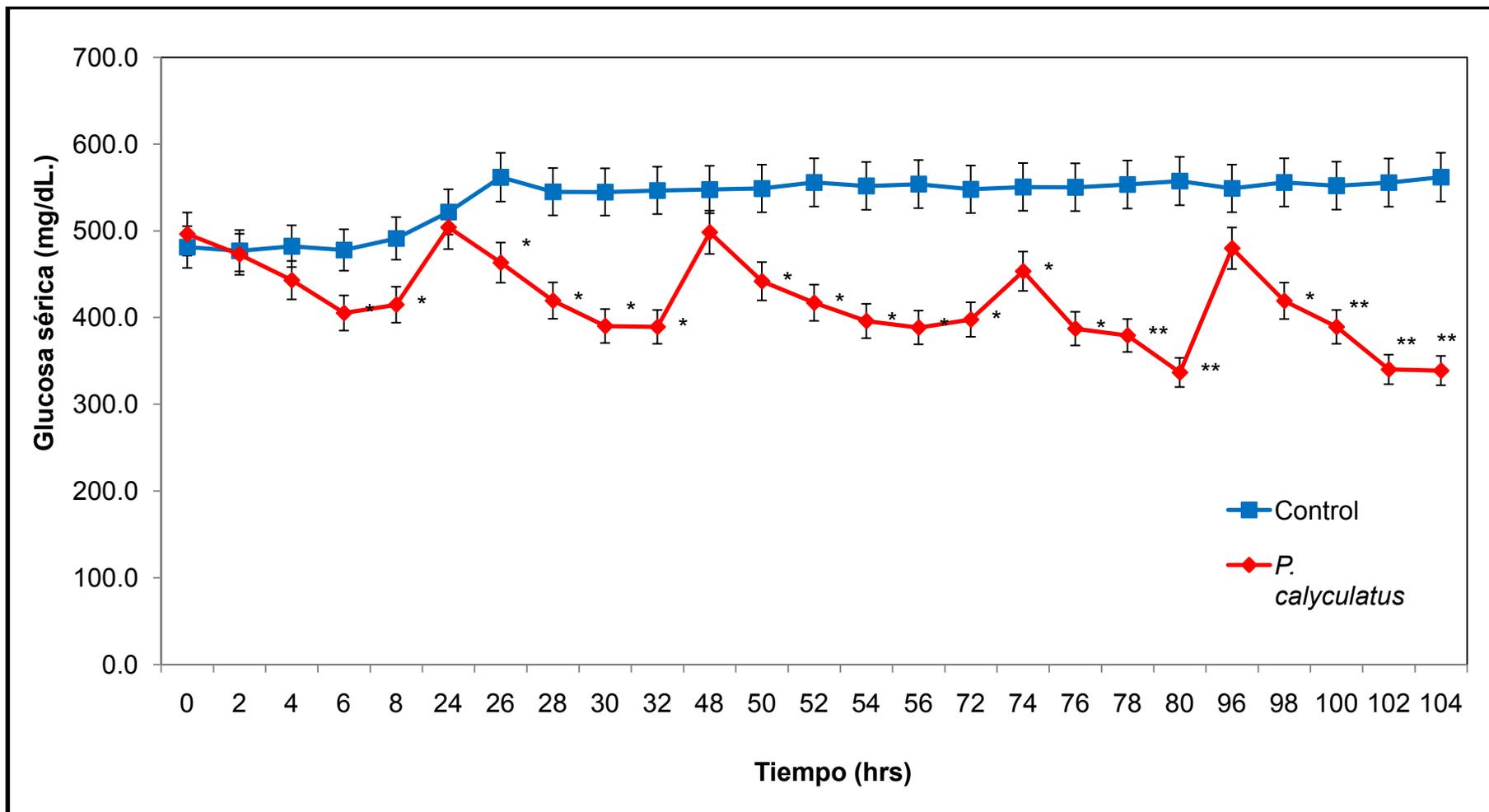


Fig. 8.- Niveles de glucosa en sangre de ratas diabéticas tratadas con el extracto metanólico de *P. calyculatus* (grupo experimental), así como del grupo control negativo. La administración en este caso fue 400 mg/Kg. Cada punto representa la media  $\pm$  eem; n=6 (\* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ ).

De la misma manera, a una dosis de 400 mg/Kg existe un descenso en la glucosa sérica del grupo experimental, observando diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al control, a partir de las 4 horas. Se obtuvo el descenso máximo perceptible cada 8 hrs tras la administración del extracto; también se observa un aumento en la glucemia cada 24 horas; cabe destacar, que incluso en este estado basal, la glucemia va en decremento con relación al grupo control y conforme van pasando los días de bioensayo (Figura 8).

Se destaca también el hecho de que existieron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el grupo experimental tratado con 200 mg/Kg y el grupo experimental tratado con 400 mg/Kg observando una mayor reducción de la glucemia en éste último. Esta diferencia se puede deber principalmente a la cantidad de sustancia activa que llega al sitio de acción, se tiene entonces un efecto directamente proporcional a la dosis.

Ahora bien, se observa que los niveles de glucosa en los ensayos sub-crónicos no eran muy cercanos a los que se presentaban en el ensayo agudo, por lo que permitió evidenciar el comportamiento del extracto a niveles más altos de glucemia, pero es evidente que aún en estos niveles y a una dosis mayor la reducción es inminente. Para seguir el paso en las pruebas de reducción de la hiperglucemia podrían ser útiles algunos ensayos más, en que se aumente la dosis y se observe la farmacocinética y/o biodisponibilidad de los metabolitos secundarios presentes en el extracto, en los modelos biológicos que se usen.

En ninguno de los bioensayos (agudo y sub crónicos) se observó evidencia de daño fuera de los patrones normales, aunque sería necesario realizar pruebas de toxicidad del extracto y pruebas histológicas para corroborar el hecho de no existir daño renal, hepático o algún otro órgano relacionado.

Así bien, es importante que se impulse la investigación dirigida al aislamiento y caracterización química de las sustancias causantes del efecto hipoglucemiante y de otras actividades biológicas de *P. calyculatus*. De hecho, en México se han evaluado principalmente las investigaciones etnobotánicas, pero no se ha prestado mucha atención a los compuestos puros obtenidos a partir de las plantas, relativos al tratamiento de enfermedades metabólicas como lo es la Diabetes (Alarcón et al., 1993).

Correlacionando la composición química del extracto metanólico con el efecto hipoglucemiante, se puede hablar de moléculas que pudiesen ser responsables del efecto que presentó el extracto de *P. calyculatus* en un modelo de rata diabética, encontramos que la bibliografía reporta el hecho de que se han encontrado compuestos que son activos para reducir los niveles de azúcar como los flavonoides (Martínez-Flores et al., 2002; Graziano et al., 1967). Entonces recordando que en las pruebas cualitativas hechas al extracto se detectaron flavonoles y/o flavononas, esto puede dar una línea de dirección hacia donde seguir con la investigación relativa a la planta y esta actividad biológica.

En la actualidad se tienen muchos productos sintéticos con actividad hipoglucemiante comprobada, pero las plantas con actividad hipoglucémica contienen materiales complejos que han desafiado a la síntesis química, lo cual no impide su uso en la medicina natural; sin embargo, lo anterior nos muestra la necesidad de continuar realizando estudios que estén dirigidos a la comprobación y búsqueda de la efectividad de plantas medicinales usadas en la medicina tradicional.

Determinar el o los mecanismos de acción en un producto vegetal hipoglucemiante como el extracto probado, requiere que se aisle e identifique el o los principios activos que se presenten dentro del extracto y posean esta actividad biológica.

En este sentido se ha reportado que algunos de los mecanismos de acción de los compuestos aislados de plantas, que actúan como hipoglucemiantes pueden ser:

- Actuando sobre las células  $\beta$ -pancreáticas y estimulando la secreción de insulina
- Inhibiendo a la células  $\alpha$  en la secreción de glucagón
- Inhibiendo la acción de algunos factores u hormonas hiperglucemiantes
- Incrementando los efectos de la insulina a nivel de receptores
- Inhibiendo a la enzima que degrada a la insulina (insulinasa)
- Modificando directamente el metabolismo de la glucosa
- Actuando como agonista de la acción de la insulina (Espinoza-Aguilar, 2007).

Las últimas investigaciones deben incluir los ensayos donde se estudie el mecanismo de acción, en las dosis óptimas y tratamiento, evaluando el mejor modo de preparación, ya que los costos del tratamiento llegan a ser altos para el paciente. Esto resalta otro punto importante, el impacto económico, el cual no se tiene estudiado en absoluto para el uso de los remedio herbolarios, pero es probable que sea de un costo bajo para muchas familias de escasos recursos (UN Department of Public Information, 2010).

Estas iniciativas deben acompañarse por un refuerzo a la educación de pacientes con diabetes y médicos, para asegurar que quienes consuman dichos preparados lo hagan de forma responsable. En el orden en que esto se logre, se obtendrá una mejor calidad de vida y así medico-paciente entenderán y controlarán de mejor manera los síntomas de la DM.

## 7.- Ensayo de citotoxicidad (Cáncer)

El ensayo de citotoxicidad se realizó en 3 líneas celulares de cáncer tal como lo muestra la metodología y dadas las curvas obtenidas para las diferentes concentraciones y la densidad óptica resultante, se realizaron las graficas correspondientes, tras la linealización de las mismas mediante el ajuste de la ecuación de la recta (Oda, 2005), se realizó una regresión lineal y de esta forma se obtuvieron las  $DE_{50}$ .

Los controles que se utilizaron en el ensayo fueron: elipticina, vinblastina y camptotecina, fármacos de referencia utilizados como antineoplásicos (Goodman & Gilman, 1996) y cuyos valores ya están estandarizados para las líneas celulares empleadas. Así entonces, se tiene que el valor de  $DE_{50}$  para la elipticina es de: 0.04  $\mu\text{g/mL}$  para KB y HF-6, y de 1.0  $\mu\text{g/mL}$  para MCF-7 (Po-Lin *et al.*, 2005). El valor de  $DE_{50}$  para la vinblastina es de: 0.04  $\mu\text{g/mL}$  y para la camptotecina es de: 0.003  $\mu\text{g/mL}$ , ambos registros en las tres líneas celulares (Suffness & Pezzuto, 1991). Valores iguales a los reportados fueron obtenidos durante la realización de este ensayo de citotoxicidad.

Con respecto al grupo experimental, se puede observar que al evaluar el extracto metanólico de *P. calyculatus* contra la línea celular de cáncer de mama (MCF-7) se obtuvo una  $DE_{50}$  de 7.0032  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 9). Mientras que para la línea de cáncer de colon (KB) se obtuvo una  $DE_{50}$  de 18.002  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 10) y en este sentido la  $DE_{50}$  que se obtuvo para cáncer nasofaríngeo (HF-6) fue de 9.0045  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 11).

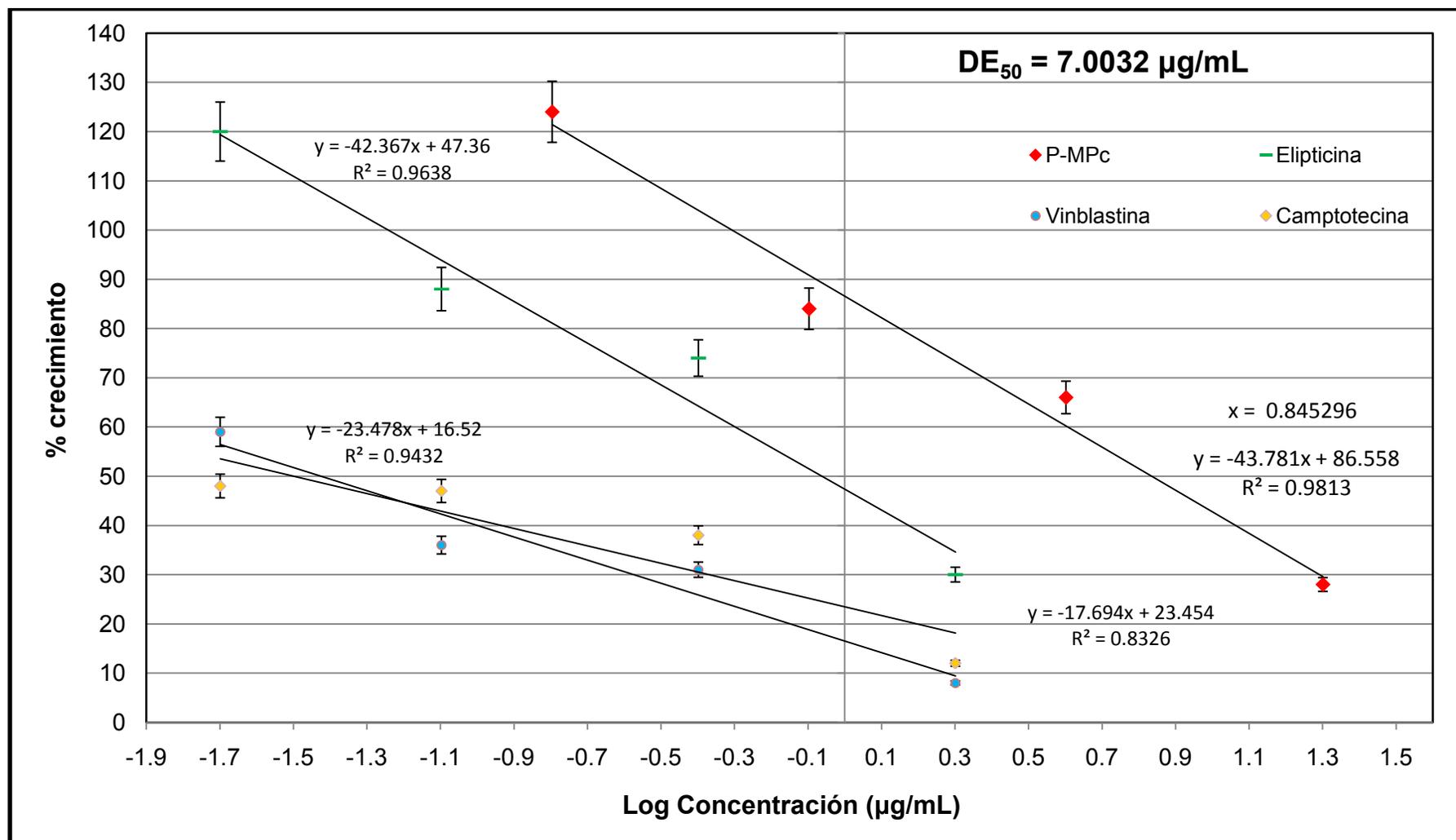


Fig. 9.- Curva patrón obtenida de la actividad citotóxica del extracto MeOH de *P. calyculatus*, así como los diversos controles contra la línea celular de cáncer de mama (MCF-7), con lo que se obtuvo la DE<sub>50</sub>. Cada punto representa la media ± eem.

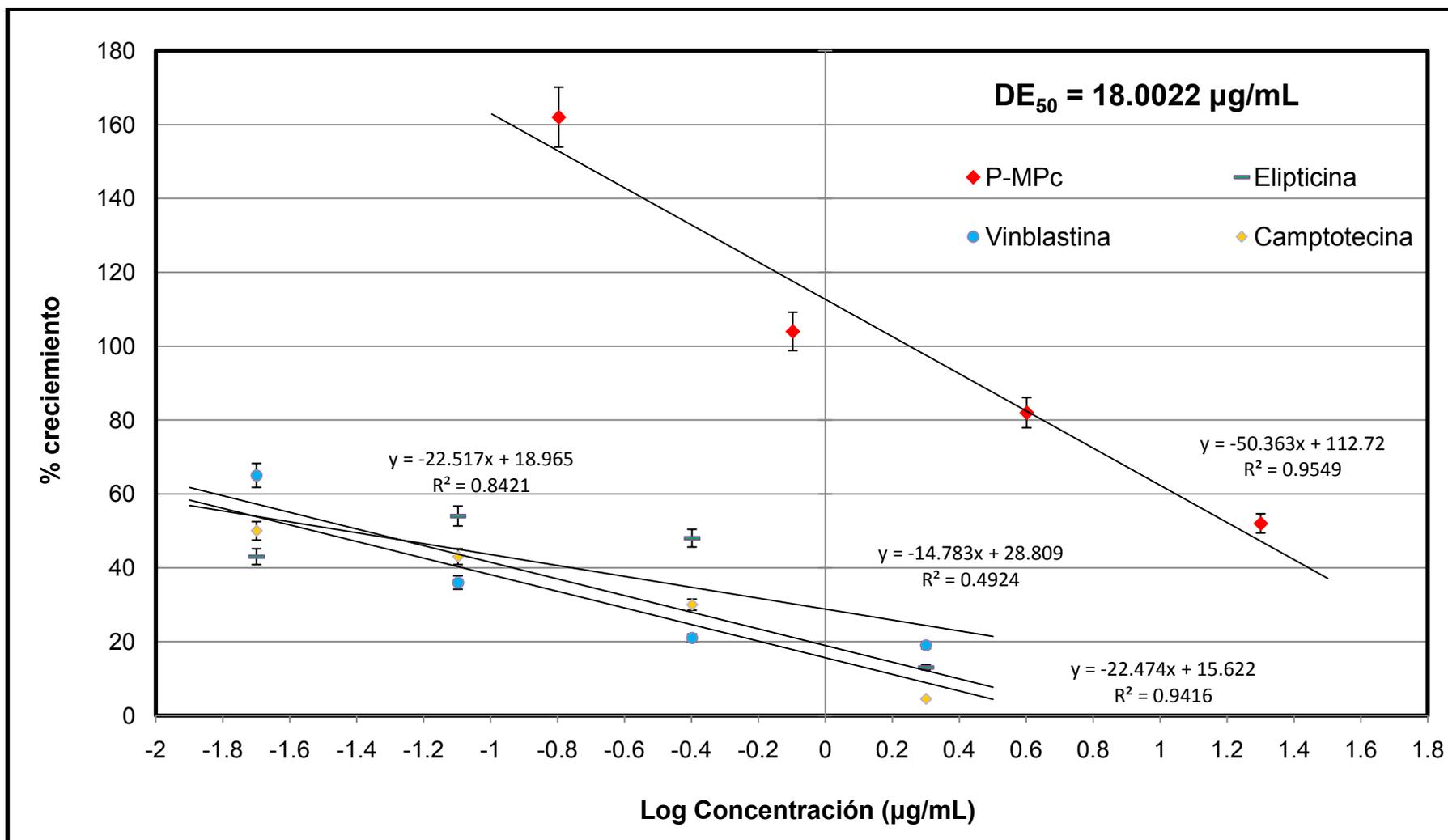


Fig. 10.- Curva patrón obtenida de la actividad citotóxica del extracto MeOH de *P. calyculatus*, así como los diversos controles contra la línea celular de cáncer de colon (KB), con lo que se obtuvo la DE<sub>50</sub>. Cada punto representa la media ± eem.

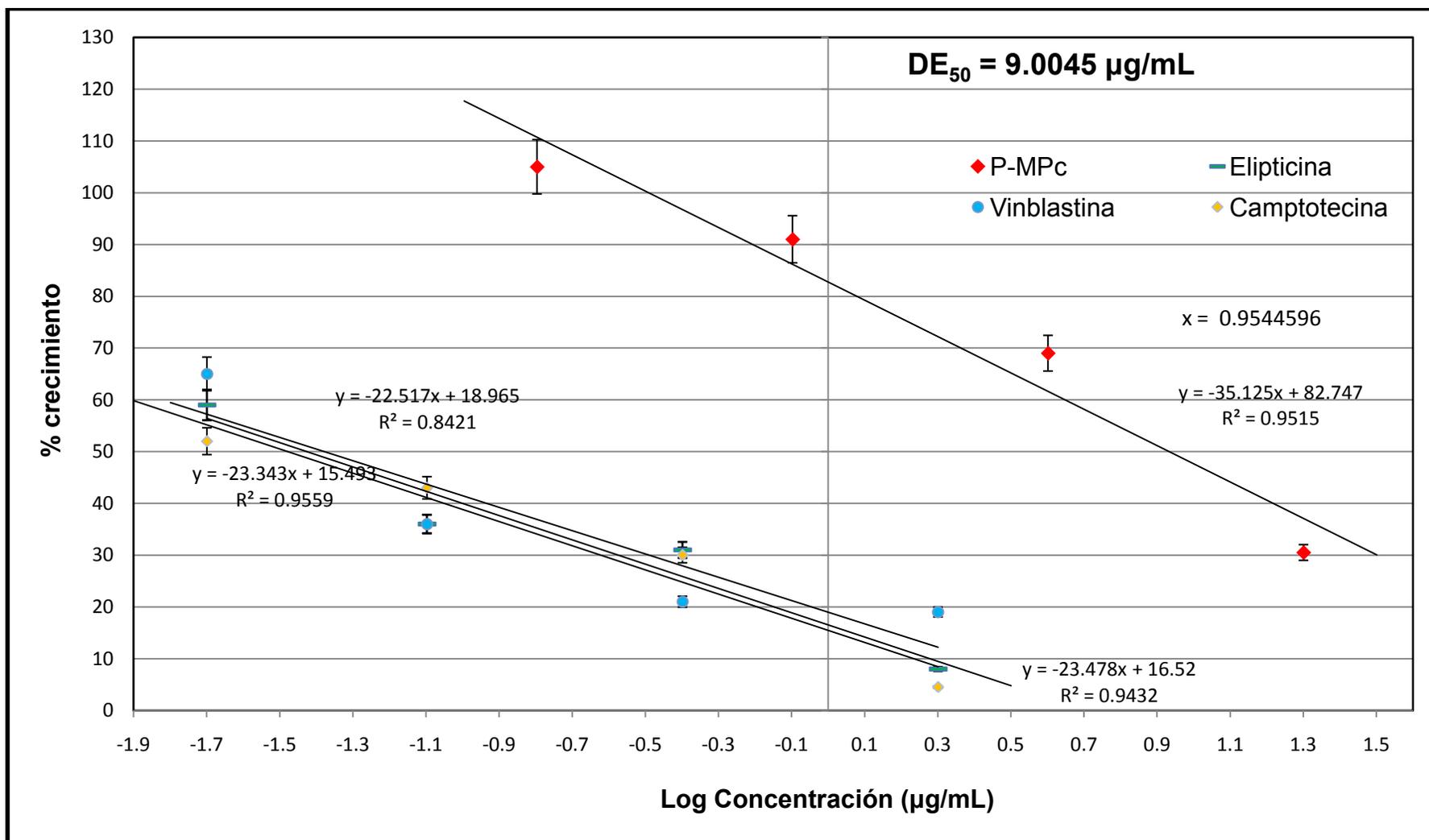


Fig. 11.- Curva patrón obtenida de la actividad citotóxica del extracto MeOH de *P. calyculatus*, así como los diversos controles contra la línea celular de cáncer nasofaríngeo (HF-6), con lo que se obtuvo la DE<sub>50</sub>. Cada punto representa la media ± eem.

Dados los resultados obtenidos, debemos recordar que según las guías instauradas por el Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos de América, se considera activo –citotóxico– a un extracto, cuando la  $DE_{50}$  resultante se encuentra por debajo de los 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Suffness & Pezzuto, 1991) y es con base a este criterio que podemos inferir la efectividad del extracto metanólico de *P. calyculatus* contra las líneas celulares cancerosas que se utilizaron (MCF-7, KB y HF-6).

Podemos notar, que si bien se tiene la seguridad de la efectividad que presenta el extracto como agente citotóxico contra las líneas celulares cancerosas, también se observan diferencias notables entre las  $DE_{50}$  obtenidas, esto puede deberse en gran medida a la sensibilidad y/o resistencia característica que presentan cada una de las líneas celulares contra la acción de los compuestos contenidos dentro del extracto (Suffness & Pezzuto, 1991).

En concreto se observa que si bien las diferencias entre las  $DE_{50}$  obtenidas contra MCF-7 y HF-6 no son significativas ( $p < 0.05$ ), ambas concentraciones están muy alejadas del valor de referencia, lo que nos habla de las dosis tan pequeñas que son necesarias –en ambas líneas celulares– para provocar la muerte del 50% de la población. De hecho esto confiere algunas ventajas, asumiendo pues que para obtener resultados basta tener dosis mínimas que actúen de manera efectiva en el modelo biológico que se está utilizando (Popoca *et al.*, 1998).

Otro aspecto importante a discutir es el hecho de que muchos extractos no inducen la muerte celular, más bien inhiben su proliferación y esto puede ser parte de los resultados obtenidos, ya que en ninguna concentración se obtuvieron D.O nulas, lo que nos habla efectivamente de un arresto en la división celular. Este efecto ha sido reportado principalmente para células MCF-7 en donde al retirar el extracto evaluado, las células regresan a su ciclo de proliferación normal (Fornelli, 2007), es entonces que la perspectiva de este trabajo podría enfocarse ahora a la

farmacocinética del extracto metanólico de *P. calyculatus* y así poder revelar cual es la verdadera acción que produce sobre este tipo de células.

Otro de los resultados a analizar es el hecho de haber diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las  $DE_{50}$  de MCF-7 y HF-6 contra las de KB, siendo esta última casi dos veces mayor que los valores obtenidos para las otras dos y muy cerca del valor de referencia. Lo anterior indica que las células de esta línea (cáncer de colon) presentan menor sensibilidad contra la acción citotóxica del extracto metanólico de *P. calyculatus*, lo que genera la necesidad de requerir una dosis más alta para alcanzar a inhibir el 50% de crecimiento de la población celular (Conforti, 2008; Suffness & Pezzuto, 1991).

Al comparar los valores obtenidos de las  $DE_{50}$  de los controles y los grupos experimentales se evidencia el hecho de existir una gran diferencia entre ellos, pero no se debe olvidar que los controles son compuestos puros cuyo blanco ya está indicado, así como su modo de acción (Po-Lin *et al.*, 2005) y no hay ninguna otra molécula (al menos en el ensayo *in vitro*) que impida su acción; cosa que no podemos afirmar de los extractos vegetales, puesto que siendo la combinación de muchos metabolitos secundarios podría existir la posibilidad de haber antagonismo entre ellos y que solo una cantidad limitada de compuestos lleguen a ejercer acción antineoplásica (Conforti, 2008).

En definitiva se tiene el conocimiento del modo de acción de diversos antineoplásicos, como aquellos que se utilizaron como controles, y de hecho se tiene una caracterización farmacocinética y farmacodinámica de los mismos (Goodman & Gilman, 1996); sin embargo, no se puede decir lo mismo de los extractos vegetales utilizados como antitumorales, ya que estos contienen tantas moléculas que podrían estar implicadas en el efecto antineoplásico que evidentemente sería casi imposible la determinación de la forma en que actúan y a que nivel lo hacen (Popoca *et al.*, 1998), es por eso que regularmente la caracterización se hace de compuestos puros, puesto que representa una manera

más fácil de evidenciar el modo de acción de algunas moléculas contenidas en un extracto (Galati & O'Brien, 2004), así se puede concluir si existe un efecto aditivo o sinérgico en el extracto que revele en cierta manera los mecanismos de acción por los que actúa.

Muchos son los compuestos aislados de plantas que se han caracterizado como antineoplásicos y entre ellos están los flavonoides, que han sido revelados como quimiopreventivos del cáncer y antitumorales (Galati & O'Brien, 2004). Recordemos con esto que algunos de los compuestos que se identificaron cualitativamente en el extracto de *P. calyculatus* eran flavonoides de distintas naturalezas, entonces se puede apuntar al hecho de que estas moléculas sean las posibles responsables de la acción citotóxica. Sin embargo, para llegar a esta conclusión sería necesario el aislamiento de estos compuestos contenidos en el extracto y evaluarlos contra las líneas celulares, así podríamos comprobar este efecto y dar razón del por que actúa como agente citotóxico el extracto metanólico de *P. calyculatus*.

Dado que el cáncer es un problema de salud pública que va creciendo día a día es necesario generar metodologías que se asemejen a lo que ocurre en humanos, cuando ya se tienen pruebas preliminares (OMS & UICC, 2005). Es así que otra perspectiva importante que se puede unir a la discusión, es la posibilidad de evaluar el extracto en un modelo *in vivo* para corroborar la manera en que actúan los diversos compuestos contenidos en él, ya que muchas veces varía en gran medida la acción que se presenta como antineoplásico a nivel *in vitro* y a nivel *in vivo*, puesto que al igual que como lo discutimos en la sección de hipertensión, las moléculas responsables de ésta actividad podrían sufrir diversas transformaciones que las dejaran sin actividad alguna (Vázquez, 2009).

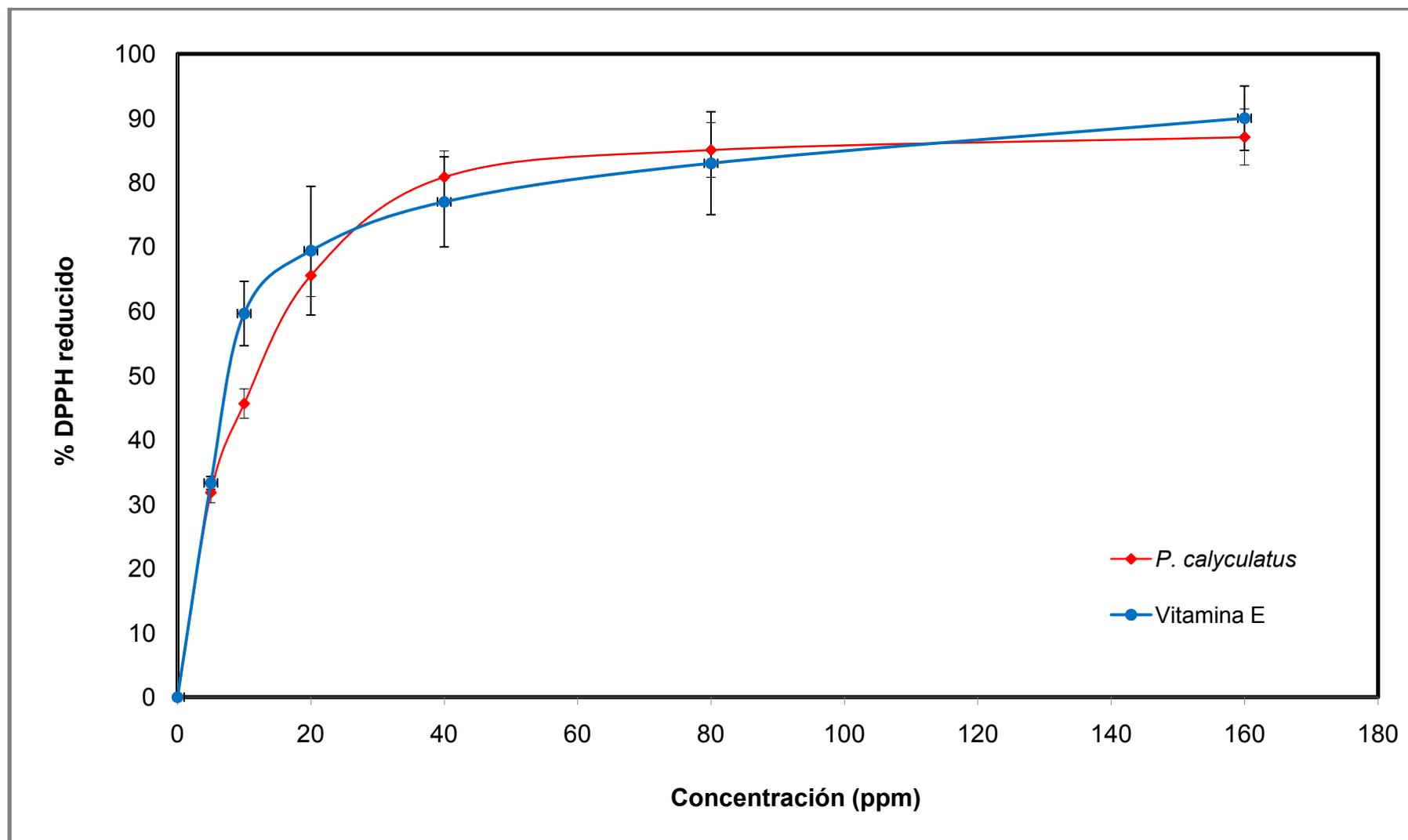
## 8.- Capacidad antioxidante (Ensayo frente al DPPH)

Los radicales libres son moléculas que contribuyen de manera importante al estrés oxidativo que pudiese sufrir un organismo (Halliwell, & Gutteridge, 2007) y que esto puede traer consigo un daño considerable a diversas biomoléculas, por lo cual es importante generar ensayos *in vitro* que revelen de manera preliminar la capacidad que tiene una sustancia para poder atrapar radicales libres (Pinell, 2003).

En el presente estudio se midió la  $CA_{50}$  tal como lo describe la metodología, con lo que al poner la sustancia de interés junto con la forma radical del difenil picril hidracilo (DPPH); y si la sustancia o extracto presentase la capacidad de atrapar radicales libres, se puede observar una pérdida de color o disminución de la absorbancia, misma que es medible y proporcional a la cantidad de DPPH que esta perdiendo el electrón desapareado (Bondet et al., 1997; Brand-Williams et al., 1995).

Tras generar la gráfica de los datos obtenidos, esto es, la absorbancia contra las concentraciones utilizadas, se puede realizar una regresión que a un valor dependiente de 50 nos revele cual es la concentración necesaria para reducir el 50% del DPPH. En este sentido el extracto metanólico de *P. calyculatus* presentó una  $CA_{50}$  de 13.66 ppm como lo muestra la Figura 12.

Los antioxidantes son sustancias que detienen o previenen una cadena de propagación oxidativa, mediante la estabilización del radical generado (Treviño, 2009), así la comparación de este dato con otros que se hayan obtenido para sustancias ampliamente conocidas por su capacidad antioxidante podemos hablar de que tan buena es la capacidad atrapadora de radicales libres que puede tener el extracto de *P. calyculatus*.



Gráfica 12.- Curva del porcentaje de reducción del DPPH frente al extracto MeOH de *P. calyculatus*, así como la vitamina E; con lo que se pudo obtener la  $CA_{50}$ . Cada punto representa la media  $\pm$  eem.

La capacidad que un extracto tiene de ser o no antioxidante está fuertemente ligada a las moléculas que lo componen. Un grupo de metabolitos secundarios que ha sido fuertemente estudiado por la gran capacidad atrapadora de radicales libres que presentan, son los flavonoides, éstos han sido descritos dentro del metaboloma vegetal incluso como los mayores contribuyentes a ésta tarea (Villaño *et al.*, 2007).

Las pruebas cualitativas hechas al extracto metanólico de *P. calyculatus* revelaron la presencia de fenilpropanoides y flavonoides, estos metabolitos pueden ser los principales responsables de que el extracto presentara esa capacidad, ya que algunos autores han encontrado relación directa entre el contenido de fenoles en un extracto y la eficiencia antioxidante (Sánchez *et al.*, 1999); por ejemplo, algunos fenoles como la rutina, quercetina y piceatanol, son compuestos que presentan en mayor o menor grado propiedades antioxidantes, es decir tienen la capacidad de atrapar radicales libres (Arnao *et al.*, 1998).

Comparando con otras sustancias se tiene; que el valor de la  $CA_{50}$  del  $\alpha$ -tocoferol es de 9.13 ppm y la de la vitamina C es de 6 ppm (Cantú, 2001), mientras que la quercetina es de 5.3 ppm, esta última se ha reportado como un fuerte antioxidante (Ku *et al.*, 2005). Si se sigue bajo esa línea de la comparación se puede hablar de que tan buena o “no tan buena” es la capacidad antioxidante que presentó el extracto, éste tiene una  $CA_{50}$  muy cercana a aquella de la vitamina E, aunque está alejada de la de la vitamina C y la quercetina, aun cuando estamos observando este fenómeno podemos decir que el extracto puede ser un buen antioxidante por que la concentración utilizada para neutralizar al 50% el DPPH es pequeña. EL resultado al final evidencia el hecho de que el extracto metanólico de *P. calyculatus* si posee actividad antioxidante.

Otro aspecto importante que se debe considerar en el presente estudio, es el hecho de lo fuertemente ligado que se haya el estrés oxidativo con la hipertensión (Briones & Touyz, 2010), la diabetes (Wiernesperger, 2003) y el cáncer (Valko *et*

*al.*, 2006); de hecho la investigación de estas patologías esta repuntando hacia su origen en el estrés oxidativo, su prevención y tratamiento a lo largo de su desarrollo (Smith & Ashiya, 2007; Robertson & Harmon, 2006; Galati & O'Brien, 2004).

Haciendo un recuento de cómo esta implicado el estrés oxidativo en la hipertensión, primero se debe saber que las células de mamíferos son capaces de generar metabolitos de oxígeno, conocidas como especies reactivas de oxígeno (ERO) a través de la acción de varias enzimas u otras fuentes. En las células vasculares (Halliwell & Gutteridge, 2007), las ERO son en su mayoría producidas por la NADPH oxidasas, la sintasa de óxido nítrico (ONS) desacoplada, la xantina oxidasa y por fuentes mitocondriales. En la hipertensión, la producción de ERO por estas fuentes es mayor, y esto no sólo contribuye a la hipertensión, sino también causa enfermedad vascular y disfunción. La producción de ERO en otros órganos, en particular el riñón y los centros en el cerebro, probablemente participan en la regulación de la presión arterial. A pesar de la gran cantidad de datos que sustentan el papel de las ERO en la hipertensión y otras enfermedades cardiovasculares, el tratamiento con antioxidantes comúnmente empleados no ha tenido tanto éxito, lo que provocó un replanteamiento del concepto de estrés oxidativo en el tratamiento de la hipertensión (Harrison *et al.*, 2007)

Muchas veces la acción antioxidante esta ligada a la actividad hipotensora, sobre todo cuando se habla de sustancias endotelio dependientes que pudiesen estar implicadas en la acción que ejerce la ONS dentro del control de la hipertensión, tal es el caso del extracto de *P. calyculatus* que ha sido reportado con este tipo de acción (Rodríguez-Cruz, 2003).

De hecho, existen diversos trabajos en donde se conoce el papel que juega sobre todo el endotelio y la ONS en la producción de oxido nítrico (NO) en el estrés que pueda sufrir un paciente con hipertensión, ya que cuando se encuentra alterado este metabolismo es posible encontrar radicales del óxido nítrico (NO<sup>·</sup>) (Briones &

Touyz, 2010) que al correr por el torrente sanguíneo provocan las reacciones en cadena características de este tipo de estrés (Salim *et al.*, 2010; Treviño, 2009).

La terapia con antioxidantes en la hipertensión y el hecho de replantear la situación de los mismos hace alusión al hecho de que en este tipo de pacientes se vuelven insuficientes los medios endógenos para combatir este estrés, es necesario entonces que se utilicen antioxidantes exógenos como los flavonoides para el tratamiento de dicho padecimiento (Smith & Ashiya, 2007).

Siguiendo el sentido de la metodología y como se dieron los resultados ahora se entrará en la relación entre la DM y el estrés oxidativo; así pues, estando en el entendido que éste ha sido identificado como un punto clave en muchas de las complicaciones de la diabetes y que este síndrome es una fuente importante de sustancias prooxidantes, se vuelven un candidatos idóneos para un estudio a profundidad (Wiernesperger, 2003).

Algo importante que se debe tomar en cuenta es que el hecho de presentar hiperglucemia es un factor determinante en la inducción del estrés oxidativo y en la disminución de los antioxidantes endógenos. Por ejemplo, la hiperglucemia contribuye al estrés oxidativo al menos de 3 formas, por sobre carga de la cadena transportadora de electrones en la mitocondria, lo que genera una mayor producción de superóxido (Wiernesperger, 2003), otro es el proceso de autoxidación de la glucosa en presencia de metales y en general su exceso como sustancia prooxidante (Robertson & Harmon, 2006) y la generación de ERO en la glucosilación (Wolff *et al.*, 1989).

Así pues, se toma en cuenta la terapia con sustancias antioxidantes como un medio para reducir las complicaciones que se presentan en la diabetes, hasta el momento no hay estudios concluyentes en humanos que reflejen a una terapia antioxidante como antidiabética o que cure esta enfermedad, pero si hay un numero considerable de trabajos que hablan de la prevención y el tratamiento de

la DM, de hecho es una de las terapias que día a día toma más fuerza por que muchos de los antioxidantes que se utilizan en ella son obtenidos de las preparaciones vegetales (Martínez-Flores *et al.*, 2002; Ahmad & Mukhtar, 1999).

Es así que se puede proponer también a la infusión que se usa de *P. calyculatus* como una buena alternativa en el tratamiento de la diabetes, no solo por sus propiedades como hipoglucemiante, sino también como un antioxidante, dado que dichas propiedades en conjunto pueden ayudar a detener la progresión de la enfermedad y generar un tratamiento novedoso.

Otra de las patologías tratadas dentro de los objetivos fue el cáncer, entonces se debe entender que la transformación de una célula normal a una maligna requiere cambios genotípicos y fenotípicos a menudo asociadas a cada una de las fases de iniciación, promoción y progresión del proceso carcinogénico. Los genes en cada una de estas fases adquieren alteraciones en su actividad transcripcional que se asocian con hipermetilación. En este sentido, un creciente conjunto de evidencia apoya el papel de las ERO inducidas por la generación de estrés oxidativo en estos procesos epigenéticos y, como tal, podemos formular la hipótesis de los modos potenciales de acción por los cuales el estrés oxidativo modula la regulación epigenética de la expresión génica. Esto es de suma importancia dado que los diversos componentes de la vía y sus patrones en el ADN principalmente, se utilizan como potenciales biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico del cáncer (Franco *et al.*, 2008).

El concepto de la prevención del cáncer mediante la intervención de sustancias antioxidantes surge del hecho de que las frutas y hortalizas contienen a estas sustancias y están vinculados a las bajas tasas de cáncer en aquellas personas que las consumen. La protección contra el daño al ADN por los productos de alimentos de origen vegetal puede ser demostrado *in vitro*; sin embargo, exige un especial cuidado en la medición de los daños, ya que la oxidación se produce rápidamente durante la preparación de la muestra, lo que genera una barrera

grave al momento de la medición. Usando ensayos validados y fiables como para la oxidación del ADN, es posible demostrar una disminución en el daño oxidativo después de la suplementación con sustancias antioxidantes aislados de plantas o alimentos integrales de especies vegetales, en seres humanos (Collin, 2005).

Dada toda esta revisión se pueden hacer una serie de inferencias sobre el extracto metanólico de *P. calyculatus*, empezando por el hecho de haber dado resultados positivos como agente citotóxico contra algunas líneas celulares cancerosas (MCF-7, HF-6 y KB) y a la vez como antioxidante de manera *in vitro*, estas dos propiedades presentadas validan científicamente que dicho extracto puede ser utilizado para realizar más estudios encaminados a la prevención o tratamiento del cáncer y si bien es cierto que todavía no se entiende completamente el papel de los fitoquímicos como los antioxidantes, o como moduladores de otros procesos relacionados con la carcinogénesis y su prevención (Collin, 2005), se podrían sugerir una serie de estudios posteriores que puedan revelar los medio por los que actúa el extracto de *P. calyculatus* sobre las células cancerosas y si actúa como quimiopreventor del cáncer.

## Conclusiones

- El presente estudio reveló que de acuerdo a los rendimientos obtenidos en los extractos de *Psitacanthus calyculatus* D.C. (Don) los metabolitos secundarios que se pudieron extraer fueron en su mayoría de naturaleza polar.
- Se demostró de manera cualitativa la presencia de algunos de los componentes del extracto metanólico, siendo éstos en su mayoría fenilpropanoides como: flavonoides, flavonas y glucósidos, sin detección de alcaloides.
- Se observó que el extracto metanólico de *P. calyculatus* no presentó actividad hipotensora en un modelo de hipertensión arterial genética, SHR.
- Se reveló que el extracto metanólico de *P. calyculatus* posee propiedades hipoglucemiantes en un modelo murino de diabetes inducido con estreptozotocina, de manera aguda y sub-crónica.
- El extracto metanólico de *P. calyculatus* también presentó actividad citotóxica contra líneas celulares cancerosas de mama (MCF-7), nasofaríngeo (KB) y colon (HF-6).
- Por último, el extracto presentó una buena capacidad antioxidante (*in vitro*) presentando una  $CA_{50} = 13.66$  ppm.

# A P É N D I C E S

## Apéndice 1

### DIABETES MELLITUS (DM)

La diabetes mellitus es un desorden metabólico común caracterizado por los altos niveles de glucosa en la sangre, resultado de la ausencia o inadecuada secreción de insulina por parte del páncreas, con o sin deterioro coexistente en la acción de insulina (WHO, 1999; Ortiz-Andrade *et al.*, 2006).

Esta enfermedad afecta aproximadamente a 150 millones de personas alrededor del mundo y su incidencia podría aumentar al doble durante los próximos 20 años (Cohen & Goedert, 2004). Así mismo está logrando rápidamente una proporción de predominio alarmante en los países desarrollados y está amenazando no solo la existencia, sino también la supervivencia económica de las poblaciones en los países en vías de desarrollo (Osadebe *et al.*, 2004). Tal es el caso de México, cuyo índice de morbilidad para la DM oscila en aproximadamente en 2'179, 000 (SA, 2007), esto supone un problema de salud pública de magnitudes considerables.

Estudios epidemiológicos y ensayos clínicos apoyan fuertemente la noción de que la hiperglucemia es la causa principal de complicaciones relacionadas con padecimientos en la arteria coronaria, desordenes cerebro vasculares, insuficiencia renal, complicaciones neurológicas y muerte prematura (López-Candales, 2001; Cárdenas-Quintanilla & Hernández-Delgado, 1986). También ha sido propuesto que los radicales libres oxidantes juegan un papel relevante en la patogénesis de la DM humana y sus secuelas como la nefropatía, neuropatía y angiopatía (Soto *et al.*, 2003). Estando en el entendido de que el resultado de una hiperglucemia crónica deja a su paso un estrés oxidativo crónico en todos los tejidos (Robertson & Harmon, 2006), dado que la glucosa en concentraciones anormalmente altas genera gran cantidad de especies reactivas de oxígeno (Wiernsperger 2003), mismas que producen un daño oxidativo a los órganos

clásicamente afectados por la DM, tales como: ojos, riñones, nervios y vasos sanguíneos (Robertson & Harmon, 2006).

Los métodos farmacológicos (insulina e hipoglucemiantes vía oral) así también como los no farmacológicos (dietas y ejercicio) son usados en el control de la DM (Osadebe et al., 2004). Uno de los métodos terapéuticos para la reducción de hiperglucemia en sobremesa de pacientes con DM, es prevenir la ingestión de carbohidratos después de la captación de comida (Ortiz-Andrade et al., 2006). Dentro de estos métodos de control, una de sus obvias limitaciones es el hacer necesaria una búsqueda minuciosa de ayuda entre el arsenal de vegetales que tiene a su disponibilidad el hombre (Osadebe et al., 2004) para su integración en una posible dieta.

Los productos naturales de las plantas medicinales continúan formando la base común para el descubrimiento de nuevas entidades químicas en los modernos programas de descubrimiento de drogas, se han reportado una serie de plantas con principios activos para posibles usos en el tratamiento de la DM (Anandharajan et al., 2005; Alarcón *et al.*, 1998), estas sustancias forman parte de los metabolitos secundarios. Normalmente se distingue entre metabolismo primario y secundario; el primero se refiere a procesos esenciales en los seres vivos y tienen la capacidad de servir como materiales de partida (precursores) para los metabolitos secundarios. Éstos son en principio, biosintetizados a partir de los metabolitos primarios pero contribuyen definitivamente a la adaptación de especies y a su supervivencia. Son más característicos para un grupo biológico en particular, tal como una familia o un género, y aparentemente, la maquinaria sintética puesta en juego aquí está relacionada con la evolución de las especies (Buchanan et al., 2000).

## Apéndice 2

### **HIPERTENSIÓN (HT)**

Las enfermedades cardiovasculares se deben a trastornos del corazón y los vasos sanguíneos, entre ellos las cardiopatías coronarias (ataques cardíacos), las enfermedades cerebrovasculares (apoplejía), el aumento de la tensión arterial (hipertensión), las vasculopatías periféricas, las cardiopatías reumáticas, las cardiopatías congénitas y la insuficiencia cardíaca. Algunas de las principales causas de enfermedad vascular son el consumo de tabaco, la falta de actividad física y una alimentación poco saludable (OMS, 2010).

En este sentido, la hipertensión es un factor de riesgo que puede desembocar en enfermedad cardiovascular con el mayor impacto epidemiológico en el mundo y también representa un factor de riesgo importante para el desarrollo de otras enfermedades como: la disfunción renal, insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedad coronaria y accidente cerebro vascular (Ogihara, 2005).

En la actualidad, existen fármacos antihipertensores para controlar la presión arterial en cuatro sitios efectores: los vasos de resistencia, los vasos de capacitancia, el corazón y el riñón, que a su vez se clasifican como: vasodilatadores, fármacos simpaticolíticos, bloqueadores de los canales de calcio, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y los diuréticos (Staffileno de 2005) y los inhibidores del receptor AT1

A pesar de esto, las compañías farmacéuticas han demostrado que los productos naturales siguen constituyendo una fuente muy valiosa para la producción de nuevas entidades químicas utilizadas para el control de enfermedades de difícil tratamiento, ya que representan a estructuras privilegiadas, seleccionadas por diferentes mecanismos a lo largo de la evolución de las especies vegetales (Smith y Ashiya, 2007; Koehn & Carter, 2005).

Además, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que alrededor del 65-80% de la población mundial en los países en desarrollo, debido a la pobreza y la falta de acceso a la medicina moderna; dependen esencialmente de las plantas para su atención primaria en salud (Harvey, 2007; Bohlin, 2004; Fabricant & Farnsworth, 2001).

Por lo tanto, con el fin de demostrar la eficacia de las plantas medicinales desde el punto de vista científico, se presentan distintos trabajos en donde se tiene como objetivo caracterizar la actividad vasodilatadora y el posible modo de acción; todo esto con el propósito de encontrar nuevos compuestos a partir de plantas que se utilizan como agentes anti-hipertensivos (Corson y la tripulación , 2007) en la medicina tradicional Mexicana (Aguirre-Crespo, et al., 2005).

## Apéndice 3

### **CÁNCER**

El cáncer es un proceso de reproducción y diseminación incontrolada de células. Puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo. Este crecimiento celular incontrolado suele invadir el tejido circundante y puede provocar metástasis en puntos distantes del organismo. Muchos tipos de cáncer se podrían prevenir evitando la exposición a algunos factores de riesgo comunes como el humo de tabaco y la radiación UV. Además, un porcentaje importante de cánceres pueden curarse mediante cirugía, radioterapia o quimioterapia, especialmente si se detectan en una fase temprana. (OMS, 2009a).

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad y el número total de casos está aumentando en todo el mundo. Tanto así, que en la mayor parte de los países desarrollados el cáncer es la segunda causa principal de mortalidad después de las enfermedades cardiovasculares. Los datos epidemiológicos muestran que comienza esta tendencia en el mundo menos desarrollado, en particular en los países «en transición» y países de ingresos medianos, por ejemplo en América del Sur y Asia. Más de la mitad de los casos de cáncer se registran ya en países en desarrollo (OMS, 2009b). Se prevé pues, que a nivel mundial, la mortalidad por cáncer aumentará un 45% entre 2007 y 2030 (pasará de 7,9 millones a 11,5 millones de defunciones), debido en parte al crecimiento demográfico y al envejecimiento de la población. En las estimaciones se han tenido en cuenta las ligeras reducciones previstas de la mortalidad por algunos tipos de cáncer en países con grandes recursos. Se estima que durante el mismo periodo el número de casos nuevos de cáncer aumentará de 11,3 millones en 2007 a 15,5 millones en 2030 (OMS & UICC, 2005).

En este sentido, el cáncer de pulmón mata a un mayor número de gente que cualquier otro tipo de cáncer, y se prevé un aumento de esta tendencia hasta 2030

a menos que se intensifiquen mucho las actividades de control mundial del tabaquismo. Algunos tipos de cáncer, como los de próstata, mama y colon, son más frecuentes en los países desarrollados. Otros tipos de cáncer, como los de hígado, estómago y cuello uterino, son más frecuentes en los países en vías de desarrollo; pero también es importante la existencia de los primeros en éstos países.

La aparición de cáncer se ha asociado a varios factores de riesgo comunes, a saber: un modo de vida poco sano (consumo de tabaco y alcohol, dieta inadecuada, falta de actividad física) y exposición a carcinógenos (por ejemplo: asbesto) en el entorno laboral o en el medio ambiente (por ejemplo por contaminación del aire en locales cerrados), radiación (por ejemplo ultravioleta o ionizante) y algunas infecciones (por ejemplo hepatitis B o infección por virus del papiloma humano).

Los principales factores evitables de riesgo de cáncer son los siguientes:

- Consumo de tabaco: causa 1,8 millones de defunciones anuales por cáncer en el mundo (el 60% de éstas se registran en países de ingresos bajos y medianos);
- Exceso de peso, obesidad o inactividad física: en conjunto causan 274.000 defunciones anuales por cáncer;
- Consumo excesivo de alcohol: causa 351.000 defunciones anuales por cáncer;
- Infección por virus del papiloma humano transmitido por vía sexual: causa 235.000 defunciones anuales por cáncer;
- Agentes carcinógenos en el entorno laboral: causan al menos 152.000 defunciones por cáncer (OMS, 2009b).

A pesar de que cada vez sabemos más sobre la manera de prevenir y de tratar el cáncer, cada año aumenta el número de personas que lo padecen. Si la tendencia

continúa como hasta ahora, en 2020 deberá comunicárseles que tienen cáncer a 16 millones de personas. De ellas, dos tercios vivirán en países en desarrollo o en países de industrialización reciente (IARC, 2002).

En México, tan solo en el 2005 el cáncer cobró la vida de cerca de 64,000 personas, de las cuales 37, 000 estaban por debajo de los 70 años. Así bien, la proyección epidemiológica muestra el aumento en la proporción de cáncer del 12.5% a un 13.8%; siendo los tipos de cáncer más comunes en hombres, el de próstata, pulmón, estómago, hígado y colon; mientras que en mujeres los más comunes son: cérvico uterino, de mama, de estómago y el de hígado (OMS, 2008).

Esta enfermedad exige una acción internacional concertada, tanto por parte de los gobiernos, las organizaciones, las instituciones en los sectores público y privado y de los centros de investigación, como por parte de las personas. En dicha acción, que ya ha comenzado, nos corresponde a cada uno desempeñar un papel importante (OMS & UICC, 2005).

Dentro de todo este concepto, la utilización de plantas medicinales en la prevención del cáncer juega ahora un papel muy importante, entiéndase más concretamente como quimiopreención, siendo ésta el uso de sustancias químicas naturales o sintéticas que supriman, retarden o reviertan el proceso de carcinogénesis, en especial aquellas que presentan actividad antioxidante (Agarwal & Mukhtar, 1996; Surh, 1999; Afaq *et al.*, 2003).

Bajo esta línea, se sabe que el consumo de frutas y verduras disminuye el riesgo de presentar diversas enfermedades, entre ellas el cáncer, lo anterior se ha asociado a la presencia de vitaminas y polifenoles con propiedades antioxidantes en las plantas (Ahmad & Mukhtar, 1999).

La mayoría de las sustancias antioxidantes aisladas de las plantas superiores son polifenoles (Atoui *et al.*, 2005). El consumo de frutas, verduras, cereales e infusiones herbales puede aportar hasta 1g de compuestos fenólicos diarios en la dieta, debido a lo anterior, estos compuestos se consideran el principal suplemento alimenticio. También se les reconoce como benéficos en la salud humana por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorios y anticarcinogénicos (Pinnell, 2003; Galati & O'Brien, 2004; Atoui, 2005). Además, se ha demostrado que algunos flavonoides al ser administrados de forma oral o tópica tienen propiedades protectoras (Pinnell, 2003) contra este tipo de patologías.

En este sentido, a partir de estudios químicos y farmacológicos de algunas especies de la familia de las Lorantaceas se han identificado diferentes tipos de constituyentes como los flavonoides (Graziano *et al.*, 1967) alcaloides y lecitinas (Winterferferld & Dorle, 1942). Se expresa, pues, que los primeros actúan protegiendo la salud; limitan la acción de los radicales libres (oxidantes) reduciendo el riesgo de cáncer y enfermedades cardíacas, como puede ser la HT, refuerzan los vasos sanguíneos y combaten síntomas de enfermedades degenerativas (Martínez-Flores *et al.*, 2002), tal es el caso de la DM.

## Apéndice 4

**ESTRÉS OXIDATIVO Y SU RELACIÓN CON ALGUNOS PADECIMIENTOS**

En términos bioquímicos, el estrés oxidativo es un aumento en la reducción del potencial celular o una disminución en la capacidad reductora de los pares redox celulares como el glutatión. Un aspecto particularmente destructivo del estrés oxidativo es la producción excesiva de especies de reactivas de oxígeno (ERO), que incluyen los radicales libres como: superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroxilo ( $\cdot OH$ ) y el oxígeno singulete ( $^1O_2$ ). Algunas de las especies menos reactivas (como el peróxido de hidrógeno) pueden ser convertidas por una reacción redox con metales de transición u otros compuestos de ciclo redox en el radical  $\cdot OH$ , especie radical más agresiva que puede causar extenso daño celular (Figura 12). La mayoría de estas especies derivadas del oxígeno se producen en un nivel bajo en condiciones normales de metabolismo aeróbico y el daño que causan a las células es reparado constantemente (Konigsberg, 2008).

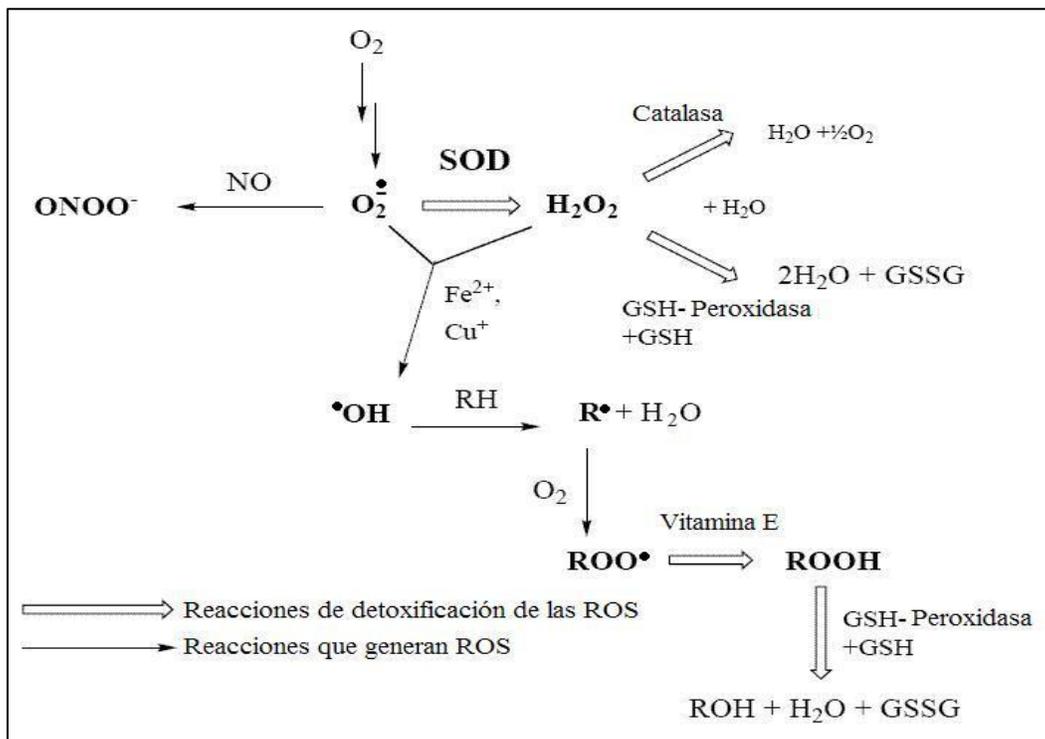


Fig. 12.- Simbología de las diversas rutas de generación de especies reactivas de oxígeno

En este sentido, existen diversos factores de riesgo los que desencadenaran la producción de especies reactivas de oxígeno -y nitrógeno- (Figura 13) y que cuando las células sucumben ante el estrés que estas especies les provocan se produce un daño oxidativo, producido por el ataque a diversos sistemas celulares (ADN, lípidos, carbohidratos, proteínas, etc.). La diversos daños provocados a la célula y que se vuelven irreparables, se pueden convertir rápidamente en diversas alteraciones metabólicas que repercuten directamente en el organismo, ejemplo de esto es: las nefropatías, las neuropatías, la hipertensión, la diabetes, el cáncer, la ataxia, hepatopatías, entre otras (*Ibidem*).

Los efectos del estrés oxidativo dependen de la magnitud de estos cambios y si la célula es capaz de superar las pequeñas perturbaciones para recuperar su estado original. Sin embargo, el estrés oxidativo severo puede causar la muerte celular, aún cuando exista una oxidación moderada puede desencadenar la apoptosis, mientras que si es muy intensa puede provocar la necrosis. Sin embargo, bajo los graves niveles de estrés oxidativo que causa la necrosis, el daño produce agotamiento de ATP impidiendo la muerte celular por apoptosis controlada, provocando que la célula simplemente se desmorone (*Ibidem*).

Para contrarrestar los daños que pudiese ocasionar un exceso de la ERO, las células han desarrollado diversos sistemas antioxidantes a lo largo de su evolución. Los sistemas antioxidantes presentes en las células se dividen en: enzimáticos y no enzimáticos, ambos son considerados como un mecanismo de protección frente a los efectos adversos del estrés oxidativo. Estos sistemas antioxidantes incluyen una red de enzimas que son capaces de metabolizar a las ERO. El radical superóxido se convierte primero en peróxido de hidrógeno por la enzima superóxido dismutasa (SOD) y éste último es inmediatamente metabolizado para producir agua por la acción de la catalasa (CAT) o diversas peroxidasas como la glutatión peroxidasa (GPx). La acción de éstas enzimas antioxidantes debe estar acoplada para evitar condiciones de estrés oxidativo en las células. Algunos de los antioxidantes no enzimáticos son: el glutatión, la

trasferrina y ceruloplasmina, la albúmina, el ácido úrico, las vitaminas C y E, los flavonoides, entre otros (Halliwell y Gutteridge, 2007).

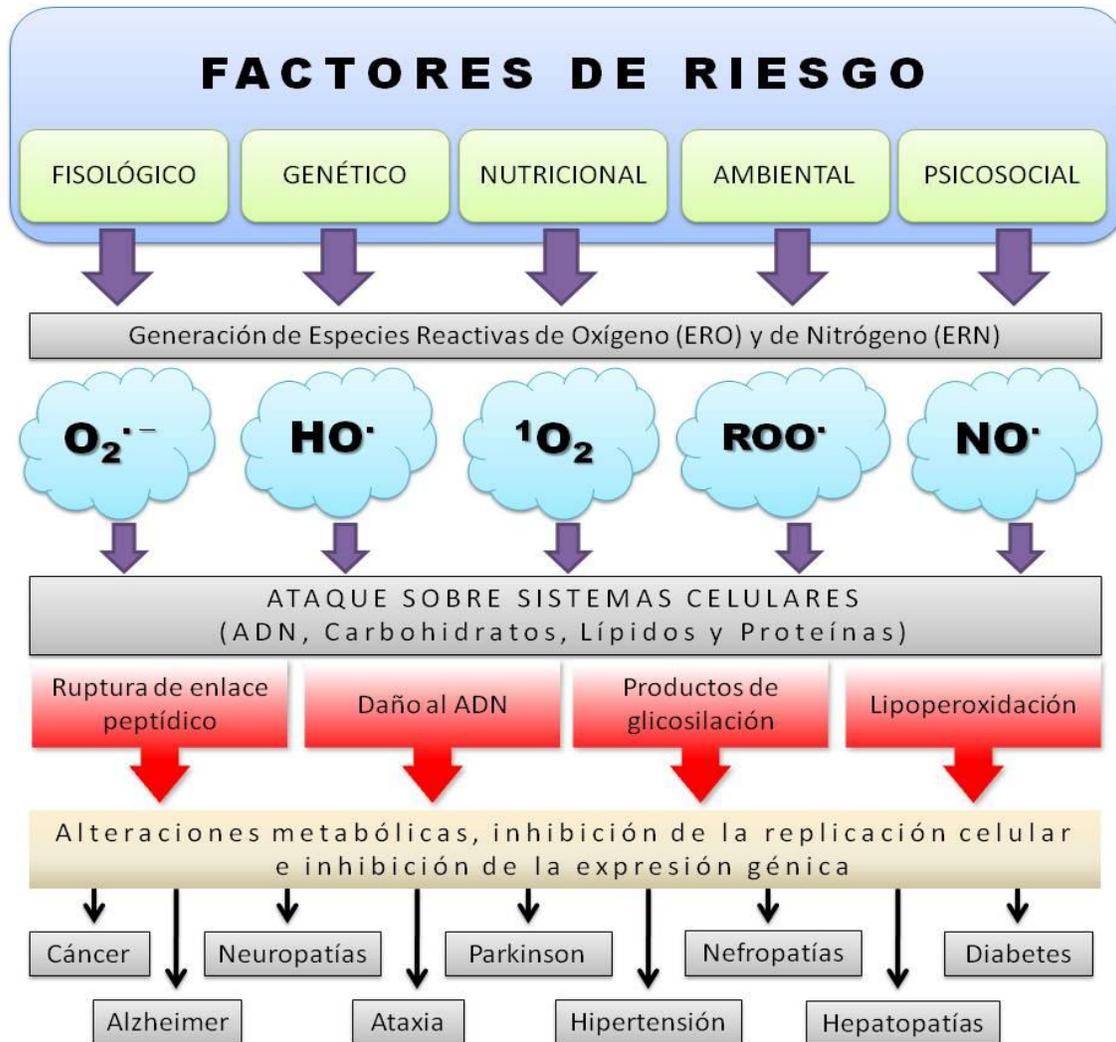


Fig. 13.- Representa la cascada de daño que puede ser producido por las especies reactivas de oxígeno.

Aunado a lo anterior, se destacan 3 patologías que fueron estudiadas: la hipertensión, la diabetes y el cáncer.

La hipertensión es un importante contribuyente al desarrollo de insuficiencia renal, enfermedad cardiovascular y accidente cerebrovascular. Estas patologías se asocian con cambios vasculares funcionales y estructurales, incluyendo la disfunción endotelial, alteraciones de la contractilidad, y la remodelación vascular.

Un aspecto importante de estos fenómenos es el estrés oxidativo. Así, los factores que activan las enzimas pro-oxidantes, tales como la NADPH oxidasa, siguen estando mal definidos, pero probablemente implican a la angiotensina II, el estiramiento mecánico y a las citoquinas inflamatorias (Briones & Touyz, 2010).

Las especies reactivas de oxígeno influyen en la función vascular, renal y cardíaca, así como en estructura de los órganos implicados mediante la modulación del crecimiento celular, la contracción/dilatación, y las respuestas inflamatorias a través de las vías de señalización redox-dependientes. Al compilar datos de experimentos moleculares y celulares, así como estudios en animales, se revisan las implicaciones del estrés oxidativo en la hipertensión. Sin embargo, la evidencia clínica es todavía controvertida (Briones & Touyz, 2010).

Otra de las patologías que surgen como un problema de salud pública y puede originarse de un estrés oxidativo crónico, es la diabetes, reconocida como una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo (Lyons, 1991). La hiperglucemia provoca trastornos metabólicos y complicaciones diversas; así la diabetes produce alteraciones del perfil lipídico, especialmente una mayor susceptibilidad a la peroxidación de lípidos, que es responsable de la mayor incidencia de la aterosclerosis, una complicación grave de la diabetes mellitus (Seghrouchni *et al.*, 2002).

Un mayor estrés oxidativo ha sido observado en estos pacientes, que se relaciona con el aumento en la producción de radicales libres, la peroxidación lipídica y el estado antioxidante disminuido. Durante el estrés oxidativo, mecanismos endógenos -las enzimas y moléculas antioxidantes- están desplegadas para neutralizar las especies reactivas de oxígeno y reducir el efecto nocivo de los oxidantes. En condiciones normales, estos mecanismos son suficientes para contrarrestar la producción de radicales libres, pero en la diabetes, los antioxidantes están alterados por un aumento del estrés oxidativo (Seghrouchni *et al.*, 2002).

Otra de las alteraciones morfofisiológicas que guardan estrecha relación con el estrés oxidativo es el cáncer, aún cuando éste también se asocia con otros factores como los genéticos y ambientales, así como el tipo de agente carcinógeno al que se haya expuesto, sea químico, físico o biológico. Es importante definir que el cáncer de manera global es un fenómeno de etapas y funciones múltiples (Konigsberg, 2008).

La sobrecarga de oxidativa –derivada de reacciones inflamatorias- en diferentes patologías es la causa principal de la generación de tumores malignos, como ejemplo de ello se pueden mencionar la hemocromatosis, hepatitis viral B y C, enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa en el colon, infección por el virus del papiloma humano (VPH) y la infección por *Helicobacter pylori* en el estómago, por mencionar algunas (*Ibidem*).

Es importante dejar en claro que si bien los radicales libres tienen una importante participación en el inicio, promoción y progresión de los tumores, estas moléculas también pueden presentar efectos positivos en el tratamiento del cáncer. Si bien los radicales libres actúan activando oncogenes y desactivando genes de las proteínas supresoras de tumores, o promoviendo al tumor, también se ha demostrado que el estrés oxidativo puede sensibilizar a las células para entrar en apoptosis o tener un efecto citotóxico en las células transformadas, lo cual es el principio de la radioterapia (*Ibidem*).

Los efectos de los radicales libres en el cáncer, están en función de su concentración, así como del tiempo que dure el estrés oxidativo. Es importante señalar que, aunque muchos protocolos clínicos en donde se han usado antioxidantes para el tratamiento contra el cáncer no han tenido los resultados esperados, se ha confirmado que la estrategia para el control de estas patologías debe ser un tratamiento multifactorial, atacando varias vías que han sido modificadas en las células transformadas, pudiendo ser los sistemas generadores

de estrés oxidativo, eliminando el agente iniciador, inhibiendo los procesos angiogénicos y las vías que promueven la proliferación celular, sin afectar las células normales (Konigsberg, 2008). Esto pues, refrenda un gran reto aún para las ciencias de la salud.

## Referencia Bibliográfica

- Afaq, F, Adhami, V.M. & Ahmad, N. 2003. Prevention of short-term ultraviolet B radiation-mediated damages by resveratrol in SKH-1 hairless mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 186: 28 – 37.
- Aguirre-Crespo, F., Castillo-España, P., Villalobos-Molina, R., López-Guerrero, J. & Estrada-Soto, S. 2005. Vasorelaxant effect of Mexican medicinal plants on isolated rat aorta. *Pharmacological Biology*. 43 (6): 540 – 6.
- Alarcón, F.J., Ramos, R., Perez, G., Aguilar, C., Contreras, W. & Flores, S. 1998. Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. *Journal of Ethnopharmacology*. 61: 101 – 110.
- Agarwal, R. & Mukhtar, H. 1996. Chemoprevention of photocarcinogenesis. *Photochemistry and Photobiology*. 63 (4): 440 – 444.
- Ahmad, H. & Mukhtar, H. 1999. Green tea polyphenols and cancer: Biologic mechanisms and practical implications. *Nutrition Reviews*. 57 (3): 78 – 83.
- Anandharajan, R., Pathmanathan, K., Shankernaryanan, N.P., Vishwakarma R.A. & Balakrishnan, A. 2005. Upregulation of glut-4 and PPAR by an isoflavone from *Pterocarpus marsupium* on L6 myotubes: a possible mechanism of action. *Journal of Ethnopharmacology*. 97: 253-260.
- Arnao, M. B., Cano, A. & Acosta, M. 1998. Total antioxidant activity in plant material and its interest in food technology. *Recent Resolution of Development In Agriculture and Food Chemistry*. 2: 893 – 904.
- Atoui, A., K., Mansouri, A., Boskou G.& Kefalas P. 2005. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry* 89: 27 – 36.
- Bello, M. A. & Gutierrez, M. 1985. Clave para la identificación de la familia Loranthaceae en la porción del eje Neovolcánico localizado dentro del Estado de Michoacán. *Ciencia Forestal*. Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos. México. 10 (54): 3 – 33.

- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C. 1995. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebesm Wiss. U. Technology*. 28 (1): 25 – 30.
- Briones, A. M. & Touyz, R. M. 2010. Oxidative stress and hypertension: current concepts. *Current Hypertension Reports*. 12 (2): 135 – 42.
- Bondet, V., Brand-Williams, W. & Berset, C. 1997. Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH• Free Radical Method. *Lebesm Wiss U. Technology*. 30 (1): 609 – 615.
- Buchanan, B. B. W. G. & Jones, R. L. 2000. *Biochemistry and Molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville, MD. 298 p.
- Caballero, M. J. 1978. Estudio botánico y ecológico de la región del Río, Uxpanapa, Veracruz. *El uso Agrícola de la selva*. 3 (2): 63 – 83.
- Cantú Cabello, G. M. 2001. Actividad antioxidante de 15 plantas nativas del Estado de Nuevo León. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Bioógicas, UANL. 55 p.
- Cardenas-Quintanilla, M. J. & Hernandez-Delgado, C. T. 1986. Aislamiento y elucidación parcial de un principio activo hipoglucemiante de la plantas *Salpianthus arenarius* Tesis de Licenciatura. UNAM-ENEP-Iztacala Biología. México. 95 p.
- Céspedes-Acuña, C. L. A. & Reyes-Chilpa, R. 2006. Capítulo III: Flavonoidesen el instituto de química, una relación histórica. 63 – 88 pp. *In* Romo de Vivar, R. A. (Ed). 2006. *Química de la Flora Mexicana*. Investigaciones en el Instituto de Quimica. UNAM. 224 p.
- Cetto-Andrade, A. & Heinrich, M. 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*. 99: 325 – 348.
- Cohen, P. & Goedert, M., 2004. GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential. *Nature Reviews*. 3: 479 – 487.
- Collins, A. R. 2005. Antioxidant intervention as a route to cancer prevention. *European Journal of Cancer*. 41 (13): 1923 – 1930.

- Conforti, F., Ioele, G., Statti, G. A., Marrelli, M., Ragno, G. & Menichini, F. 2008. Antiproliferative activity against human tumor cell lines and toxicity test on Mediterranean dietary plants. *Food and Chemical Toxicology*. 46 (10): 3325 – 3332.
- Corson, T. W. & Crews, C. M. 2007. Molecular understanding and modern application of traditional medicines: triumphs and trials. *Cell*. 130 (5): 769 – 774.
- Croteau, R., Kutchan, T. M. & Lewis, N. G. 2000. Natural Products (Secondary Metabolites). *American Society of Plant Physiologists*. pp. 1250-1268.
- David, R. 2002. Actividad antiinflamatoria de los extractos de 7 plantas medicinales y del ácido Nordihidroguayaretico, compuesto activo del extracto de *Larrea tridentata* (DC.) Cov. Tesis de Licenciatura en Biología. FES Iztacala, UNAM. 198 p.
- Dominguez, X. A. 1988. Métodos de Investigación Fitoquímica. Limusa. México, pp. 81 – 90
- Espinoza-Aguilar, D. 2007. Efecto hipoglucémico de plantas de la familia Lorantaceae. UNAM- FES Iztacala. Tesis de Licenciatura en Biología. México. 67 p.
- Fabricant, D. S. & Farnsworth, N. R. 2001. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ Health Perspectives*. 109 (11): 69 – 75.
- Farnsworth, N. R. 1993. Ethnopharmacology and future drug development: the North American experience. *Journal of Ethnopharmacology*. 38 (2): 137 – 143.
- Fornelli, F., Leone, A., Verdesca, I., Minervini, F. & Zacheo, G. 2007. The influence of lycopene on the proliferation of human breast cell line (MCF-7). *Toxicology in Vitro*. 21 (2): 217 – 223.
- Franco, R., Schoneveld, O., Georgakilas, A. G. & Panayiotidis, M. I. 2008. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Letters*. 266 (1): 6 – 11.

- Galati, G. & O'Brien, P. J. 2004. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radical Biology & Medicine*. 37 (3): 287 – 303.
- García-Regalado, G. 1998. La familia Loranthaceae (injeritos) del estado de Aguascalientes, México. *Polibotánica* 007: 1 – 14.
- Gómez-Pompa A. 2002. Las raíces de la etnobotánica mexicana. *Boletín del Instituto de Ecología. A. C. y Sociedad Botánica de México*. pp. 26 – 27.
- Goodman & Gilman. 1996. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Hardman, J. G., Limbird, L. E. & Goodman-Gilman, A. (Eds). McGraw-Hill Interamericana. 9a Ed. Vol. 1. 1015 p.
- Graziano, M. N., Widmer, G. A. & Coussio, J. D. 1967. Flavonoids for the argentine mistletoe, *Psittacanthus cuneifolius*. *Phytochemistry*. 6: 1709 – 1711.
- Gros, G. E., Pomilio, A., Seldes, A. & Burton, G. 1985. Introducción al estudio de los productos naturales. Secretaría general de los Estados Americanos. Programa de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington, EUA. 147 p.
- Gutiérrez, R. 1986. Estudio del comportamiento del muérdago sobre *Quercus sp.* de la sierra de San Bias de Pabellón del estado de Aguascalientes. Tesis Profesional. Universidad Nacional Autónoma de Aguascalientes. México. 44 p.
- Halliwell, B. & Gutteridge, M. C. J. 2007. Free radicals in biology and medicine. 4<sup>th</sup> ed. Oxford University Press.
- Harborne, J. B. 1973. *Phytochemical Methods*. Ed. Chapman and Hall. USA.
- Harvey, A. L. 2007. Natural products as a screening resource. *Current Opinion in Chemical Biology*. 11: 480 – 484.
- Harrison, D.G., Gongora, M. C., Guzik, T. J. & Widder, J. 2007. Oxidative stress and hypertension. *Journal of the American Society of Hypertension*. 1 (1): 30 – 44.
- Hernández, M. M., Heraso, C., M. L. Villarreal, M. L., Vargas-Arispuro, I. & Aranda, E. 1999. Biological activities of crude plant extracts from *Vitex trifolia* L. (Verbenaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 67: 37 – 44.

- Hernández, T., Canales, M., Avila, J. G., Durán, A., Caballero, J., Romo de Vivar, A & Lira, R. 2003. Ethnobotany and antibacterial activity of some plants use in tradicional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México), Journal of Ethnopharmacology. 88: 181 – 188.
- Ibañez-Camacho, R., Meckes-Lozoya, M. & Mellado-Campos, V. 1983. The hypoglucemic effect of *Opuntia streptacantha* studied in different animal experimental models. Journal of Ethnopharmacology. 7: 175 – 181.
- Jorgensen, K., Vineter, A. R., Murant, M., Holm, A. N., Bjarnholt, N., Zagrobelny, M., Bak, S. & Lindberg, M. B. 2005. Metebolon formation and metabolic channeling in the biosynthesis of plant natural products. Current opinion in Plant Biology. 8 (3): 280 – 291.
- Joyeux, M., Lobstein, A., Anton, R. & Mortier, K. 1995. Comparative antilipoperoxidant, antinecrotic and scavenging properties of terpenes and biflavones from *Ginkgo* and some flavonoids. Planta Medica. 61 (2):6 – 129.
- Kafaru, E. 1993. Mistletoe: an example of all-purpose herb. Herbal remedies *In* Guardian Newspaper (June, 3<sup>rd</sup>). pp. 11.
- Koehn, F. E & Carter, G. T. 2005. The evolving role of natural products in drug discovery. Natural Reviews in Drug Discovery. 4: 206 – 220.
- Konigsberg, M. F. 2008. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Editorial manual moderno. México. 635 p.
- Ku, K., Chang, P., Cheng, Y. & Lien, C. 2005. Production of Stilbenoids from de callus of *Archis hypogaea*: a novel source of anticancer compound, Piceatannol. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53: 3877 – 3881.
- Linares, D., Bye, R. & Flores, B. 1999. Plantas medicinales de México, usos y remedios tradicionales. Instituto de Biología. UNAM. México. 155 p.
- Lopez-Candales, A., 2001. Metabolic syndrome X: a comprehensive review of the pathophysiology and recommended therapy. Journal do Medico 32: 283 – 300.
- Lyons, TJ. 1991. Oxidized low density lipoproteins: a role in the pathogenesis of atherosclerosis in diabetes? Diabetes Medical Research 8: 411 – 9.

- Mathiesen, L., Malterud, K.E. & Sund, R.B. 1995. Antioxidant activity of fruit exudates and C-methylated dihydrochalcones from *Myrica gale*. *Planta Medica*. 61 (6): 515 – 518.
- Martínez-Flores, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M. & Muñoz, M. J. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrition Hospital*. 17: 271 – 278.
- Nice, J. 1993. Hierbas medicinales y recetas caseras. Primera edición. Editorial Paidós. México. pp. 11-13.
- Obatomi, D. K., Bikomo, E. O. & Temple, V. J. 1994. Antidiabetic properties of the african mistletoe in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 43: 13 – 17.
- Obatomi, D.K., Aina, V.O. & Temple, V.J., 1996. Effect of African mistletoe on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *International Journal of Pharmacognosy* 34: 124 – 127.
- Oda, B. N. 2005. Introducción al análisis gráfico de datos experimentales. Facultad de Ciencias, UNAM. La Prensa Ciencias. 3ª ed. México. 212 p.
- Ogihara, T., Matsuzaki, M., Matsuoka, H., Shimamoto, K., Shimada, K. & Rakugi, H. 2005. The combination therapy of hypertension to prevent cardiovascular events (COPE) trial: rationale and design. *Hypertension Research*. 28: 331–338.
- OMS & UICC. 2005. Acción mundial contra el cáncer. Ediciones de la Organización Mundial de la Salud y Unión Internacional Contra el Cáncer. Ginebra, Suiza. 24 p.
- Ortiz-Andrade, R.R., García-Jiménez, S., Castillo-España, P., Ramírez-Ávila, G., Villalobos-Molina, R. & Estrada-Soto S. 2006.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory activity of the methanolic extract from *Tournefortia hartwegiana*: An anti-hyperglycemic agent. *Journal of Ethnopharmacology*. 109: 48 – 53.
- Osadebe, P.O., Okide, G.B. & Akabogu, I.C. 2004. Study on anti-diabetic activities of crude methanolic extracts of *Lorathis micranthus* (Linn) sourced from five different host trees. *Journal of Ethnopharmacology*. 95: 133 – 138.

- Oyama, I. & Eagle, H., 1956. Measurement of cell growth in tissue culture. *Proc. Society of Experimental Medicine*. 88: 305–307.
- Pérez, G. R. M., Ocegueda, Z. A., Muñoz, L. J. L., Avila, A. J.G. & Morrow, W.W. 1984. A study of the hypoglycemic effect of some Mexican plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 12: 253 – 262.
- Pinnell, S. 2003. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 48 (1): 1 – 19.
- Po-Lin, K., Ya-Ling, H., Cheng-Hsiung, C. & Chun-Ching, L. 2005. The mechanism of ellipticine-induced apoptosis and cell cycle arrest in human breast MCF-7 cancer cells. *Cancer Letters*. 223 (2): 293 – 301.
- Popoca, J., Aguilar, A., Alonso, D. & Villarreal, M. L. 1998. Cytotoxic activity of selected plants used as antitumorals in Mexican traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. 59: 173 – 177.
- Rates, S. M. K. 2001. Plants as source of drugs (Review). *Toxicon*. 39: 603 – 613.
- Rerup, C. & Tarding, F. 1969. Streptozotocin- and alloxan-diabetes in mice. *European Journal of Pharmacology*. 7: 89 – 96.
- Robertson, R. P. & Harmon, J. S. 2006. Diabetes, glucose toxicity, and oxidative stress: A case of double jeopardy for the pancreatic islet  $\beta$  cell. *Free radical Biology & Medicine*. 41: 177 – 184.
- Rodríguez-Cruz, M. E., Pérez-Ordaz, L., Serrato-Barajas, B. E., Juárez-Oropeza, M. A., Mascara, D. & Paredes-Carbajal, M. C. 2003. Endothelium-dependent effects of the ethanolic extract of the mistletoe *Psittacanthus calyculatus* on the vasomotor responses of rat aortic rings. *Journal of Ethnopharmacology*. 86 (1): 213 – 218.
- Rosas, L. R. 2003. Estudio etnobotánico de San Rafael-Coxcatlán. Tesis de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. FES-I. 95 p.
- Rzedowsky J. & Rzedowsky G. C. 1985. Flora Fanerogámica del Valle de México. Vol II. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN e Instituto de Ecología. México. 581 p.

- Salim, S., Asghar, M., Chugh, G., Taneja, M., Xia, Z. & Saha, K. 2010. Oxidative stress: A potential recipe for anxiety, hypertension and insulin resistance. *Brain Research* (In Press, corrected proof, online: 2010).
- Sanchez Moreno, C; Larrauri, J. & Saura Calixto, F. 1999. Free radical scavenging capacity of selected red, rosé and white wines. *Journal of Science of food and Agriculture*. 79: 1302 – 1304.
- Seghrouchni, I., Drai, J., Bannier, E., Rivière, J., Calmard, P., Garcia, I., Orgiazzi, J. & Revol, A. 2002. Oxidative stress parameters in type I, type II and insulin-treated type 2 diabetes mellitus; insulin treatment efficiency. *Clinica Chimica Acta* 321: 89 – 96.
- Serrato-Barajas, B.E. 1997. Efecto del extracto de *Psittacanthus macrantherus Eichl* sobre la presión arterial, frecuencia cardiaca y tejido intestinal aislado de rata. Tesis M. en C., Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México.
- Smirnoff, N. 2002. General Plant Metabolism. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Part A 132: S173 – S180.
- Smith, R. E. & Ashiya, M. 2007. Antihypertensive therapies. *Natural Reviews in Drug Discovery*. 6 (8): 597 – 598.
- Solano, J. J. J. 2009. Síndrome metabólico y envejecimiento. *Revista española de geriatría y Gerontología*. 44 (6): 335 – 341.
- Solis-Gracia, V. & Gómez-Sánchez, M. 2007. Inventario de las especies en la zona sur del estado de Querétaro. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Autónoma de Querétaro. México.
- Solomon, E. P., Berg, L. R. & Martín, D. W. 2008. *Biología*. McGraw-Hill Interamericana Editores. 8ª Ed. 1234 p.
- Soto, C., Recoba, R., Barrón, H., Álvarez, C. & Favari, L. 2003. Silymarin increases antioxidant enzymes in alloxan-induced diabetes in rat pancreas. *Journal of Ethnopharmacology*. 136: 205 – 212.
- Srere, P. A. 1985. Metabolon. *Trends in Biochemical Sciences*. 10 (3): 109 – 110.

- Staffileno, B. A. 2005. Treating hypertension with cardioprotective therapies: the role of ACE inhibitors, ARBs and beta-blockers. *Journal of Cardiovascular Nursing*. 20: 354 – 364.
- Suffness, M. S. & Pezzuto, M. J., 1991. Assays related to cancer drug discovery. In: Dey P.M., Harborne J.B. (Eds.). *Methods in Plant Biochemistry*. Vol. 6. New York. pp. 71 – 86.
- Surh, Y. J. 1999. Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal substances. *Mutation Research*. 428: 305 – 327.
- Tascon, R. 1997. Contribución al estudio de la flora de San Nicolás Totoloapan. UNAM. México.
- Treviño, N. J. F., Oranday, C. A., Rivas, M. C., Verde, S. M. J., Nuñez, G. M. A. & Morales, R. M. A. 2009. Potencial antioxidante en Cactáceas. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autonoma de Nuevo Leon.
- Tulp, M. & Bohlin, L. 2004. Unconventional natural sources for future drug discovery. *Drug Discovery Today*. 9: 450 – 458.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. & Mazur, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 160 (1): 1 – 40.
- Vazquez, B. C., Bautista, M. R. P., Segura, D. C. & Barral, J. A. C. 2009. *Farmacología General. Principios básicos*. FES Iztacala, UNAM. México. 215 p.
- Vergara-Galicia, J., Ortiz-Andrade, R., Rivera-Leyva, J., Castillo-España, P., Villalobos-Molina, R., Ibarra-Barajas, M., Gallardo-Ortiz, I. & Estrada-Soto, S. 2009. Vasorelaxant and antihypertensive effects of methanolic extract from roots of *Laelia anceps* are mediated by calcium-channel antagonism. *Fitoterapia*. 01911: 1 – 8.
- Villaño, D., Fernández-Pachón, M. S., Moyá, M. L., Troncoso, A. M., García-Parrilla, M. C. 2007. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*. 71 (1): 230 – 235.

- Vivanco, J. M., Cosío, E., Victor, M., Loyola-Vargas & Flores, H. E. 2005. Mecanismos químicos de defensa de las plantas. *Scientific American Latinoamérica*. X: 68 – 75.
- Wolff, S. P., Basal. Z. A. & Hunt, J. V. 1989. Autooxidative glycosylation: free radicals and glycation theory. *Prog Clinical Biology Research*. 309: 259 – 275.
- Wiernsperger, N. F. 2003. Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy. *Diabetes Metabolism*. 29: 579 – 585.
- Winterferld, K. & Dorle, E. 1992. The active material of mistletoe (*Viscum album L.*). *Archives of Pharmacy*. 280: 23 – 36.
- World Health Organization. 1999. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications: Part1: diagnosis and classification of diabetes. Geneva WHO/NCD/NCS 99. 2: 1 – 58.

## Ciberografía consultada

- International Agency for Research on Cancer. 2002. Research section – Cancer information. OMS  
[Consultado: Octubre 2009]  
<http://www.iarc.fr/en/research-groups/sec1/index.php>
- Secretaría de Salud, México  
[Actualizada: Enero, 2007]  
[Consultada: Junio, 2007]  
[http://portal.salud.gob.mx/descargas/pdf/gaceta\\_enero\\_07.pdf](http://portal.salud.gob.mx/descargas/pdf/gaceta_enero_07.pdf)
- OMS. 2010. Enfermedades cardiovasculares.  
[Actualizada: Enero, 2010]  
[Consultada: Octubre, 2010]  
[http://www.who.int/topics/cardiovascular\\_diseases/es/](http://www.who.int/topics/cardiovascular_diseases/es/)
- OMS. 2009a. Temas de salud – Cáncer  
[Consultado: Octubre 2009]  
<http://www.who.int/topics/cancer/es/>
- OMS. 2009b. ¿Aumenta o disminuye el número de casos de cáncer en el mundo? Pregunte a los expertos – Preguntas y respuestas en línea.  
[Actualización: 1 de abril de 2008]  
[Consultado: Octubre 2009]  
<http://www.who.int/features/qa/15/es/index.html>
- OMS. 2008. WHO global infobase – data for saving lives. The impact of cancer in your country – Graphs México.  
[Consultado: Octubre 2009]  
<https://apps.who.int/infobase/report.aspx?iso=MEX&rid=119&goButton=Go>