



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Evaluación del Potencial Antioxidante de *Costus
spicatus* (Jacq.) Sw., en un Modelo Murino de Cáncer.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIATURA EN
BIOLOGÍA

PRESENTA:

KARLA KARINA ROJAS FLORES

Directora de Tesis

M. en C. Catalina Machuca Rodríguez

MÉXICO, D.F. FEBRERO DE 2015





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Evaluación del Potencial Antioxidante de *Costus spicatus* (Jacq.) Sw.
en un Modelo Murino de Cáncer.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

PRESENTA

KARLA KARINA ROJAS FLORES

Tutor Principal de la Tesis: M. en C. Catalina Machuca Rodríguez

Comité Tutorial:

Presidente: Dr. Benny Weiss Steider

Vocal: M. en C. Catalina Machuca Rodríguez

Secretario: Dra. Francisca Leonora Sánchez García Figueroa

Suplente: M. en BRA. María Judith Villavicencio Macias

Suplente: M. en IBSH. Angélica Flores Ramírez

MÉXICO, D.F. FEBRERO DE 2015

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Terapia Molecular, L-7 P.A de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ) FES- Zaragoza, UNAM; bajo la dirección de la M en C. Catalina Machuca Rodríguez.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

ASUNTO: ASIGNACIÓN DE SINODALES

ESTIMADOS MAESTROS:

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", los ha nombrado como Sinodales del Examen Profesional de la alumna:

ROJAS FLORES KARLA KARINA

Quien presenta como trabajo recepcional: **Evaluación del Potencial Antioxidante de *Costus spicatus* (Jacq.) Sw., en un Modelo Murino de Cáncer.**

PRESIDENTE Dr. BENNY WEISS STEIDER

VOCAL M. en C. CATALINA MACHUCA RODRÍGUEZ

SECRETARIO Dra. FRANCISCA LEONORA SÁNCHEZ
GARCÍA FIGUEROA

SUPLENTE M. en BRA. MARÍA JUDITH VILLAVICENCIO
MACIAS

SUPLENTE M. en IBSH. ANGÉLICA FLORES RAMÍREZ

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarles.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

México, D. F., a 12 de noviembre de 2014.


M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE LA CARRERA



c.c.p. Departamento de Control de Escolar
c.c.p. Secretaría Técnica de la Carrera
c.c.p. Interesado

AGRADECIMIENTOS

A los miembros del jurado:

Dr. Benny Weiss Steider

M. en C. Catalina Machuca Rodríguez

Dra. Francisca Leonora Sánchez García Figueroa

M. en BRA. María Judith Villavicencio Macias

M. en IBSH. Angélica Flores Ramírez

Por el tiempo invertido en la revisión de este proyecto, así como sus valiosos comentarios, correcciones y críticas constructivas para hacer de este trabajo una mejor tesis, Gracias.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, por haberme formando en el ámbito profesional, con calidad y excelencia.

A la M. en C. Catalina Machuca Rodríguez por permitirme formar parte de su laboratorio, por su paciencia, sabiduría, tiempo, amistad, apoyo, por haberme brindado las herramientas necesarias para la culminación de este trabajo y por ser guía en esta etapa de mi vida, Muchas gracias.

Al Dr. Ernesto Mendoza por su amistad, su cariño, su confianza y por todas aquellas palabras de aliento en esos momentos de debilidad, por otorgarme siempre el apoyo necesario durante este trabajo, Muchas gracias.

A todos mis profesores que han contribuido con mi formación y me han forjado como persona capaz de enfrentar los retos en el área científica.

A mis compañeros y Amigos de laboratorio: Berenice, Ivon, Amairany, Pedro por sus consejos, por su apoyo, por su conocimiento, por su amistad, por su confianza y por todas aquellas cosas que hemos vivido a lo largo de la carrera y durante el laboratorio, por hacer siempre de este un lugar agradable, en verdad aprendí mucho de ustedes, Muchas gracias.

A la Comunidad del Ejido de Limón Chiquito por brindarme su atención y disponibilidad para el desarrollo de esta investigación, pero en especial a la señora Verónica Ramírez por todo el apoyo brindado, Gracias.

A todo el personal del Bioterio por su apoyo en el cuidado de los organismos utilizados en este estudio.

DEDICATORIAS

Esta tesis va dedicada a mi padre Marcial, que me ha forjado a construir un mejor camino, otorgándome palabras de aliento y sabiduría, comprensión, amor y que sin su apoyo hoy no estaría aquí, en verdad papá no me caben las palabras para expresar lo bendecida y agradecida que estoy con Dios por enviarme a una persona tan especial como tú, te amo papa.

A mi madre, Verónica, que con su infinito amor, apoyo, comprensión y confianza he podido culminar esta bonita etapa de mi vida, mami te amo, muchas gracias.

A mi abuelita Alejandra que a lo largo de mi vida me ha procurado como una hija, por su comprensión, por sus regaños, por sus cuidados, sus consejos, por su fe, por su experiencia y por su grande amor, gracias.

A mis hermanos, gracias por alegrar cada uno de mis días César, Dalia y Guadalupe que sin saberlo me han enseñado mucho. Los amo.

A toda mi familia, por creer en mí, por su amor, por su cariño, sus consejos, muchas gracias.

A Alfonso, gracias por tu amor, tu cariño, tus palabras de aliento, por tu confianza, por tu apoyo y comprensión a lo largo de esta etapa de mi vida y por formar parte de ella.

A todos mis amigos, extendiendo mi más sincero reconocimiento, pero en especial a Amy, Ale, Xóchitl y Carlos por haberme acompañado al inicio de esta bonita carrera, por sus risas, por su apoyo, por sus locas teorías, por todas esas experiencias vividas, porque con ustedes me siento especial, porque me han demostrado que los puedo llamar amigos y por estar ahí cuando más los necesito, gracias. A fanny, Isela, Luz y Pepe por su increíble amistad, su cariño, su apoyo y su increíble espíritu de hacer lo que se propongan, gracias. Y por último y no menos importante a mis Monstruos Bere e Ivon, que más que monstruos son amigas, muchas gracias por su amistad, por su camaradería por todas esas experiencias que hemos vivido y las que nos faltan por vivir, por estar ahí cuando más las necesito, por sus carcajadas, por espantarme en laboratorio, por esa complicidad, por ese apoyo, por intentar hacer de mí una defensa casi profesional del Real Zaragoza, por quedarse hasta tarde conmigo, en fin por todo eso y muchas cosas más, gracias.

Índice

I.	Resumen	1
II.	Introducción	2
III.	Marco Teórico	
3.1	Radicales libres	3
3.1.1	Mecanismos de Producción de los Radicales Libres	3
3.1.2	Mecanismos de Reactividad	3
3.1.3	Especies Reactivas	4
3.1.4	Especies Reactivas de Oxígeno	5
3.1.5	Especies Reactivas de Nitrógeno.....	6
3.1.6	Óxido Nítrico	7
3.1.7	Biosíntesis del Óxido Nítrico	7
3.1.8	Papel de los Radicales Libres en las Etapas de Carcinogénesis.....	8
3.1.9	Acción de los Radicales Libres en Diferentes Tipos de Cáncer	10
3.1.9.1	Óxido Nítrico y Cáncer de Mama	11
3.2	Mecanismos Antioxidantes.....	11
3.2.1	Clasificación del Sistema de Defensa Antioxidante	12
3.2.2	Catalasa.....	13
3.2.3	Terapia Antioxidante	14
3.3	Familia Costaceae	15
3.3.1	Género <i>Costus</i>	15
3.3.2	Clasificación Cladista de <i>C. spicatus</i>	16
3.3.3	Sinónimos.....	16
3.3.4	Nombres Comunes.....	16
3.3.5	Descripción Morfológica.....	16
3.3.6	Hábitat	17
3.3.7	Ecología	17
3.3.8	Distribución en México	17
3.4	Estudios de <i>C. spicatus</i>	
3.4.1	Estudios Químicos de <i>C. spicatus</i>	18
3.4.2	Estudios Farmacológicos	19
3.5	Etnobotánica	20
3.5.1	Etnofarmacología.....	20
3.5.2	Estudios Etnobotánicos de <i>C. spicatus</i>	21
3.6	Metabolitos Secundarios.....	22
3.6.1	Alcaloides.....	22
3.6.2	Cumarinas	23
3.6.3	Esteroides y Triterpenos Libres.....	24
3.6.4	Flavonoides	24
3.6.5	Glicósidos Cardiotónicos	24
3.6.6	Lactonas Sesquiterpénicas	24
3.6.7	Naftoquinonas y Antroquinonas.....	24
3.6.8	Saponinas.....	25
3.6.9	Taninos	25

IV.	Justificación.....	26
V.	Hipótesis	27
VI.	Objetivos	27
VII.	Metodología	
	7.1 Localidad de Colecta.....	28
	7.2 Recopilación de Información Etnofarmacológica	28
	7.3 Procesamiento del Material Vegetal	28
	7.4 Obtención de los Extractos Acuoso e Hidroalcohólico.....	28
	7.5 Identificación de Metabolitos Secundarios.....	28
	7.5.1 Alcaloides.....	28
	7.5.2 Cumarinas	29
	7.5.3 Esteroides y Triterpenos Libres.....	29
	7.5.4 Flavonoides	29
	7.5.5 Glicósidos Cardiotónicos	29
	7.5.6 Lactonas Sesquiterpénicas	29
	7.5.7 Naftoquinonas y Antroquinonas.....	30
	7.5.8 Saponinas.....	30
	7.5.9 Taninos	30
	7.6 Inducción de Cáncer en Modelos Experimentales.....	30
	7.7 Tratamiento con Extractos Acuoso e Hidroalcohólico	31
	7.7.1 Obtención de Plasma	31
	7.7.2 Obtención de Homogenado de Hígado	31
	7.7.3 Fijación de Tumores.....	31
	7.7.4 Cuantificación de Óxido Nítrico por el Método de Griess Saltzman	32
	7.7.5 Cuantificación de Proteína Total por el Método de Biuret	32
	7.7.6 Actividad de la Catalasa por el Método de Chance y Machley.....	33
	7.8 Análisis Estadístico	33
VIII.	Resultados	
	8.1 Registro Etnofarmacológico de <i>C. spicatus</i>	34
	8.2 Rendimiento de los Extractos Acuoso e Hidroalcohólico.....	35
	8.3 Análisis Preliminar Fitoquímico de los Metabolitos Secundarios presentes en los Extractos Acuoso e Hidroalcohólico de <i>C. spicatus</i>	36
	8.4 Efecto de los Extractos Acuoso e Hidroalcohólico de <i>C. spicatus</i> sobre los Niveles de Óxido Nítrico	38
	8.5 Efecto de los Extractos Acuoso e Hidroalcohólico de <i>C. spicatus</i> en la Actividad de la Catalasa	40

IX.	Discusión	42
X.	Conclusión.....	51
XI.	Referencias	52
XII.	Anexos	
	12.1 Entrevista Etnofarmacológica	63
	12.2 Reacciones Químicas utilizadas para la Identificación de Metabolitos	
	Secundarios.....	64
	12.3 Fotografías de Formación de Tumores.....	66

Índice de Figuras

Fig. 1 Origen de las ROS a través de la incorporación de electrones procedentes de los transportadores de la cadena respiratoria, responsables de la formación del anión O_2^- , que por acción de la SOD se convierte en H_2O_2 y a su vez en *OH mediante la reacción de Haber- Weiss o Fenton.

Fig. 2 Efectos biológicos del óxido nítrico. Los efectos biológicos se presentan a bajas concentraciones de (NO^*) producidas por las óxido nítrico sintasa constitutivas (cNOS); mientras que los efectos indirectos se manifiestan a concentraciones elevadas del (NO^*) debidas a las actividad de la oxido sintasa inducible (iNOS). En estas condiciones las ROS reaccionan con (NO^*) para formar las RNS.

Fig. 3 Participación de ROS/RNS en los diferentes estadios de carcinogénesis.

Fig. 4 Morfología de *C. spicatus*

Fig. 5 Distribución de *C. spicatus* en la República Mexicana

Fig. 6 Estructura química de los flavonoides presentes en los extractos metanólicos de hoja de *C. spicatus* (Jaqc.) Sw.

Fig. 7 Interdisciplinariedad de la etnofarmacología

Fig. 8 Registro Etnofarmacológico de *C. spicatus*

Fig. 9 Color de los extractos acuoso e hidroalcohólico de *C. spicatus*

Fig. 10 Pruebas colorimétricas de los extractos acuoso e hidroalcohólico de *C. spicatus*

Fig. 11 Efecto de los extractos acuosos e hidroalcohólicos de *C.spicatus* sobre la concentración de nitritos (μM /mg de proteína) en plasma de ratones hembra de la cepa CD-1.

Fig. 12 Efecto de los extractos acuosos e hidroalcohólicos de *C.spicatus* sobre la concentración de nitritos (μM /mg de proteína) en homogenado de hígado de ratones hembra de la cepa CD-1.

Fig. 13 Efecto de los extractos acuosos e hidroalcohólicos de *C.spicatus* sobre la actividad de la catalasa en plasma sanguíneo de ratones hembra de la cepa CD-1.

Fig. 14 Efecto de los extractos acuosos e hidroalcohólicos de *C.spicatus* sobre la actividad de la catalasa en homogenado de hígado de ratones hembra de la cepa CD-1.

Fig. 15 Formación de tumor en cuello (lado derecho) del ratón hembra (cepa CD-1) inducida con NiO.

Fig. 16 Tumor disectado de cuello

Índice de Tablas

Tabla 1. Especies reactivas de Oxígeno

Tabla 2. Especies Reactivas de Nitrógeno

Tabla 3 Isoformas del Óxido Nítrico sintetasa.

Tabla 4 Efectos del NO con diferentes biomoléculas y marcadores celulares

Tabla 5 Efectos de las ROS/RNS en el proceso de carcinogénesis.

Tabla 6 Sistema antioxidante enzimático y no enzimático.

Tabla 7 Fuentes antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos

Tabla 8 Ensayos clínicos de diferentes tipos de cáncer en combinación con agentes antioxidantes.

Tabla 9 Plantas con mecanismos anticarcinogénicos

Tabla 10 Estudios químicos de *C.spicatus*

Tabla 11 Estudios farmacológicos de *C. spicatus*

Tabla 12 Flavonoides identificados en extractos metanólicos de hoja de *C. spicatus*

Tabla 13 Estudios Etnobotánicos de *C. spicatus*

Tabla 14 Color y Rendimiento de los 12 extractos de *Costus spicatus* (Jacq.)Sw.

Tabla 15 Análisis Preliminar Fitoquímico de diferentes extractos de rizoma, tallo, hojas y flor de *Costus spicatus* (Jacq.) Sw. Obtenido por maceración

Abreviaturas

EO: Estrés Oxidativo

RL: Radicales Libres

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno

RNS: Especies Reactivas de Nitrógeno

RIS: Especies Reactivas de Hierro

O₂: Oxígeno

H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno

O₂⁻: Superóxido de Anión

OH[•]: Radical Hidroxilo

RS[•]: Radical tiol

ROO[•]: Radical Peroxilo

LOOH: Hidroperóxido Lípido

ONOO⁻: Radical peroxinitrilo

NO[•]: Óxido Nítrico

SON: Sintetasa de Óxido Nítrico

NO⁺: Cation Nitrosonium

NO⁻: Anión Nitroxilo

NO₂: Dióxido de Nitrógeno

ONOO⁻: Peroxinitrito

CaM: Calmodulina

FMN: Flavin Mononucleótido

FAD: Flavín Adenín Dinucleótido

TBH: Tetrahidrobiopterina

NADPH: Nicotinamida Adenine Dinucleótidofosfatada

Gc: Guanidiclasa

GS-C: Guanidil Ciclasa Soluble

Hb: Hemoglobina

AP: Sitios Apurínicos/ Apirimidínicos

uPAR: Activador de Receptor de Uroquinasa de Plasminógeno

Abreviaturas

HgCl₂: Cloruro de Mercurio (II)

KI: Yoduro de Potasio

C₂H₄O₂: Ácido acético

C₂H₆O: Etanol

Bi(NO₃)₃•5H₂O: Nitrato de Bismuto Pentahidratado

HNO₃: Ácido nítrico

H₂O: Agua

I: Yoduro

C₆H₃N₃O₇: Ácido pícrico

NaOH: Hidróxido de Sodio

HCl: Ácido Clorhídrico

FeCl₃: Cloruro de Hierro (III)

CHCl₃: Cloroformo

C₄H₆O₃: Anhídrido Acético

Mg: Magnesio

HCl: Ácido Clorhídrico

NaOH: Hidróxido de Sodio

FeCl₃•6 H₂O: Cloruro de Hierro Hexahidratado

H₂SO₄: Ácido Sulfúrico

KOH: Hidróxido de Potasio

C₆H₆: Benceno

NH₄OH: Hidróxido de Amonio

NaCl: Cloruro de Sodio

NaNO₂: Nitrito de Sodio

H₃PO₄: Ácido fosfórico

I. RESUMEN

Costus spicatus (Costaceae) mejor conocida como caña de jabalí, es una herbácea de amplia distribución neotropical. Caracterizada por presentar propiedades diuréticas, antiinflamatorias, antiespasmódicas, hipoglucémicas, astringentes, antinociceptivas y dermatológicas, las cuales han sido utilizadas en la Medicina Tradicional empleando el rizoma, tallo y hoja de dicha especie para curar principalmente afecciones relacionadas con las vías urinarias.

Aunque se conoce muy poco acerca de la fitoquímica de esta planta, estudios han reportado la presencia de flavonoides, glicósidos furastanol, diosgenina, taninos y polisacáridos bioactivos. Con base a lo anterior, uno de los objetivos en el presente estudio fue analizar fitoquímicamente los extractos acuosos e hidroalcohólicos de *C. spicatus* mediante reacciones coloridas específicas para cada metabolito secundario glicósidos cardiotónicos (Baljet, Lieberman y Keller), alcaloides (Dragendorf y Mayer), taninos (gelatina-sal), flavonoides (Shinoda), saponinas (ensayo de espuma), cumarinas (Hidroxamato férrico), antroquinonas (Bornträger), esteroides y triterpenos libres (Lieberman) y lactonas sesquiterpénicas (Lieberman e Hidroxamato férrico). El objetivo fue analizar la actividad antioxidante de forma *in vivo* administrando 400 mg/kg de extracto durante un mes, evaluando dicha actividad en la concentración de nitritos y la actividad enzimática de la Catalasa en plasma e hígado de ratón. Los resultados obtenidos muestran que los extractos hidroalcohólicos y acuosos disminuyen la concentración de nitritos en plasma e hígado, siendo mayor el efecto en los extractos hidroalcohólicos de hoja y tallo, lo que ocurrió de igual forma sobre la actividad enzimática. Se demuestra que en condiciones experimentales los extractos acuosos e hidroalcohólicos de *C. spicatus* ejercen un efecto antioxidante en ratones en los que se indujo cáncer mediante la aplicación de NiO.

II. INTRODUCCIÓN

Durante el proceso evolutivo, con la aparición de organismos fotosintéticos, el oxígeno se acumuló de manera significativa en la atmósfera terrestre, hecho que hizo posible el desarrollo de la vida aeróbica en nuestro planeta (Hansberg, 2002). Aunado a este acontecimiento los organismos aeróbicos desarrollaron los mecanismos necesarios para utilizar dicha molécula, lo que permitió a las células tener sistemas de producción de energía altamente eficientes a través de la oxidación de la glucosa (Martínez et al., 2003). Sin embargo, la utilización del oxígeno por las células, trajo como consecuencia, el aumento en la producción de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS), lo cual requirió el desarrollo de mecanismos antioxidantes (García et al., 2012). Cuando la producción de radicales libres (Especies Reactivas de Oxígeno y Especies Reactivas de Nitrógeno) supera la capacidad de los mecanismos de defensa, se desarrolla una situación bioquímica denominada estrés oxidativo (EO), la cual se caracteriza por su capacidad de reaccionar con distintas biomoléculas generando daños permanentes al DNA, implicados en la carcinogénesis (Hart et al., 2012).

Existen evidencias que relacionan la participación del estrés oxidativo en la carcinogénesis, hecho que ha conducido a la hipótesis de que los antioxidantes pueden ser útiles en su tratamiento y prevención (Coulter et al., 2003). Bajo este contexto se ha considerado a las plantas como principales fuentes bioactivas en la lucha contra el cáncer. Debido a ello el presente trabajo se enfoca a analizar el potencial antioxidante de *Costus spicatus* en un modelo murino de cáncer.

III. MARCO TEÓRICO

3.1 Radicales Libres

Los radicales libres (RL) son todas aquellas especies químicas, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera gran inestabilidad, éstos poseen una estructura birradicálica y son altamente reactivos, por lo general presentan una vida media corta lo que los hace actuar cerca del sitio en que se forman (Gutiérrez, 2002).

3.1.1 Mecanismos de Producción de los Radicales libres

La biogénesis de los RL es un proceso que acontece, y es inherente a la naturaleza aerobia de los seres vivos, siendo el resultado natural de la óxido-reducción de las moléculas orgánicas (Sáez, 2009). Esta forma de producción de RL se encuentra mediada por dos tipos de reacciones: por fusión homolítica y por fusión heterolítica, que son independientes a los factores responsables de la formación de RL, que son de dos tipos: endógenos y exógenos.

Factores Endógenos

Particularmente a nivel celular, los mecanismos de formación de los RL son tres; por transferencia electrónica, por pérdida de un protón de una molécula o bien por ruptura homolítica de un enlace covalente de cualquier molécula (Maldonado et al., 2010). Por otro lado cabe señalar que los RL también pueden generarse como consecuencia de una reacción metabólica dentro de la célula o formarse de manera espontánea si las condiciones del medio lo permiten, tal es el caso de las especies reactivas de oxígeno que pueden formarse espontáneamente por medio de dos reacciones llamadas Haber-Weiss y Fenton (Gutiérrez., 2006). Siendo una de las principales fuentes de producción de RL la cadena transportadora de electrones mitocondrial seguida por los peroxisomas y el citosol (Drögue., 2002).

Factores Exógenos

A nivel extracelular la formación de tipo aeróbica de los RL se encuentra mediada por dos tipos de factores; los físicos, tales como radiaciones ionizantes y los químicos como lo son: la contaminación ambiental, el humo de cigarrillo, algunos aditivos químicos en alimentos procesados, hidrocarburos aromáticos, ciertos xenobióticos como pesticidas, fungicidas y herbicidas (Adachi et al., 2004).

3.1.2 Mecanismos de Reactividad

La capacidad que poseen los RL de reaccionar de forma diversa y rápida con diferentes biomoléculas es debido a su configuración paramagnética, que frecuentemente lleva cambios estructurales y funcionales que tienen repercusión a nivel celular, tisular y orgánico (Sáez, 2009).

Por su alta reactividad química se les considera como especies fuertemente oxidativas que tienen como blanco a moléculas que contienen en su estructura dobles enlaces carbono-carbono o anillos de carbono, de esta manera, aminoácidos, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos que componen a macromoléculas de la célula, son alterados y afectan la función y estructura de la misma. No obstante, para que exista daño a nivel celular, los RL deben efectuar tres etapas: Iniciación, Propagación y Culminación. La iniciación consiste en la producción de RL por factores endógenos o exógenos, posteriormente se inicia la propagación que es la interacción de los RL con otras biomoléculas y al mismo tiempo la producción de más especies reactivas, iniciándose así una reacción en cadena que va disseminando el daño a través de la célula (Gutiérrez, 2006).

3.1.3 Especies Reactivas

Las especies reactivas se forman como productos del metabolismo de los RL, y aunque no todas son RL, son moléculas oxidantes que se transforman fácilmente en éstos.

Existen cuatro clasificaciones, las especies reactivas que incluyen al oxígeno (ROS), las especies reactivas de nitrógeno (RNS), las especies reactivas de hierro (RIS), así como las especies reactivas de cobre (RCS) (Martínez et al., 2003). Dentro de estas especies reactivas las más importantes a nivel celular son las ROS y las RNS, las cuales se encuentran definidas por su capacidad prooxidante, que está determinada por factores como reactividad, especificidad, selectividad y difusibilidad (Maldonado et al., 2010).

3.1.4 Especies Reactivas de Oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno ROS (Tabla 1) son compuestos que se derivan de la molécula de oxígeno (O_2) por una reducción química parcial. En este grupo se incluyen a los peróxidos de hidrógeno (H_2O_2), originados por la reducción del O_2 y las formas reactivas del oxígeno, que abarcan a los superóxidos (O_2^-) y al radical hidróxilo (HO^\bullet) (Helaine et al., 2006). No obstante en un sentido más amplio, existen otras especies como el radical tiol (RS^\bullet), el radical peroxilo (ROO^\bullet), el hidroperóxido lípido (LOOH), el radical peroxinitrilo ($ONOO^-$). Dichas especies reactivas pueden ser biogeneradas por distintos tipos celulares como lo son: los fagocitos, macrófagos, neutrófilos y fibroblastos, en compartimientos como el citosol, membrana plasmática, retículo endoplasmático, peroxisomas y en la membrana interna mitocondrial (Venereo et al., 2002).

Tabla 1. Especies reactivas de Oxígeno

Radicales		No Radicales	
$O_2^{\cdot -}$	Superóxido	H_2O_2	Peróxido de Hidrógeno
HO^{\cdot}	Radical Hidróxilo	LOOH	Hidroperóxido lípido
HO_2^{\cdot}	Radical Hidroperóxilo	Fe =O	Complejos Hierro-Oxígeno
L^{\cdot}	Radical lípido	HOCl	Hipoclorito
ROO^{\cdot}	Radical peroxilo		
$ONOO^{\cdot}$	Radical peroxinitrilo		
RS^{\cdot}	Radical tiol		
P^{\cdot}	Radical proteína		

Aunque en todos los procesos metabólicos inherentes al organismo se producen pequeñas cantidades de RL, la fuente endógena de especies reactivas más importante es el sistema mitocondrial de transporte de electrones (Fig. 1), donde las ROS se generan como producto secundario de metabolismo energético oxidativo.

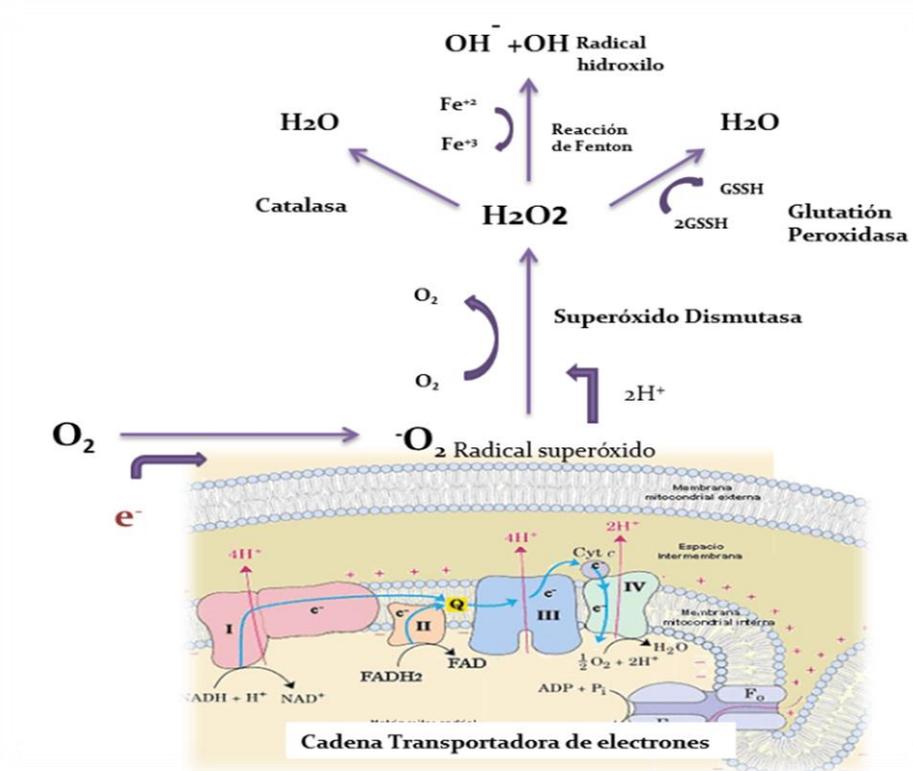


Fig. 1 Origen de las ROS a través de la incorporación de electrones procedentes de los transportadores de la cadena respiratoria, responsables de la formación del anión $O_2^{\cdot -}$, que por acción de la SOD se convierte en H_2O_2 y a su vez en $^{\cdot}OH$ mediante la reacción de Haber- Weiss o Fenton. Modificado de (Maldonado et al., 2010).

3.1.5 Especies Reactivas de Nitrógeno

Entre las especies reactivas de nitrógeno (RNS) encontramos al óxido nítrico como el representante más sobresaliente (Gutiérrez et al., 2004). El (NO^*) es un radical libre formado enzimáticamente a partir del aminoácido L-arginina al ser oxidada una de las terminales de los átomos de nitrógeno –guarnidino, proceso que se encuentra catalizado por la enzima Sintasa de Óxido Nítrico (SON) que bajo ciertas condiciones el NO^* puede originar otros radicales como: el catión nitrosonio (NO^+), anión nitroxilo (NO^-), dióxido de nitrógeno (NO_2) y peroxinitrito (ONOO^-) (Tabla 2) (Pérez et al., 2008).

Tabla 2. Especies Reactivas de Nitrógeno

Radical libre		Pro- radical	
Óxido nítrico	(NO^*)	Ácido nitroso	(HNO_2)
Dióxido de nitrógeno	(NO_2)	Catión nitrosilo	(NO^+)
		Anión nitrosilo	(NO^-)
		Tetróxido de dinitrógeno	(N_2O_4)
		Trióxido de dinitrógeno	(N_2O_3)
		Peroxinitrito	(ONOO^-)
		Ácido peroxinitroso	(ONOOH)
		Catión nitrilo	(NO_2^+)
		Alquil-peroxinitritos	(R-OONO)

Los efectos fisiológicos del (NO^*) se presentan cuando éste es producido en pequeñas cantidades por las óxido nítrico sintasas constitutivas en concentraciones $< 10\mu\text{M}$; en contraste los efectos patológicos se generan cuando el NO^* se produce en cantidades mayores, generalmente por el óxido nítrico inducible (Duchen et al., 2004). La producción excesiva de NO^* induce a la formación de RNS y una disfunción mitocondrial. Esta última asociada a diversas patologías, tales como la diabetes mellitus, la isquemia-reperfusión y diversos procesos inflamatorios (Fig. 2) (Grenfell et al., 2006).



Fig.2 Efectos biológicos del óxido nítrico. Los efectos biológicos se presentan a bajas concentraciones de NO^* producidas por las óxido nítrico sintasa constitutivas (cNOS); mientras que los efectos indirectos se manifiestan a concentraciones elevadas del (NO^*) debidas a las actividad de la óxido sintasa inducible (iNOS). En estas condiciones las ROS reaccionan con (NO^*) para formar las RNS. Modificado de (Grenfell et al., 2006).

3.1.6 Óxido Nítrico

El Óxido nítrico (NO) es un gas incoloro, oxidante, escasamente soluble en agua (< 2 mmol) que bajo condiciones estándar presenta una vida media de 3.8 a 6.2 s (Taylor et al., 2003), es inestable termodinámicamente a temperatura ambiente y se obtiene de la oxidación del amoníaco (NH₃). En estado gaseoso no tiene tendencia a formar dímeros, en estado líquido es de color azul y forma dímeros, al reaccionar con el oxígeno forma bióxido de nitrógeno (NO₂) (Sánchez, 2003).

3.1.7 Biosíntesis del Óxido Nítrico

La síntesis de NO además del sustrato L-arginina requiere la presencia de calmodulina (CaM) y de 4 cofactores: flavinmononucleótido (FMN), flavin adenina dinucleótido (FAD), tetrahidrobloptenina (TBH) y de nicotinamida adenina dinucleotidofosfato (NADPH) cuya reacción es catalizada por la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS) (Benavides et al., 2008). Cuando la CaM no se encuentra unida a la enzima, los electrones donados por el NADPH no fluyen desde el dominio reductasa hacia el dominio oxigenasa y son aceptadas por el citocromo C y otros aceptores de electrones, por el contrario en presencia de CaM los electrones donados por el NADPH son transportados por FMN hacia el grupo hemo. La L-arginina se convierte en N- hidroxialanina y posteriormente en NO y L-citrulina. Bajo estas condiciones, la NOS produce una mezcla de aniones superóxido (O⁻²) y óxido nítrico que reacciona con peroxinitritos (ONCO) que como resultado final da lugar a la citotoxicidad. (Ferrer et al., 1998). Una vez formado el NO se puede difundir hacia las células subyacentes, donde activa a la enzima guanidicilasa (Gc) que provoca el incremento de la concentración intracelular de GMPc, mediador de los efectos fisiológicos (Ferrer et al., 1998).

Se han identificado 3 isoformas de NOS producido en las células (Tabla 3); dos isoformas constitutivas calcio-dependientes: tipo I o neural y tipo III endotelial, así como una forma calcio-independiente o tipo II (Mena et al., 1999). Las cuales se encuentran ligadas a diversos procesos fisiológicos como lo son la transmisión neuronal, la relajación vascular, inhibición en la proliferación de las células de músculo liso vascular, la agregación y adherencia de leucocitos y plaquetas (Trujillo et al., 2008).

Tabla 3. Isoformas del Óxido Nítrico sintetasa (NOS). Modificado de (Ferrer Viant et al., 1998).

Isoformas	Peso molecular	Regulación	Localización
NOS tipo I	155 Kda	Ca ⁺⁺ /calmodulina	Neuronas del SNC, neuroglías, islotes del páncreas.
NOS tipo II	125 Kda	Expresión inducida por citosinas y endotoxinas.	Macrófagos, hepatocitos, células musculares lisas, neutrófilos y otros.
NOS tipo III	135 Kda	Ca ⁺⁺ / calmodulina	Endotelio vascular, riñón, plaquetas.

Numerosos autores han estudiado la participación del NO en múltiples procesos biológicos en el organismo, ya sean fisiológicos o patológicos, así como su interacción con diversas biomoléculas y marcadores celulares que ejercen diferentes efectos, como se muestra en la Tabla 4 (Marek, 1995).

Tabla 4. Efectos del NO con diferentes biomoléculas y marcadores celulares. Modificado de (Ferrer Viant et al., 1998).

	Óxido Nítrico	O ₂
DNA Citostático/citólisis	GC-S Regulación de mecanismos de transducción. Activador de NO.	Cambio de la bioactividad de NO. Daño oxidativo
Enzimas Modulación de sus funciones	Hb Disminuyendo la bioactividad de NO.	

GS-C (Guanidil ciclasa soluble), Hb (Hemoglobina)

3.1.8 Papel de los Radicales Libres en las Etapas de Carcinogénesis

La proliferación celular es un proceso controlado que permite la multiplicación de las células aumentando la cantidad de organelos y moléculas, en ocasiones este proceso de crecimiento se descontrola, y si no es corregido, las células nuevas siguen dividiéndose aunque el organismo no las necesite. De tal manera que las células antiguas no mueren cuando deberían y forman una masa llamada tumor. Esta masa de células puede escapar de la regulación del cuerpo produciendo un conjunto de enfermedades conocidas como cáncer (DeBerardinis et al., 2008).

Aunque existen diferentes vías de contraer cáncer, hay evidencias que relacionan el estrés oxidativo con el proceso tumoral (Kuchino et al., 1987), ya que la molécula del ADN es uno de los principales blancos de ataque por RL, las modificaciones que sufre dicha molécula como consecuencia de estos ataques son relevantes para la pérdida de la homeostasis celular, que se ve reflejada a través de la oxidación del material genético (Zorrilla et al., 2004).

Actualmente se han reportado al menos 100 diferentes tipos de lesiones oxidativas al ADN (García et al., 2012), lesiones que se pueden originar por: ruptura del esqueleto azúcar fosfato de una o de las dos hebras, lo que produce la pérdida de la base nitrogenada que genera sitios apurínicos o apirimidínicos (sitios AP) que promueve la ruptura de una cadena o de las dos cadenas del ADN, que a su vez provoca inestabilidad genética (Miwa et al., 2008), por modificación de bases nitrogenadas (saturación y fragmentación del anillo de timina) como la 8-hidroxi, 2'-desoxiguanosina, el timidín glicol y la 8-hidroxi-citosina (Brambilla et al., 2008) o bien por la formación de uniones cruzadas (cross links) donde el estrés oxidativo provoca mutaciones e inestabilidad genética (Tabla 5) (Bruce et al., 2002).

Tabla 5. Efectos de las ROS/RNS en el proceso de carcinogénesis.

Efectos sobre los ácidos nucleicos		Acción de radicales libres	Bibliografía
I.	Modificación de bases.	OH [•] que da lugar a más de 20 modificaciones entre ellas la 8-OH-dG, 5-hidroxi metil-2-desoxiuridina.	(Jaruga et al., 1996)
II.	Generación de sitios AP.	Ruptura del enlace glucosídico por parte del OH [•] y H ₂ O ₂ .	(García et al., 2001)
III.	Ruptura de una cadena de ADN.	Escisión de enlaces fosfodiéster por ataque de RL a la porción desoxirribosa del ADN.	(Shi et al., 1996)
IV.	Mutaciones.	Incremento en la velocidad de mutagénesis endógena, causada por ROS.	(Goncharova et al., 1996)
V.	Activación de oncogenes e inactivación de genes supresores.	Producido por O ₂ , H ₂ O ₂ oxígeno hiperbárico y el Ozono.	(Lo et al., 1996)
VI.	Daño endotelial que favorece la metástasis.	Ataque de ROS/RNS a células endoteliales causa la liberación de proteasas que degradan a la membrana basal que posteriormente generan compuestos químicos que atraen a las células tumorales.	(Lafrenie et al., 1992)

Así mismo, el cáncer es considerado como un proceso microevolutivo que comprende tres estadios: iniciación, promoción y progresión (Fig. 3), en las que se ha comprobado la participación de las ROS/RNS en el desarrollo tumoral (Guyton et al., 1993). Resaltando que la angiogénesis constituye uno de los procesos de gran importancia en el desarrollo y la difusión de células tumorales. Estudios han comprobado que bajo breves condiciones de hipoxia-reoxigenación en células endoteliales microvasculares humanas, causan la formación de ROS y la activación del factor de transcripción nuclear (NF-kappa b), acelerando significativamente el grado de neovascularización que define este proceso (Valko et al., 2007).

Fig. 3 Participación de ROS/RNS en los diferentes estadios de carcinogénesis.

Iniciación Tumoral

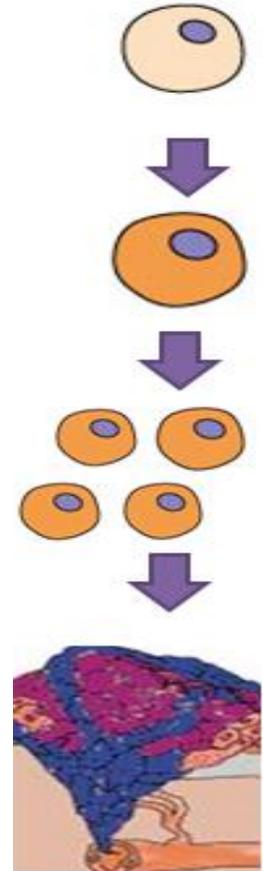
Este estadio requiere de una modificación permanente del ADN, que comienza por la formación del radical OH^\bullet generado por la interacción del H_2O_2 con Fe^{2+} o Cu^{2+} cercanos o unidos al ADN o liberados en el interior de la célula, posteriormente el incremento de Ca^{2+} intracelular activa las endonucleasas que fragmentan finalmente el material genético.

Promoción Tumoral

Las ROS inducen un incremento en la concentración de Ca^{2+} citosólico, movilizándolo desde el medio extracelular, lo que tiene como efecto la inducción de proto-oncogenes como *c-fos* además de modificar la fosforilación de factores transcripcionales por proteína quinasa C dependiente de Ca^{2+} (PKC) o de NF-kappa B que tiene bajo su control una gran variedad de genes.

Progresión Tumoral

El estadio final del cáncer es caracterizado por una proliferación excesiva de células así como la evasión del sistema inmune y la invasión a otros tejidos. En esta etapa las ROS causan lesiones adicionales en el material genético, incrementando su inestabilidad genómica acompañándose de una disminución de enzimas antioxidantes. Por otro lado se tienen evidencias que las ROS generadas por leucocitos activados pueden generar un proceso inflamatorio crónico que incrementa la progresión tumoral que va ligado a la especie reactiva involucrada y a la posición del ciclo celular en el transcurrir el ataque oxidativo.



Modificado de Zorrilla, 2004.

3.1.9 Acción de los RL en Diferentes Tipos de Cáncer

Estudios han reportado la participación de los RL en diferentes tipos de cáncer como el cáncer gástrico en el que inducen la expresión de uPAR (activador del receptor uroquinasa de plasminógeno) a través de la vía Erk-1/2 y AP1 estimulando su capacidad invasiva, aumentando la 8-oxo-dG (Kim et al., 2005). En el caso de la leucemia linfóide los RL actúan aumentando la peroxidación de MDA y 8-oxo-dG (Sánchez et al., 2006), otros tipos de cáncer en el que los RL involucran el aumento de 8-oxo-dG son los de pulmón (Feig et al., 1994) y ovario (Oliva et al., 1997), aunado a esto, en el cáncer de mama se da una acumulación de mutaciones en BRCA 1/2 (Mann et al., 2006), y en el cáncer de próstata los RL mutan p53 y ocurre una sobreexpresión de Bcl-2 (Lin et al., 2005).

3.1.9.1 Óxido Nítrico y Cáncer de Mama

Se tiene conocimiento de que la participación de la molécula de NO en la biología neoplásica es extremadamente compleja, ya que su efecto depende de varios factores como lo son: el microambiente tumoral, la concentración de la molécula, la temporalidad, el origen y las células diana (Buga et al., 2000).

Estudios han relacionado la presencia de la enzima NOS en tumores ginecológicos y de mama donde la biodisponibilidad de NO en altas concentraciones perjudica el flujo sanguíneo en el tejido tumoral, pues en el proceso carcinogénico los vasos que se forman son altamente irregulares, con uniones arteriovenosas u oclusiones (Gutiérrez, 2010), de esta forma se ha encontrado experimentalmente que la resistencia a agentes como la doxorubicina y el 5-fluoruroacilo en células de carcinoma mamario puede ser significativamente atenuada o alterada al administrar miméticos de NO (Trédan et al., 2007). Algunos estudios donde los pacientes con cáncer de mama se les ha administrado L-arginina muestran el incremento en la tasa de síntesis proteica, resultando el NO a bajas concentraciones en un mejoramiento a la respuesta tanto a nivel clínico como histopatológico (Roberts et al., 2007).

3.2 Mecanismos Antioxidantes

Las reacciones de óxido- reducción son esenciales en los procesos metabólicos, debido a ello el cuerpo humano mantiene un balance constante que preserva el equilibrio entre las sustancias generadas (Montero et al., 1996). Cuando ocurre un desbalance, el organismo posee una serie de mecanismos conocidos como defensa antioxidante (Drögue et al., 2002). Este sistema de defensa está constituido por un grupo de sustancias conocidas como “antioxidantes” que están especializados a la corta vida media, que presenta un RL y comprende moléculas pequeñas, endógenas y exógenas.

Hallwell y Gutteridge en 1999 definen a un antioxidante como cualquier sustancia que en bajas concentraciones con respecto al sustrato oxidable, retarda o previene significativamente la oxidación de ese sustrato. Como sustrato oxidable se puede considerar a casi todas las moléculas orgánicas e inorgánicas que se encuentran en las células como proteínas, lípidos, carbohidratos y moléculas de ADN. Los antioxidantes tienen como principal misión impedir la unión del O₂ con otras moléculas para evitar alteraciones en las moléculas esenciales, ejerciendo su acción tanto en medios hidrofílicos como hidrofóbicos. Su mecanismo de acción se basa principalmente en dos grupos; el primer grupo encargado de inhibir los mecanismos de activación sobre la cadena de radical y un segundo grupo que neutraliza la acción de los RL ya formados.

3.2.1 Clasificación del Sistema Antioxidante

Existen numerosas clasificaciones de los antioxidantes, de las cuales las más utilizadas establecen diferencias de acuerdo a la estructura química y función biológica, dividiéndolos en enzimáticos y no enzimáticos (Tabla 6).

Tabla 6. Sistema antioxidante enzimático y no enzimático.

Enzimáticos: protegen al organismo contra la formación de nuevos RL y a la vez reparan biomoléculas dañadas por estos.		
I. Grupo	Modo de acción	Referencias
Superóxido dismutasa (SOD)	$O_2^- \longrightarrow H_2O_2$	(Céspedes et al., 1996)
Catalasa (CAT)	$H_2O_2 \longrightarrow H_2O$	(Céspedes et al., 1996)
Glutación peroxidasa (GPx)	$H_2O_2 \longrightarrow H_2O$	(Jones et al., 2000)
Proteínas de unión a metales (GR)	Frenan disponibilidad de Fe, necesario para la formación del radical OH^\cdot	(Reitter et al., 1995)
No Enzimáticos: cuya función principal es la captura de los RL deteniendo el proceso oxidativo.		
Clasificación:	Modo de acción	
Vitamina E	Neutraliza peróxidos y captura radicales OH^\cdot	(Mayor, 2010)
Carotenoides	Neutraliza al oxígeno y captura radicales OH^\cdot	(Benítez, 2006)
Coenzima Q	Barrera fisiológica que enfrenta el O_2 a su paso desde aire a células.	(Venereo, 2002)
Vitamina C	Neutraliza al oxígeno	(Halliwell, 1990)
Billirubina	Inhibe peroxidación	(Otero et al., 2009)
Ácido úrico	Quelante	(Hernán et al., 2011)
Albúmina	Quelante	(Córdova et al., 2009)
Ácido tióctico	Transportadores de metales (Transferrina y ceruloplasmina).	(Diplok et al., 1991)

Tabla 7. Fuentes antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos

Enzimáticos		
I. Grupo	Fuente de generación	Referencias
Superóxido dismutasa (SOD)	Mitocondria (Mn-SOD), Citosol (Cu-Zn.SOD).	(Céspedes et al., 1996)
Catalasa (CAT)	En eritrocitos	(Céspedes et al., 1996)
Glutación peroxidasa (GPx)	Citosol y membranas celulares	(Jones et al., 2000)
Proteínas de unión a metales (GR)	Ribosomas	(Reitter et al., 1995)
No Enzimáticos		
Vitamina E	Semillas, frutas y verduras.	(Mayor, 2010)
Carotenoides	Verduras y frutas amarillas y naranjas.	(Benítez, 2006)
Coenzima Q	Mitocondria	(Venereo, 2002)
Vitamina C	Semillas, frutas y verduras.	(Halliwell, 1990)
Billirubina	Metabolismo de grupos hemo	(Benítez, 2006)
Ácido úrico	Metabolismo de las purinas	(Hernán et al., 2011)
Albúmina	Plasma	(Córdova et al., 2009)
Ácido tióctico	Citosol, membranas celulares y plasma	(Diplok et al., 1991)

3.2.2 Catalasa

La catalasa es una enzima antioxidante presente en la mayoría de los organismos aerobios, que cataliza la dismutación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua (H_2O) y oxígeno (O_2) (Putman et al., 2000). Dicha enzima se encuentra contenida en los peroxisomas de eritrocitos, médula ósea, mucosas y en alta concentración en hígado y riñón (Melik et al., 2001).



La función principal de la catalasa es degradar al peróxido de hidrógeno evitando así la formación de los radicales altamente reactivos como lo son el radical hidróxilo y oxígeno (Bravo et al., 1997). Hoy en día se reconocen tres grupos de catalasas: las catalasas monofuncionales, las Mn-catalasas y las catalasas peroxidadas que se encuentran en la mayoría de los organismos aeróbicos y que tienen un papel importante preventivo y de protección en procesos como la inflamación, las mutaciones, el envejecimiento y ciertos tipos de cáncer (Mora et al., 2009).

3.2.3 Terapia Antioxidante

Actualmente se tienen evidencias de participación del estrés oxidativo en la carcinogénesis y su desactivación por los antioxidantes, esto ha impulsado a estudios bajo la premisa de que la administración de formulaciones que contengan antioxidantes tome un papel preventivo y de ataque contra diversos tipos de cáncer, a esto se la denomina como terapia antioxidante (Galati et al., 2004).

Según lo descrito anteriormente, el estrés oxidativo es una alteración en el balance de óxido-reducción a favor de la sobreproducción de ROS, lo cual relacionado con la terapia antioxidante, no solo basta diagnosticar la existencia de éste, puesto que no se sabe que ROS está implicada en dicho proceso, qué antioxidante no está cumpliendo sus funciones o qué antioxidantes serían los idóneos para contrarrestarlo, bajo esta noción lo ideal sería diseñar un ensayo clínico para cada paciente cuyo objetivo tratan de cumplir las investigaciones bajo esta terapia (Hasnian et al., 2004).

Se tienen evidencias que esta terapia antioxidante puede ser combinada con los tratamientos terapéuticos convencionales para el tratamiento del cáncer como lo son la radioterapia y la quimioterapia (Tabla 8) (Hart et al., 2012). Estudios corroboran que el uso de antioxidantes de forma rutinaria para atenuar la toxicidad de los agentes quimioterapéuticos y radioterapia es posible, con la misma eficacia de dicha terapia, no obstante se reconoce que se deben diseñar ensayos clínicos controlados y aleatorizados para determinar la dosis óptima y el tiempo de administración de los antioxidantes durante estos tratamientos.

Entre los antioxidantes evaluados se encuentran las vitaminas A, C y E, la coenzima Q10, los flavonoides, los carotenos y los carotenoides (Coulter et al., 2003).

Tabla 8. Ensayos clínicos de diferentes tipos de cáncer en combinación con agentes antioxidantes.

Localización	Agente antioxidante	Resultados	Referencias
Mama	Vitaminas C y E, β -caroteno, CoQ, Se	Mejora del sistema a la respuesta tumoral.	(Marin et al., 2006)
Pulmón	Alfatocoferol, pentoxifilina y polivitaminas	No se observaron diferencias significativas.	
Esófago	Vitamina C, CoQ	Protectora contra adenocarcinoma	(Kubo et al., 2007)
Cabeza y cuello	Betacaroteno y alfatocoferol	Toxicidad reducida, no hay mejoras en calidad de vida.	
Próstata	Vitamina E y Se	No mejoró la respuesta tumoral	(Gaziano et al., 2009)

La importancia de la terapia antioxidante se ve reflejada no solo en cáncer, sino en el tratamiento de enfermedades tales como: la preclampsia en el embarazo (Rahman et al., 2002), la infertilidad (Agarwal et al., 2002), la artritis (McAlindon et al., 2005), la prostatitis (Pasqualotto et al., 2000), la diabetes (Vertugno et al., 2001) y la queratitis (Núñez et al., 2005) por citar ejemplos recientes. Por otro lado se enfatiza a la realización de ensayos clínicos de antioxidantes que surgen de la medicina tradicional o de la práctica etnomédica (Núñez et al., 2011), se ha observado que los metabolitos secundarios naturales presentes en las plantas o frutos tienen un efecto benéfico mayor que los antioxidantes sintetizados (Tabla 9), ya que existe una compleja mezcla de antioxidantes y de macro y micro nutrientes, los cuales pueden funcionar con diferentes cinéticas y dinámicas (Stanner et al., 2004).

Tabla 9. Plantas con mecanismos anticarcinogénicos

Especie	Agente antioxidante	Respuesta	Referencias
<i>Camellia sinensis</i> (té verde)	Epilocatequina galato (polifenol)	Acción inhibitoria de la invasión tumoral, la metástasis y la angiogénesis.	(Oliveira et al., 2009)
<i>Curcuma longa L.</i> (cúrcuma)	Curcumina	Inhibición de enzimas inflamatorias como la ciclooxigenasa, responsable de síntesis de eicosanoides también incrementa la expresión de enzimas antioxidantes como la glutatión reductasa y catalasa en hígado.	(Vaz-da-Silva et al., 2008)

<i>Vitis vinífera</i> L. (uvas rojas)	Polifenol	Inhibición de enzimas inflamatorias y factores de transcripción	(Oliveira et al., 2009)
<i>Arachys hypogaea</i> (cacahuete) (bayas)	Indol-3-carbinol	Inhibición de la activación metabólica de carcinógenos.	(Vaz-da- Silva et al., 2008)
<i>Brassica oleracea</i> Col	Indol-3-carbinol	Inhibición de la activación metabólica de carcinógenos.	(Vaz-da- Silva et al., 2008)
<i>Glycine max</i> (soya)		Inhibición de acciones estrogénicas implicadas en el cáncer.	(Son et al., 2008)

Otro importante blanco a tratar para la terapia antioxidante es la regulación del ciclo celular, ya que al parecer los agentes dietéticos son reguladores importantes en la proliferación del ciclo celular y moduladores específicos de proteínas asociadas a dicho ciclo, bajo este contexto los agentes dietéticos con poder antioxidante pueden controlar la regulación de la progresión del ciclo celular en células cancerosas y tener la capacidad de inhibir la progresión del cáncer en muchos órganos (Meeran et al., 2008).

3.3 Familia Costaceae

La familia Costaceae fue clasificada anteriormente como una subfamilia o tribu de la familia Zingiberaceae, datos morfológicos y moleculares confirman su relación y a la vez la separación con dicha familia (Zamora, 2006). Existen cuatro géneros y alrededor de 150 especies pantropicales en la familia, *Costus* es el género más diverso de la familia con poco más de 100 especies (Vovides, 1993). El género monoespecífico *Dimerocostus* y *Monocostus* está restringido a los neotrópicos; 2 géneros y 25 especies (Kress, 1990). La mayoría de las especies de esta familia prefieren los ambientes expuestos de climas cálidos y húmedos, como son los bordes de bosque, de carreteras y de cuerpos de agua (Spetch et al., 2006).

La distribución de la familia Costaceae en América Latina se encuentra desde México hasta Bolivia (Zamora, 2006).

3.3.1 Género *Costus*

El género *Costus* comprende a plantas herbáceas, erectas, ocasionalmente ramificadas. Hojas cuneadas, obovadas, elípticas, o redondeadas, el ápice acuminado, la base ocasionalmente cordada; lígula truncada a bilobada, su inflorescencia es un estróbilo terminal sobre el tallo vegetativo o escaposa; brácteas verdes, anaranjadas, anaranjado-rojas a rojas, anchamente ovado-trianguulares, coriáceas, a veces provistas con apéndices foliares; bractéolas dobladas en forma de canoa; cáliz corto, nunca sobrepasando las brácteas; corola amarilla, anaranjada, anaranjado-roja o roja; labelo pequeño o grande, amarillo, anaranjado, anaranjado-rojo o rojo;

lóbulo laterales algunas veces con manchas o venación roja o púrpura; estambre angostamente elíptico con anteras unidas en el medio, partes basales y labelo unidas en un tubo corto; estigma bilamelado con apéndice dorsal bilobado; ovario trilobular (MAAS, 1972).

Las especies del género *Costus* se distribuyen en los estados de Veracruz, Puebla y Yucatán en los Bosques de Pino-Encino, Bosque Tropical Caducifolio y Bosque Mesófilo de Montaña (Zamora, 2006), las especies de este género se utilizan como plantas ornamentales, por sus flores y sus brácteas coloridas, la savia agria de los tallos se usa para curar infecciones del hígado (Salinas et al., 2007).

3.3.2 Clasificación Cladista de *C. spicatus*

Clase: Equisetopsida C. Agardh.

Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superorden: Liliales Takht.

Orden: Zingiberales Griseb.

Familia: Costaceae Nakai

Género: *Costus* L

Especie: *spicatus* L.

3.3.3 Sinónimos

Alpinia spicata Jacq, *Amomum petiolatum* Lam, *Costus conicus* Stokes, *Costus cylindricus* Jacq, *Costus micranthus* Gagnep, *Costus quartus* Roem & Schult.

BDMTM. UNAM. Recuperado el 27 de agosto de 2013 de:

<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7037>

3.3.4 Nombres Comunes

Costus spicatus es denominada comúnmente como caña de jabalí, bordón de viejo, caña de venado, cañita agria, cañita de monte, vara de San José, ix chan kat paxni (tepehua), ixkayonto (otomí), ixtanchakgt paxni (totonaco), Chinanteco (mho-hui-cui), Nahuatl (Coyame-Catl). BDMTM. UNAM. Recuperado el 27 de agosto de 2013

de:<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7037>

3.3.5 Descripción Morfológica

Es una herbácea rizomatosa que mide de 1 a 2 m de altura, presenta tallos huecos con anillos articulados y cilíndricos. Hojas simples, alternas con disposición en espiral respecto al tallo, su inflorescencia consiste en una bráctea roja o amarilla de 13- 15 cm de largo (Fig. 4).

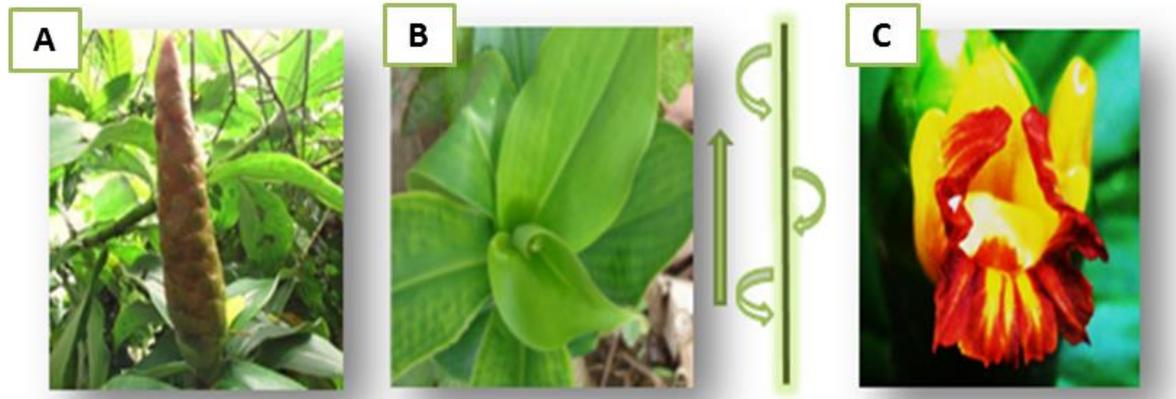


Fig. 4 A; *Costus spicatus* (Jacq.) Sw. B; Disposición en espiral de las hojas C; Inflorescencia. Rojas (2013).

3.3.6 Hábitat

Es originaria de Brasil. Habita en climas cálido, semicálido, semiseco y templado entre los 800 y los 2600 msnm. Asociada a vegetación perturbada de bosque tropical perennifolio, subperennifolio, bosque mesófilo de montaña y matorral xerófilo, observada en orillas de caminos y riachuelos, áreas baldías y actualmente cultivada en casas de la comunidad a la que pertenece. Tropicos.org. Recuperado el 7 de septiembre de 2013 de www.tropicos.org/Name/34500638?langid=66

3.3.7 Ecología

C. spicatus puede desarrollar una asociación simbiótica con ciertas especies de hormigas, las hormigas utilizan esta planta como fuente de alimento en época de floración y de protección al construir sus nidos, a su vez estas especies de hormigas protegen a las semillas en desarrollo de insectos herbívoros. INECC.org. Recuperado 7 de septiembre de 2013 de <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/download/274.pdf>

3.3.8 Distribución en México

C. spicatus se localiza en los estados de Puebla, Veracruz y Yucatán (Fig. 5), en las regiones del Coyol, Chintipán, Xalame, Huehuetlán, Coxcatlán, Tancanhuitz, Aquismón, Tanlajas y Axtla. BDMTM. UNAM. Recuperado el 27 de agosto de 2013 de: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7037>

Fig. 5 Distribución de *C. spicatus* en la República Mexicana



3.4 Estudios de *C. spicatus*

Los estudios realizados sobre la caña de jabalí son predominantemente químicos, farmacológicos, toxicológicos y botánicos.

3.4.1 Estudios Químicos

Entre los estudios químicos realizados a la especie encontramos con mayor relevancia el aislamiento y la identificación de moléculas con actividades terapéuticas, como se puede observar en la Tabla 10.

Tabla 10. Estudios químicos de *C.spicatus*

	Referencias
Aislamiento e identificación de un nuevo glucósido furastanol	Bernadete et al., 1999
Fuente de diosgenina, precursor de hormonas esteroideas	Mahato et al., 1982
Aislamiento e identificación de 2 glucósidos flavonoles.	Da Silva et al., 2000
Polisacáridos bioactivos	Da Silva et al., 2003.
Glucósidos de flavonol efecto anti-inflamatoria a través de la inhibición de algunas funciones de los macrófagos .	Fang et al., 2005
Extracto de la planta tiene propiedades antinociceptivas	Quintans et al., 2010.
Síntesis de tamarixetina y isorhamnetin 3-O-neohesperidósido	Peng et al., 2005

3.4.2 Estudios Farmacológicos

Existen pocos reportes farmacológicos acerca de *C. spicatus* (Tabla 11) pese a ser una planta de uso medicinal. No obstante, los pocos reportes sobre la farmacología de la caña de jabalí aunado a los estudios químicos realizados, muestran una importante gama de conocimientos. Tal es el caso del aislamiento e identificación de los flavonoides encontrados en extractos metanólicos de hoja (Tabla 12) (Fig. 6) que se han utilizado para la evaluación de la actividad antioxidante de *C. spicatus* de manera *in vitro* (Azevedo et al., 2014).

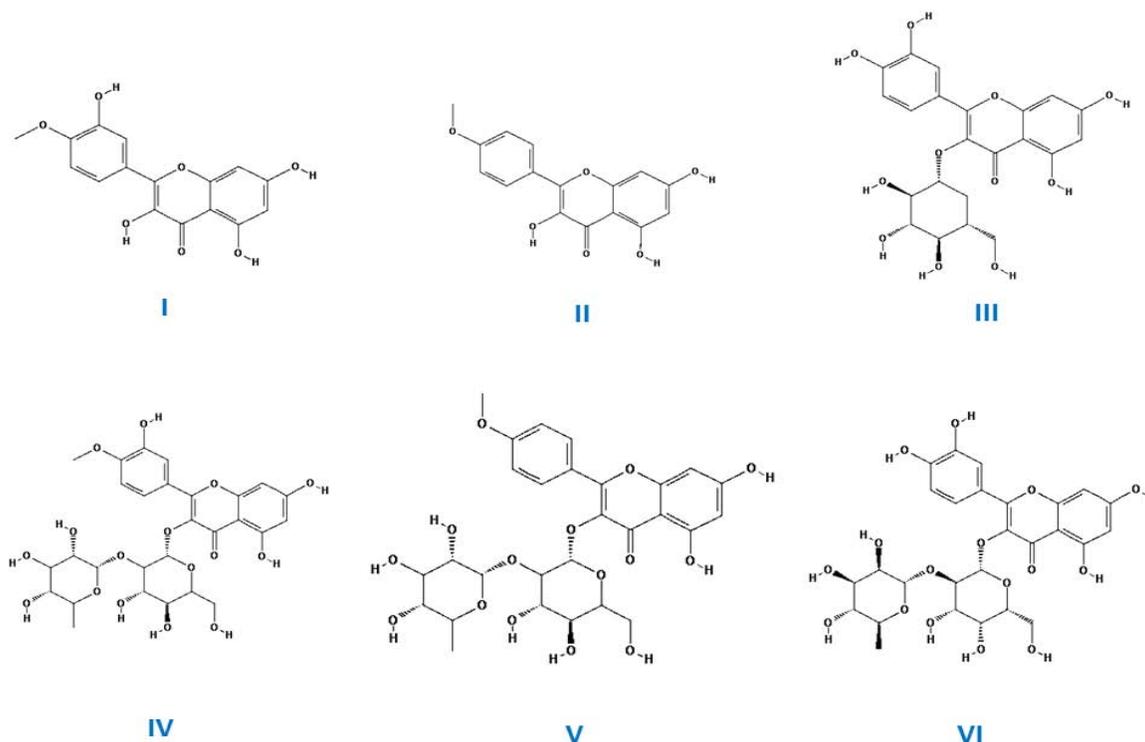
Tabla 11. Estudios farmacológicos de *C. spicatus*

	Referencias
Aspecto estructural y Fitoquímico de las partes vegetativas de <i>C. spicatus</i>	Paes et al., 2013
Tamizaje fitoquímico y actividad antioxidante de <i>C. spicatus</i>	Azevedo et al., 2014

Tabla 12. Flavonoides identificados en extractos metanólicos de hoja de *C. spicatus*

	Referencias
1. tamarixetin 3-O-β-D-glucopyranoside	(Ishak et al., 1972)
2. kaempferide 3-O-β-D- glucopyranoside	(Tiwari et al., 1979)
3. quercetin 3-O-β-D-glucopyranoside	(Kim et al., 1991)
4. tamarixetin 3-O-neohesperidoside	(Bernadete et al., 2000)
5. kaempferide 3- O-neohesperidoside	(Bernadete et al., 2000)
6. quercetin 3-O- neohesperidoside	(Bernadete et al., 2000)

Fig. 6 Estructura química de los flavonoides presentes en los extractos metanólicos de hoja de *C. spicatus* (Jacq.) Sw.



3. 5 Etnobotánica

Hoy en día se tiene conocimiento de que no existe una definición generalizada de etnobotánica, ya que se han adoptado distintas posturas según épocas y autores. En su concepción más amplia esta disciplina estudia el lugar que ocupan las plantas en la cultura y la interacción directa con las personas (Ford, 1978). Pese a ello para poder comprender la complejidad de los fenómenos estudiados, es necesaria una perspectiva interdisciplinaria que nos ofrezca un panorama amplio, debido a ello, la etnobotánica se apoya en una serie de disciplinas como la antropología, la etnografía, la botánica, la farmacología, la fitoterapia la nutrición, la agronomía, la ecología y la toxicología entre otras (Pardo et al., 2003).

Este conocimiento tradicional que hoy en día es reconocido y presentado, es el resultado de innumerables observaciones y experimentos empíricos de miles de generaciones (Eguiarte et al., 2001). Aunque las plantas han logrado inmiscuirse en todos los aspectos culturales, el trabajo etnobotánico se centra en aquellos grupos humanos cuya relación con la naturaleza es más directa, como lo son los pueblos indígenas y culturas rurales.

Para llevar a cabo estudios de esta índole se establecen fases que van desde la documentación del conocimiento tradicional, determinaciones cuantitativas, evaluaciones fitoquímicas, farmacológicas y toxicológicas, hasta el desarrollo de mecanismos para compensación a la comunidad (Bermúdez et al., 2005), con el fin de conservar la diversidad biológica y cultural (Ladio, 2006).

3.5.1 Etnofarmacología

La etnofarmacología es un área de la etnobotánica que es definida como la exploración científica interdisciplinaria (Fig. 7) de los agentes biológicamente activos y tradicionalmente empleados o conocidos por el hombre (Rivera, 2006).

Se sabe que desde hace muchos años las plantas han sido utilizadas colectivamente como remedios caseros y que de esa forma se administran dosis que hacen posible tratar cierta afección, obteniendo resultados favorables. A las plantas que reúnen esta característica se les conoce como “plantas medicinales”, las cuales contienen uno o más principios activos, que administrados en la dosis adecuada, producen un efecto curativo frente a las afecciones del hombre y de los animales (OMS, 2002).

Fig.7 Interdisciplinariedad de la etnofarmacología



3.5.2 Estudios etnobotánicos

Los estudios etnobotánicos realizados a *C. spicatus* muestran las estructuras de la planta que tienen mayor uso en la medicina tradicional (Tabla 13), así como sus propiedades terapéuticas y su forma de uso.

Tabla 13. Estudios etnobotánicos de *C. spicatus*.

Categoría de Uso	Parte Utilizada	Propiedad Terapéutica	Forma de Uso	Referencias Bibliográficas
Medicinal	Rizoma	Diurético	Infusión	Manfred, 1947
Medicinal	Rizoma	Diarrea	Agua de tiempo	Cruz, 1965
Medicinal	Rizoma	Hipoglucémico	Infusión	Gasparri, 2005
Medicinal		Disentería		Cruz, 1965
Medicinal		Resfriado	Infusión	Cruz, 1965
Medicinal	Tallo y hojas	Paño		
Medicinal	Tallo	Mal de orín	Tallo remojado en agua hasta que se desprenda la capa delgada de éste.	BDMTM, UNAM.
Medicinal	Hojas	Curar ronchas y granos y para desinfectar la sangre		BDMTM, UNAM.
Medicinal	Hojas	Purgante	Cocción de las hojas	BDMTM, UNAM.
Medicinal	Hojas	Infecciones de la vista		BDMTM, UNAM.

BDMTM. UNAM. Recuperado el 2 de Noviembre de 2013 de:

<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7037>

3.6 Metabolitos Secundarios

Las plantas, al igual que los animales, los hongos, las algas y las bacterias realizan funciones fisiológicas en las que están implicadas rutas metabólicas, como lo son la respiración y la síntesis de proteínas que son esenciales para mantener la vida (Taiz et al., 2006). A diferencia de los animales y los hongos, las plantas, las algas y algunas bacterias tienen la capacidad de llevar otra función metabólica igualmente esencial, la fotosíntesis, por la cual se generan compuestos derivados de una serie de reacciones que sintetizan una compleja gama de sustancias (Segler, 2001). A dichas sustancias se les denomina principios activos, los cuales se encuentran en distintos órganos de la planta y alteran el funcionamiento de órganos y sistemas del cuerpo humano (Pengelly, 1996). Estas sustancias se clasifican en grupos, según su estructura química; a los productos resultantes de los procesos químicos que intervienen de forma directa en la supervivencia, crecimiento y reproducción de la planta se les denomina metabolitos primarios. A los productos que no son esenciales para el metabolismo de la planta y que son sintetizados como defensa o adaptación se les conoce como metabolitos secundarios, los cuales son los más importantes principios bioactivos desde el punto de vista científico (Bruneton, 2001).

Dentro de los metabolitos secundarios con mayor relevancia por su actividad biológica encontramos a los alcaloides, cumarinas, esteroides y triterpenos, flavonoides, glicosidos cardiotónicos, lactonas sesquiterpénicas, quinonas, saponinas, taninos, entre otros, que presentan gran interés para la industria farmacéutica (Kliebenstein, 2004).

3.6.1 Alcaloides

Los alcaloides constituyen el grupo más grande de metabolitos secundarios en las plantas, pueden encontrarse mayoritariamente en hojas (cocaina, nicotina, pilocarpina), en flores (escopolamina, atropina), en frutos (alcaloides del opio, peletiarina, coniina), en semillas (piperina, arecolina), en corteza (quinina, tubocurarina) y en la raíz (emetina y cefalina); al estado libre como glicósidos o formando sales con ácidos orgánicos (Arango, 2008).

No existe una definición exacta para los alcaloides, pero se puede considerar como: “Compuestos orgánicos de origen natural, derivados generalmente de aminoácidos, de carácter más o menos básico, de distribución restringida, con propiedades farmacológicas importantes a dosis bajas y que responden a reacciones comunes de precipitación” (Maldoni, 1991). Este grupo de metabolito secundario es el de mayor interés en la farmacognosia debido a sus propiedades anestésicas, analgésicas, sedantes, antisépticas que ejercen su actividad sobre el sistema nervioso central excitándolo o deprimiéndolo.

3.6.2 Cumarinas

Las cumarinas son compuestos ampliamente distribuidos en las plantas, principalmente en las familias Umbeliferae y Rutaceae; se encuentran presentes en la raíz, flores y frutos. Consideradas estructuralmente como derivados lactónicos del ácido o-hidroxiz-cinámico, se caracterizan por poseer una variedad de patrones de oxigenación sobre el núcleo de la benzopirona, siendo la oxigenación en C-7 la más común entre las cumarinas naturales (Arango, 2010).

Presentan un amplio rango de actividad biológica, como la acción anticoagulante y antibacterial del dicumarol, la acción antibiótica de la novobiocina, la hepatotoxicidad y carcinogenicidad de ciertas aflatoxinas, la actividad astrogénica del cumestrol, la acción fotosensibilizadora de furanocumarinas como el bergapteno y la xantotoxina, la acción insecticida de los surangin A y B (Lacy et al., 2004).

3.6.3 Esteroides y Triterpenos libres

Los terpenoides están formados por la unión de un número entero de unidades de isopropeno (C_5). Según este número se clasifican en: monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), Triterpenos (C_{30}), carotenos (C_{40}), politerpenos (C_n). Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y constituyen un numeroso y diverso grupo de metabolitos secundarios, con más de 100 esqueletos distintos. Presentan propiedades antiinflamatorias, antihipertensivas y antioxidantes (Bruneton, 2008).

3.6.4 Flavonoides

Los flavonoides constituyen una clase de compuestos polifenólicos de amplia distribución en el reino vegetal. Son fenilbenzopironas de bajo peso molecular derivados de la unión de tres anillos (A, B, C) dos de ellos aromáticos, pigmentos heterocíclicos que contienen oxígeno, constituyendo la mayoría de los colores amarillo, rojo y azul de las plantas y frutas (Escamilla et al., 2009). Se reconocen al menos diez clases de flavonoides que se encuentran presentes en todas las estructuras de la planta, algunas clases se encuentran más ampliamente distribuidas que otras, siendo más comunes las flavonas y flavonoles y más restringidas en su ocurrencia las isoflavonas, las chalconas y las auronas (Martino, 2000).

Los flavonoides son reconocidos por presentar actividades como: fragilidad capilar (bioflavonoides del Género Citrus: rutina y derivados), dilatación coronaria (protocianidinas de Crataegus, Árnica y Ginkgo), espasmolítica (glicosidos de arpigénina), antihepatóxica (silimarina de Sylybum), colerética, estrógena, diurética y antioxidante, esta última resulta de una combinación de sus propiedades quelantes de hierro y secuestradoras de RL (Martínez et al., 2002).

3.6.5 Glicósidos Cardiotónicos

Los glicósidos cardiotónicos son sustancias constituidas de una porción esteroide, una porción glicosídica y un anillo de γ -lactona α,β -insaturada o δ -lactona- α,β -insaturada, que actúan sobre el músculo cardíaco y por tanto se utilizan como medicamentos contra la insuficiencia cardíaca (Martínez, 2002). Se clasifican según el anillo lactónico en dos grandes clases: los cardenolidos, con anillo de γ -lactona, y los bufanolidos o escilanolidos, con anillo de δ -lactona (Domínguez, 1990). Su distribución natural se encuentra principalmente en las hojas de plantas de las familias Scrofulariaceae, Apocynaceae, Liliaceae, Ranunculaceae y Moraceae. Estos metabolitos han sido considerados de gran interés por su acción tónica y fortalecedora del corazón, ya que participa en la regulación de la actividad cardíaca además de su potencial anticancerígeno (Martínez, 2002).

3.6.6 Lactonas Sesquiterpénicas

Las lactonas sesquiterpénicas son metabolitos secundarios constituyentes característicos de la familia de las compuestas. Se han encontrado en familias como Magnoliáceas, Umbelíferas, y Lauráceas y se clasifican comúnmente de acuerdo con el tipo de núcleo que poseen y los sustituyentes que los componen, denominando la terminación ólido como presencia del grupo funcional lactona, debido a la gran diversidad estructural que presentan, no se cuenta con normas claras para definir su nomenclatura (Coll et al., 2007). Poseen actividad antibacteriana y antifúngica, además de ser las responsables del sabor amargo de muchas drogas como el cardo santo (*Cnicus benedictus*), el ajenjo (*Artemisia absinthium*) o el diente de león (*Taraxacum officinale*).

3.6.7 Naftoquinonas y Antroquinonas

Las quinonas naturales son un grupo de compuestos cuya coloración puede ser desde el amarillo pálido hasta casi negro, se encuentran frecuentemente en la corteza, en el corazón de la madera o de la raíz, y en algunos casos en las hojas, donde su color esta enmascarado por otros pigmentos. Se encuentran ampliamente distribuidas en diferentes taxas y se dividen en benzoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas y quinonas isoprenoides, que son sintetizados por la ruta de los poliacetatos, que a su vez pueden contener diversos grupos funcionales, anillos de furano/pirano o encontrarse como dímeros que pueden ser parcialmente reducidos como los antroles y antronas (Bruneton, 2001).

Además de las propiedades tintóreas de las naftoquinonas y antroquinonas, se han descrito importantes actividades biológicas destacando como agentes antiparasitarios, antibacterianos, antifúngicos y anticancerígenos (Thomson, 1957). En la medicina tradicional las naftoquinonas naturales que han sido aisladas y destacan por su uso son las siguientes: lawsona, juglona, plumbagina, lapachol, alkalina y shikona (López et al., 2011).

3.6.8 Saponinas

Se conoce como saponinas al grupo de glicósidos esteroides con núcleo espiroetano que tienen la propiedad de hemolizar glóbulos rojos y de disolverse en agua disminuyendo la tensión superficial, por lo tanto, al agitar sus soluciones, se formará una espuma abundante y relativamente estable que es la principal característica que las determina, tienen un sabor amargo y acre, y las drogas que los contienen suelen ser estornudatorios e irritantes de la mucosa (Martínez, 2001).

En la actualidad se conocen más de 200 saponinas esteroidales, localizadas en las monocotiledóneas y dicotiledóneas, de las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en toda la estructura de la planta. Presentan propiedades expectorantes que deben emplearse con precaución, ya que a dosis altas son irritantes y hemolíticos por su uso interno; también son muy utilizadas como coadyuvantes de la acción de otras plantas, ya que facilitan la absorción de los principios activos incrementando su eficacia (Ávalos et al., 2009).

3.6.9 Taninos

Los taninos comprenden un gran número de sustancias complejas que están ampliamente distribuidas en el reino vegetal, en casi en todas las familias vegetales existen especies que los contienen. Los taninos son compuestos químicos no cristalizables que forman con el agua soluciones coloidales, de reacción ácida y de sabor muy acre. Producen la precipitación de soluciones de gelatina y de alcaloides, precipitan las proteínas en solución y se combinan con ellas haciéndolas resistentes a las enzimas proteolíticas. Se dividen en: hidrolizables, que pueden ser galotaninos o elegitaninos que contienen unidades de glucosa en su constitución y condensados o no hidrolizables o catéquicos los que en presencia de ácido y calor se degradan dando subproductos rojizos denominados flobáfenos (Van Ginkel, 2003).

En medicina se emplean como astringentes del extracto gastrointestinal y de las escoriaciones de la piel. En el tratamiento de las quemaduras las proteínas de los tejidos expuestos precipitan y forman una capa protectora antiséptica bajo la cual tiene lugar a la regeneración de los tejidos, además presenta propiedades antibacterianas y antiinflamatorias (Ávalos et al., 2009).

IV. Justificación

El cáncer es una de las causas principales de muerte en México y en el mundo. Reportes de la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC, 2014) y la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2013) le atribuyen aproximadamente 7,6 millones de defunciones a nivel mundial, ocupando nuestro país el tercer lugar con más de 128 000 casos al año. Reportándose entre los más ocurrentes el cáncer de próstata, mama, cérvix, pulmón y estómago, siendo más vulnerable ante este padecimiento la población femenina.

Hoy en día se tiene conocimiento de que existen diversos factores que ocasionan esta enfermedad. No obstante, en los últimos años se ha dado un realce significativo a uno de ellos, al estrés oxidativo, definiéndolo como el continuo desbalance entre las ROS y RNS cuando se supera la barrera de defensa antioxidante. Aunque diversos estudios han corroborado la participación del estrés oxidativo en la carcinogénesis y han descifrado parte de la bioquímica del proceso, aún no se conoce el tratamiento idóneo para tratar esta enfermedad de manera selectiva.

Debido a ello, diversos estudios se han enfocado a las plantas medicinales, como principal fuente de sustancias bioactivas, con el objetivo final de encontrar fitofármacos que a ciertas dosis puedan regular de manera selectiva el proceso de carcinogénesis. Ante esta situación el presente estudio realizado en extractos de rizoma, tallo, hoja y flor de *Costus spicatus* (Jacq.) Sw. se enfoca al potencial efecto antioxidante que pueda ejercer esta especie en dicho proceso.

V. Hipótesis

Si en los extractos acuosos e hidroalcohólicos de *Costus spicatus* existen moléculas que pueden regular el potencial redox en el sistema, se espera que dichas moléculas estimulen la respuesta antioxidante.

VI. Objetivos

❖ General

Evaluar el potencial antioxidante de los extractos hidroalcohólico y acuoso de rizoma, hoja, tallo y flor de *Costus spicatus* en un modelo murino de cáncer.

❖ Específicos

- Registrar la información etnofarmacológica de *Costus spicatus*
- Analizar fitoquímicamente los extractos hidroalcohólico y acuoso de rizoma, tallo, hojas y flor de *Costus spicatus*.
- Determinar la concentración de nitritos en plasma e hígado de ratones de la cepa CD-1 tratados con extractos acuosos e hidroalcohólicos.
- Evaluar el efecto de los extractos acuoso e hidroalcohólico de *C. spicatus* sobre la actividad enzimática de catalasa en hígado y sangre periférica de ratón.

VII. Metodología

7.1 Localidad de Colecta

El proceso de colecta de *C. spicatus* se realizó en dos periodos correspondientes al mes de septiembre y noviembre; la primera colecta se realizó el 6 de septiembre de 2013 en la Congregación Limón Chiquito, Cazones de Herrera Veracruz (20° 40' 44.4" N, 97° 16' 43.5" O a 15 msnm) y la segunda colecta fue realizada el 4 de noviembre de 2013 en la misma localidad, esto con el fin de coleccionar a la especie cuando presenta época de floración. La especie fue identificada y cotejada en el herbario MEXU, UNAM.

7.2 Registro de Información Etnofarmacológica

La información etnofarmacológica se obtuvo al realizar entrevistas (Anexo 1) dirigidas únicamente a los habitantes de la localidad que han utilizado dicha especie, siguiendo rubros específicos como el sexo y edad de los individuos que la utilizan, forma de preparación, frecuencia de uso, forma de administración, dosis empleada y padecimiento.

7.3 Procesamiento del Material Vegetal

El rizoma, el tallo, las hojas y las flores de *Costus spicatus* (Jacq) Sw. fueron separados y lavados exhaustivamente con agua destilada. Posteriormente cada estructura se trituró en un molino de mano.

7.4 Obtención de los Extractos (Hidroalcohólico y Acuoso)

Preparación del Extracto Hidroalcohólico

Cada 100 g de material vegetal molido de *C. spicatus* fueron colocados en 500 ml de una mezcla etanol-agua (70:30) y preservados en frascos ámbar durante un mes. Posteriormente cada extracto se filtró al vacío (Papel Whatman No.1) y se concentró en cristalizadores a temperatura ambiente en una campana de extracción.

Preparación del Extracto Acuoso

Cada 100 g de material vegetal previamente triturado en un molino de mano fueron sometidos a un cocimiento con 500 ml agua, la disolución fue filtrada con una gasa y conservada en frascos ámbar a 4° C.

7.5 Identificación de Metabolitos Secundarios

7.5.1 Alcaloides

Las técnicas de identificación para este metabolito secundario se basan en la capacidad que presentan en estado de sal (extractos ácidos) de combinarse con el yodo y metales pesados como bismuto, mercurio, tungsteno formando reacciones de precipitación que se basan en un

intercambio del anión del reactivo en acción, que reemplaza a los aniones que conforman las sales de los alcaloides.

Para su identificación se utilizaron los reactivos de Mayer, Dragendorff y Wagner (Anexo 2) utilizando un stock de cada extracto concentrado de 10 mg/mL haciendo disoluciones de 2 mg/mL, 4 mg/mL, 6 mg/mL, 8 mg/mL y 10 mg/mL y observando la coloración correspondiente para cada reacción.

7.5.2 Cumarinas

Para su identificación se utilizaron los reactivos de Baljet e Hidroxamato Férrico (Anexo 2), utilizando un stock de cada extracto concentrado de 10 mg/ml haciendo disoluciones de 2 mg/mL, 4 mg/mL, 6 mg/mL, 8 mg/mL y 10 mg/mL y observando la coloración correspondiente para cada reacción, haciendo constar que las dos pruebas deben de dar positivo para confirmar la presencia de cumarinas.

7.5.3 Esteroides y Triterpenos Libres

El reactivo de Liebermann Burchard fue utilizado para su detección (Anexo 2), la reacción se llevó a cabo en un medio anhidro utilizando un stock de cada extracto concentrado de 10 mg/mL haciendo disoluciones de 2 mg/mL, 4 mg/mL, 6 mg/mL, 8 mg/mL y 10 mg/mL.

7.5.4 Flavonoides

Para su detección se utilizó un stock de cada extracto concentrado de 10 mg/mL haciendo disoluciones de 2 mg/mL, 4 mg/mL, 6 mg/mL, 8 mg/mL y 10 mg/mL se preparó la reacción de Shinoda (Anexo 2) y se observó la coloración de la reacción.

7.5.5 Glicósidos Cardiotónicos

Se utilizó un stock de 10 mg/mL de cada extracto concentrado haciendo disoluciones de 2 mg/mL, 4 mg/mL, 6 mg/mL, 8 mg/mL y 10 mg/mL, posteriormente se prepararon los reactivos para las reacciones de Baljet, Keller-Killiani y Lieberman Burchard (Anexo 2), se adicionaron los reactivos por separado a cada uno de los extractos observando su coloración. Para su correcta identificación las tres pruebas deben dar positivo.

7.5.6 Lactonas Sesquiterpénicas

Los reactivos de Hidroxamato Férrico y Lieberman Burchard (Anexo 2) fueron aplicados para su detección, utilizando un stock concentrado de 10 mg/mL haciendo disoluciones de 2 mg/mL, 4 mg/mL, 6 mg/mL, 8 mg/mL y 10 mg/mL; cabe mencionar que ambas pruebas deben dar positivo para su correcta identificación.

7.5.7 Naftoquinonas y Antroquinonas

La reacción de Bornträger Krauss (Anexo 2) fue utilizada para su detección, utilizando un stock concentrado de 10 mg/ml de cada extracto acuoso e hidroalcohólico, haciendo disoluciones de 2 mg/mL, 4 mg/mL, 6 mg/mL, 8 mg/mL y 10 mg/mL y observando la coloración correspondiente.

7.5.8 Saponinas

Se aplicó el ensayo de Espuma y de Lieberman Burchard (Anexo 2) haciendo disoluciones de 2 mg/mL, 4 mg/mL, 6 mg/mL, 8 mg/mL y 10 mg/mL, partiendo de un stock con una concentración de 10 mg/mL.

7.5.9 Taninos

Para su identificación se preparó el reactivo de Gelatina- Sal (Anexo 2), aplicándolo a los extractos acuoso e hidroalcohólico en disoluciones de 2 mg/mL, 4 mg/mL, 6 mg/mL, 8 mg/mL y 10 mg/mL, partiendo de un stock de 10 mg/mL.

7.6 Inducción de Carcinoma a Modelos Experimentales

Para la realización de esta investigación se utilizaron 60 ratones hembra de la cepa CD-1 correspondientes a 1 mes de edad. La inducción de carcinoma a dichos modelos experimentales se realizó mediante el método estandarizado por Ortiz et al., 1995. El cual consistió en la administración de una dosis única intramuscular de 20 mg/kg de NiO en 0.05 ml de aceite de olivo (Sigma, grado RA) a 8 grupos (6 ratones hembra, CD-1) que fueron delimitados de la siguiente manera:

- Grupo I:** Control negativo (Sin inducción de carcinoma)
- Grupo II:** Vehículo (Aceite de Oliva)
- Grupo III:** Control positivo (Inducción de cáncer con NiO)
- Grupo IV:** Experimental (Inducción de cáncer con NiO)
- Grupo V:** Experimental (Inducción de cáncer con NiO)
- Grupo VI:** Experimental (Inducción de cáncer con NiO)
- Grupo VII:** Experimental (Inducción de cáncer con NiO)
- Grupo VIII:** Experimental (Inducción de cáncer con NiO)
- Grupo IX:** Experimental (Inducción de cáncer con NiO)
- Grupo X:** Experimental (Inducción de cáncer con NiO)

La inducción de carcinoma fue realizada el 23/10/13, manteniendo a los organismos en condiciones de Bioterio hasta el momento de sacrificio.

7.7 Tratamiento con Extractos Hidroalcohólico y Acuoso

Después de los tres meses de inducción de carcinoma con NiO (23/01/14), se administró una dosis diaria (400 mg/kg) (Lucindo et al., 2010) de cada extracto hidroalcohólico y acuoso correspondiente a cada estructura vegetal de *C. spicatus* durante 1 mes, que fue el periodo de aplicación obtenido de las revistas etnofarmacológicas. La aplicación de tratamientos fue delimitada de la siguiente manera:

Grupo I: Control negativo (Sin inducción de carcinoma)

Grupo II: Vehículo (Aceite de Oliva)

Grupo III: Control positivo (Inducción de cáncer con NiO)

Grupo IV: Experimental (Inducción de cáncer con NiO + Extracto Acuoso de Rizoma)

Grupo V: Experimental (Inducción de cáncer con NiO + Extracto Acuoso de Tallo)

Grupo VI: Experimental (Inducción de cáncer con NiO + Extracto Acuoso de Hoja)

Grupo VII: Experimental (Inducción de cáncer con NiO + Extracto Hidroalcohólico de Rizoma)

Grupo VIII: Experimental (Inducción de cáncer con NiO + Extracto Hidroalcohólico de Tallo)

Grupo IX: Experimental (Inducción de cáncer con NiO + Extracto Hidroalcohólico de Hoja)

Grupo X: Experimental (Inducción de cáncer con NiO + Extracto Hidroalcohólico de Flor)

7.7.1 Obtención de Plasma

Los grupos experimentales fueron sacrificados por decapitación (23/02/14), la sangre obtenida se colectó en tubos con EDTA, los cuales fueron centrifugados a 5000 rpm durante 5 min, preservando una temperatura de 4° C y almacenados en hielo hasta el momento de su análisis.

7.7.2 Obtención de Homogenado de Hígado

Se realizó una extirpación de hígado a los organismos sacrificados, posteriormente cada hígado fue sometido a un lavado con solución fisiológica de NaCl al 0.9% y perfundido con PBS, almacenados a 4° C hasta el momento de su análisis.

7.7.3 Fijación de Tumores

Se procedió a una observación macroscópica de todos los órganos y cavidades de los organismos sacrificados. En aquellos que presentaban una metástasis tumoral, se extirpó dicha masa tumoral, se pesó y se calculó el volumen tumoral mediante la siguiente fórmula: $V: 4/3 \pi (a*b^2)$; donde a: es el semieje de mayor tamaño y b el semieje menor. Posteriormente se fijaron las muestras utilizando formol al 10%, así como la Solución de Bouin (Anexo 2).

7.7.4 Cuantificación de NO por el Método de Griess- Saltzman

La reacción de Griess se basa en la formación de un cromóforo magenta por la reacción de la sulfanilamida con nitrito en medio ácido, seguido de un acoplamiento con aminas bicíclicas como la N-(1-naftil) etilendiamina. Esta reacción detecta el NO^-2 en una gran variedad de líquidos biológicos y experimentales, entre los que se encuentra el plasma, suero, orina y medios de cultivo celular. Para su cuantificación se construyó una curva patrón con una solución stock de NaNO_2 (J.T. Baker, grado RA), en concentración de 0 a 100 μM , la cual se leyó a 540 nm en el espectrofotómetro UV (Genesys 20, 4001/4, Thermo Fisher Scientific); una vez obtenidas las lecturas de la correspondiente curva patrón, se procedió a tratar las muestras de plasma e hígado de cada ratón. Para ello se tomaron 50 μl de muestra, adicionando de manera secuencial 1 ml de sulfanilamida (J.T. Baker, grado RA) al 1% (p/v) en H_3PO_4 (J.T. Baker, grado RA) al 5% (v/v) incubando durante 15 min a temperatura ambiente en la oscuridad, posteriormente se agregó 1 ml de diclorhidrato de N-(1-naftil) etilendiamina (J.T. Baker, grado RA) incubando durante 15 min en oscuridad a temperatura ambiente, una vez transcurrido el tiempo, las muestras fueron leídas a 540 nm en el espectrofotómetro UV (Genesys 20, 4001/4, Thermo Fisher Scientific).

7.7.5 Cuantificación de Proteína Total por el Método de Biuret

Protocolo basado en la formación de un complejo colorimétrico entre el Cu^{2+} y los grupos NH de los enlaces peptídicos en medio básico. La intensidad de coloración es directamente proporcional a la cantidad de enlaces peptídicos presentes en la muestra. Para su cuantificación se construyó una curva patrón partiendo de una solución stock de albúmina de huevo (Sigma) [10 mg/ml], realizando disoluciones pertinentes de 0 a 10 mg/ml de concentración, se añadieron 2 ml de Reactivo de Biuret, se incubó a 20 min en temperatura ambiente y se leyó a 545 nm en el espectrofotómetro UV (Genesys 20, 4001/4, Thermo Fisher Scientific). Una vez obtenida la curva patrón se procedió a tratar las muestras, tomando alícuotas de 50 μl a las cuales se les adicionó de manera secuencial 2 ml de Reactivo de Biuret, incubándose por 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente las muestras fueron leídas a 545 nm de absorbancia en el espectrofotómetro UV (Genesys 20, 4001/4, Thermo Fisher Scientific).

7.7.6 Actividad de la Catalasa por el Método de Chance y Machley

Se fundamenta en el principio de que la enzima catalasa es capaz de reducir el H_2O_2 en H_2O y $\frac{1}{2}$ de O_2 (Chance et al., 1954). Para cuantificar dicha reacción se midió la descomposición del H_2O_2 a 240 nm en el espectrofotómetro UV (UNICO, S-2150 UV). Se tomaron 50 μl de la muestra adicionándolo en 2950 μl de sustrato (H_2O_2 27 mM en solución PBS, pH 7.0) (LASA, grado RL). Se registró la absorbancia a 240 nm cada 10 seg durante 5 min.

Posteriormente se calculó el cambio de absorbancia a 240 nm por minuto (ΔA_{240}) de la pendiente lineal de la gráfica de A_{240} contra el tiempo. Para calcular la actividad de la catalasa se utilizó la siguiente ecuación.

$$\text{UCAT/ml} = ((\Delta A_{240}/\epsilon) (\text{FD de la reacción})) / \text{mg/ml de proteína.}$$

Donde; ϵ es el coeficiente de extinción molar del H_2O_2 a 240 nm ($37.36 \mu\text{mol}^{-1} \text{ mL Abs}$) y FD el factor de dilución ($3000/50=60$), cabe mencionar que la ecuación se corrigió por la concentración de proteína en cada muestra (Método de Biuret).

7.8 Análisis Estadístico

Los datos fueron sometidos a un análisis estadístico ANOVA, considerando un nivel de confianza de $p < 0.05$.

Cabe aclarar que durante la investigación se siguieron las normas establecidas por la Ley Mexicana de Protección Animal para el Uso de Animales de Experimentación (NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones Técnicas para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio).

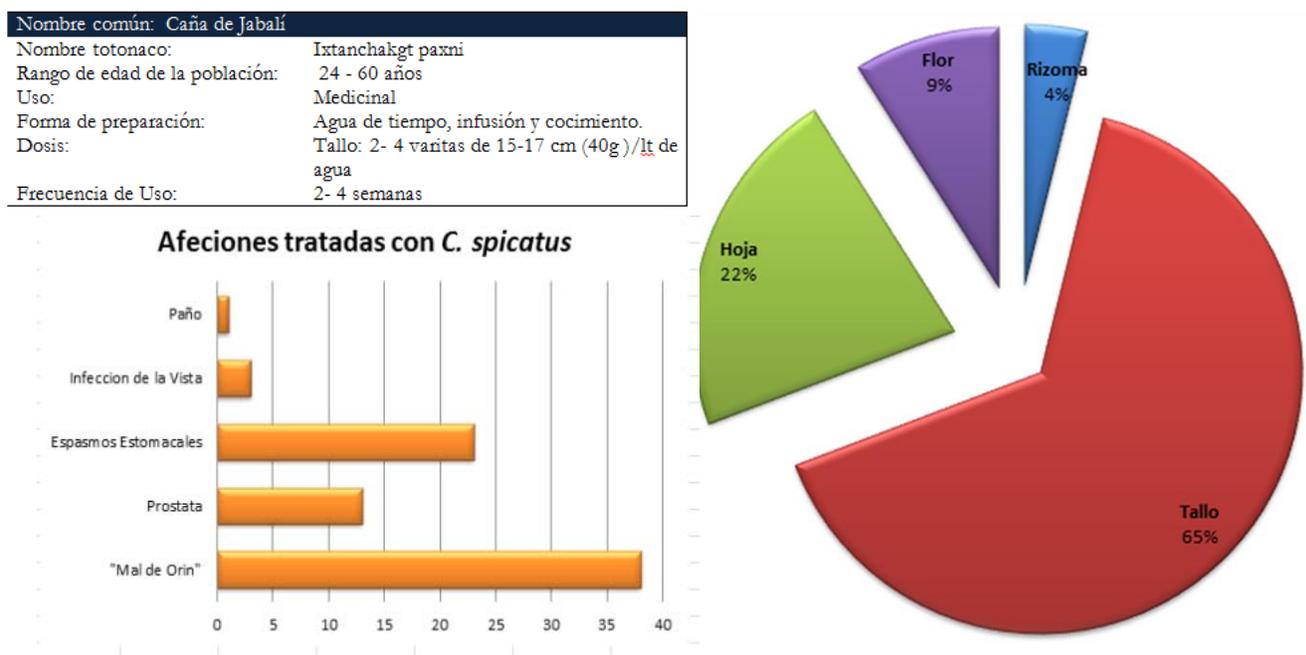
VIII. Resultados

8.1 Registro Etnofarmacológico de *C. spicatus*

Se realizaron un total de 78 entrevistas dirigidas en específico a personas de la Comunidad de Limón Chiquito que utilizan la caña de jabalí, representando un 8.75 % de la población de las cuales 54 pertenecen al género femenino y 24 al masculino con un rango de edad entre los 24 y 60 años. En la entrevista se contemplaron puntos específicos como: sexo y edad de los individuos que la utilizan, parte de la planta utilizada, forma de preparación, dosis empleada, frecuencia de uso, forma de administración y padecimiento a tratar. Los resultados reflejan de forma representativa que la población femenina de dicha comunidad es la que más emplea el uso de *C. spicatus*, pese a que la bibliografía reporta que es usada con mayor frecuencia en varones.

Entre las principales estructuras que se utilizan encontramos en primer lugar al tallo con un 65 % y la hoja con un 22% seguido de la flor con un 9% debido a que su época de floración se restringe a los meses de octubre- noviembre, por último la estructura vegetal menos utilizada es el rizoma con un 4 % (Fig. 8). La forma de preparación consiste en cocimiento e infusiones, durante periodos de tiempo que van desde los 15 días a 1 mes. La administración es de forma oral en dosis de 40 g/ L de H₂O (Fig. 8). Los principales usos de *C. spicatus* son para el tratamiento de “mal de orín” que consiste por lo dicho en la comunidad y lo reportado en la bibliografía en una sensación de ardor al orinar, para tratar afecciones de la próstata y afecciones relacionadas al riñón. Se encontraron usos no reportados bibliográficamente como lo son el empleo de la caña de jabalí para tratar los espasmos estomacales, afecciones de la vista e incluso paño (Fig. 8).

Fig. 8 Registro Etnofarmacológico de *C. spicatus*



8.2 Rendimiento de los Extractos Acuoso e Hidroalcohólico de *C. spicatus*

El rendimiento obtenido es por cada 100 g de material vegetal en los diferentes solventes de extracción, utilizando la relación de $R (\%) = \frac{P \cdot 100}{m}$ donde P; es el peso de la muestra obtenida y m; es el peso del material vegetal o droga seca al inicio de la extracción (Tolosa et al., 2002). En la Tabla 14 se muestran los resultados obtenidos en las diferentes estructuras vegetales y el color correspondiente de cada extracción (Fig. 9).

Tabla. 14 Color y rendimiento de los 12 extractos de *Costus spicatus* (Jacq.)Sw.

Solventes de Extracción	Tiempo	Material Vegetal	Extracción Hidroalcohólica		Extracción Acuosa	
			Color	Rendimiento	Color	Rendimiento
Etanol-Agua	24 hrs	Tallo	Verde claro	2.36g		
		Hoja	Marrón oscuro	2.88g		
Agua		Raíz			Naranja claro	4.6g
		Tallo			Blanco/translucido	4.2g
		Hoja			Verde pardo	5.125g
		Flor			Rosa claro	3.9g
Etanol-Agua	1 mes	Tallo	Verde olivo	3.95g		
		Hoja	Pardo oscuro	4.87g		
Etanol-Agua	1 mes	Raíz	Pardo claro	3.75g		
		Tallo	Blanco translucido	4.26g		
		Hoja	Marrón, rojizo	5.27g		
		Flor	Rosado	3.88g		

Fig. 9 Color de los extractos acuoso e hidroalcohólico de *C. spicatus*

Extractos Acuoso



Rizoma



Tallo



Hoja



Flor

Extractos Hidroalcohólicos



Rizoma



Tallo



Hoja



Flor

8.3 Análisis Preliminar Fitoquímico de los Metabolitos Secundarios Presentes en los Extractos Acuoso e Hidroalcohólico de *C. spicatus*

Se realizó un análisis preliminar fitoquímico de rizoma, tallo, hoja y flor de *C. spicatus*, obteniendo un total de 12 extractos; 4 acuosos y 8 hidroalcohólicos, los cuales fueron sometidos a reacciones coloridas específicas para la evaluación de los metabolitos secundarios de interés. Obteniendo como resultado la presencia de Flavonoides, Saponinas, Glicósidos Cardiotónicos, Esteroides y Triterpenos en todas las estructuras de la planta en los 12 extractos (Tabla 14).

Tabla. 15 Análisis preliminar fitoquímico de diferentes extractos de rizoma, tallo, hojas y flor de *Costus spicatus* (Jacq.) Sw. obtenidos por maceración.

Tipo de extracción	Tiempo	Material Vegetal	Mes de Recolecta	Alcaloides	Flavonoides	Saponinas	Taninos	Glicosidos	Esteroides y Triterpenos	Cumarinas	Quinonas	Lactonas sesquiterpénicas
Hidroalcohólica	24 hrs	Tallo	06-09-13	+	+	+	+	+	+	-	-	-
		Hoja		+	++	+	++	+	+	-	-	-
Hidroalcohólica	1 mes	Tallo	04-11-13	+	++	+	-	+	++	-	-	-
		Hoja		+	++	+	+	++	++	-	+	+
Hidroalcohólica	1 mes	Raíz	04-11-13	-	++	+	-	+	+	+	+	+
		Tallo		+	+	+	-	+	+	-	-	-
		Hoja		+	++	+	++	++	+	++	+	+
		Flor		+	+	+	+	++	+	++	++	+
Acuoso		Raíz	04-11-13	-	+	+	-	+	+	-	+	+
		Tallo		+	+	+	-	+	+	-	-	-
		Hoja		+	+	+	+	++	+	+	+	+
		Flor		+	+	+	+	++	+	+	+	+

Fig. 10 Pruebas colorimétricas de los extractos acuoso e hidroalcohólico de *C. spicatus*

• Flavonoides - Reacción de Shinoda (E.A.T)



Blanco E.H.T 2 mg/mL 4 mg/mL 6 mg/mL 8 mg/mL 10 mg/mL

• Flavonoides - Reacción de Shinoda (E.A.H)



Blanco E.H.F 2 mg/mL 4 mg/mL 6 mg/mL 8 mg/mL 10 mg/mL

• Flavonoides - Reacción de Shinoda (E.H.T)



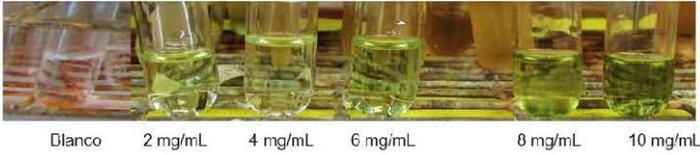
Blanco 2 mg/mL 4 mg/mL 6 mg/mL 8 mg/mL 10 mg/mL

• Flavonoides - Reacción de Shinoda (E.H.H)

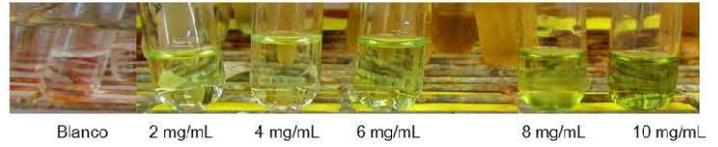


Blanco 2 mg/mL 4 mg/mL 6 mg/mL 8 mg/mL 10 mg/mL

• Glicósidos Cardiotónicos – Reactivo de Keller Killiani (E.A.T)



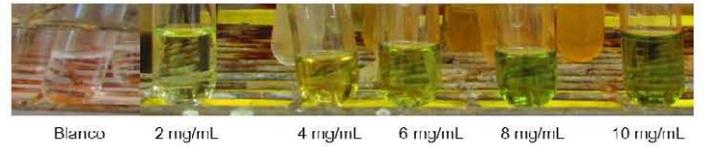
• Glicósidos Cardiotónicos – Reactivo de Keller Killiani (E.H.T)



• Glicósidos Cardiotónicos – Reactivo de Keller Killiani (E.A.H)



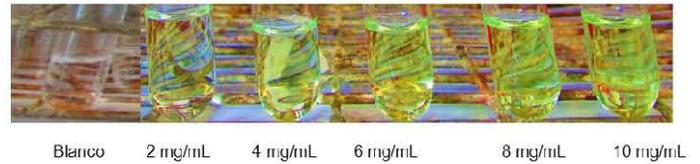
• Glicósidos Cardiotónicos – Reactivo de Keller Killiani (E.H.H)



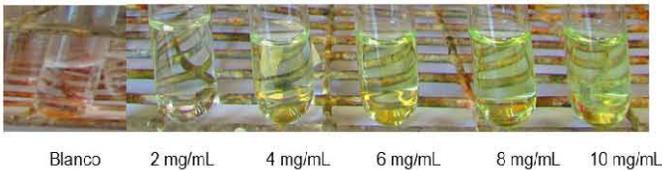
• Glicósidos Cardiotónicos – Reactivo de Lieberman Burchard (E.A.T)



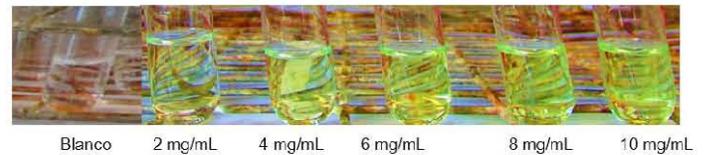
• Glicósidos Cardiotónicos – Reactivo de Lieberman Burchard (E.H.T)



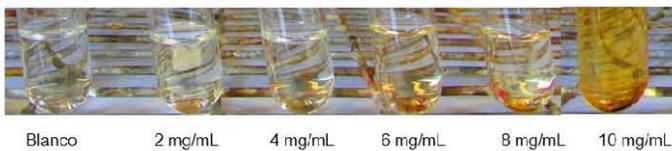
• Glicósidos Cardiotónicos – Reactivo de Lieberman Burchard (E.A.H)



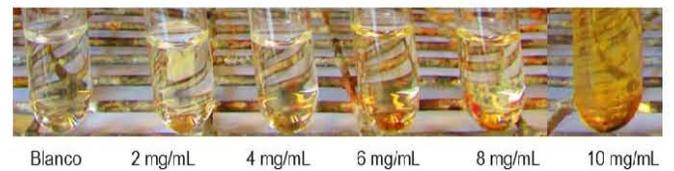
• Glicósidos Cardiotónicos – Reactivo de Lieberman Burchard (E.H.H)



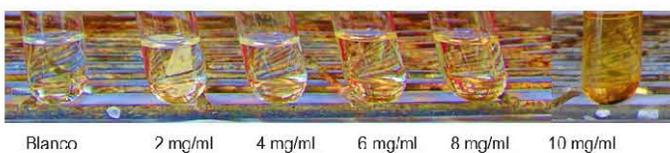
• Glicósidos Cardiotónicos – Reactivo de Baljet (E.A.T)



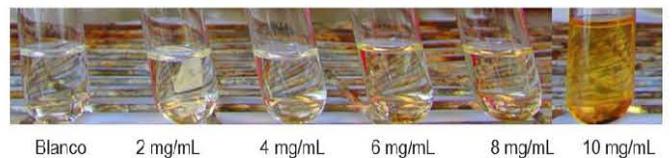
• Glicósidos Cardiotónicos – Reactivo de Baljet (E.H.T)



• Glicósidos Cardiotónicos – Reactivo de Baljet (E.A.H)



• Glicósidos Cardiotónicos – Reactivo de Baljet (E.H.H)



8.4 Efecto de los Extractos Acuoso e Hidroalcohólico de *C. spicatus* sobre los Niveles de Óxido Nítrico

Los resultados obtenidos muestran un incremento significativo en los niveles de NO en plasma del grupo inducido a cáncer con óxido de níquel con respecto al control y vehículo. Los grupos inducidos a cáncer y tratados con extractos acuosos de rizoma, tallo y hoja disminuyeron las concentraciones plasmáticas de NO respecto al control positivo de igual manera que los extractos hidroalcohólicos de rizoma, tallo, hoja y flor. Se observa que los extractos hidroalcohólicos de tallo y hoja disminuyen significativamente respecto al control negativo y al vehículo (Fig. 11).

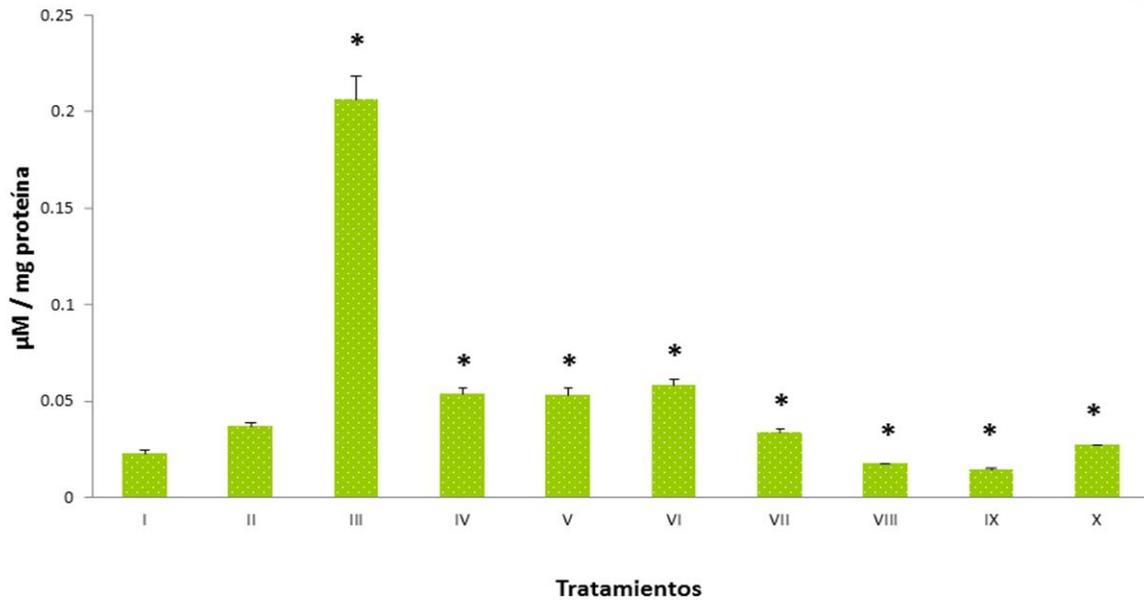


Fig. 11 Efecto de los extractos acuosos e hidroalcohólicos de *C.spicatus* sobre la concentración de nitritos (µM /mg de proteína) en plasma de ratones hembra de la cepa CD-1.

Grupo I: Control negativo; Grupo II: Vehículo (aceite de oliva); Grupo III: Control positivo (inducción de cáncer con NiO); Grupo IV: Experimental (inducción de cáncer con NiO + extracto acuoso de rizoma (400 mg/kg)); Grupo V: Experimental (inducción de cáncer con NiO + extracto acuoso de tallo (400 mg/kg)); Grupo VI: Experimental (inducción de cáncer con NiO + extracto acuoso de hoja (400 mg/kg)); Grupo VII: Experimental (inducción de cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de rizoma (400 mg/kg)); Grupo VIII: Experimental (inducción de cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de tallo (400 mg/kg)); Grupo IX: Experimental (inducción de cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de hoja (400 mg/kg)); Grupo X: Experimental (inducción de cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de flor (400 mg/kg)).

Por otro lado, los resultados de homogenado de hígado muestran un aumento significativo en las concentraciones de NO del grupo inducido a cáncer con óxido de níquel en contraste con el control negativo y el vehículo. Los extractos acuosos de rizoma, tallo y hoja disminuyeron significativamente sus concentraciones de NO con respecto al control positivo, lo que pasó de manera puntual con los extractos hidroalcohólicos de rizoma, tallo, hoja y flor donde las

concentraciones de óxido de níquel bajaron significativamente con respecto al control negativo y al vehículo (Fig.12).

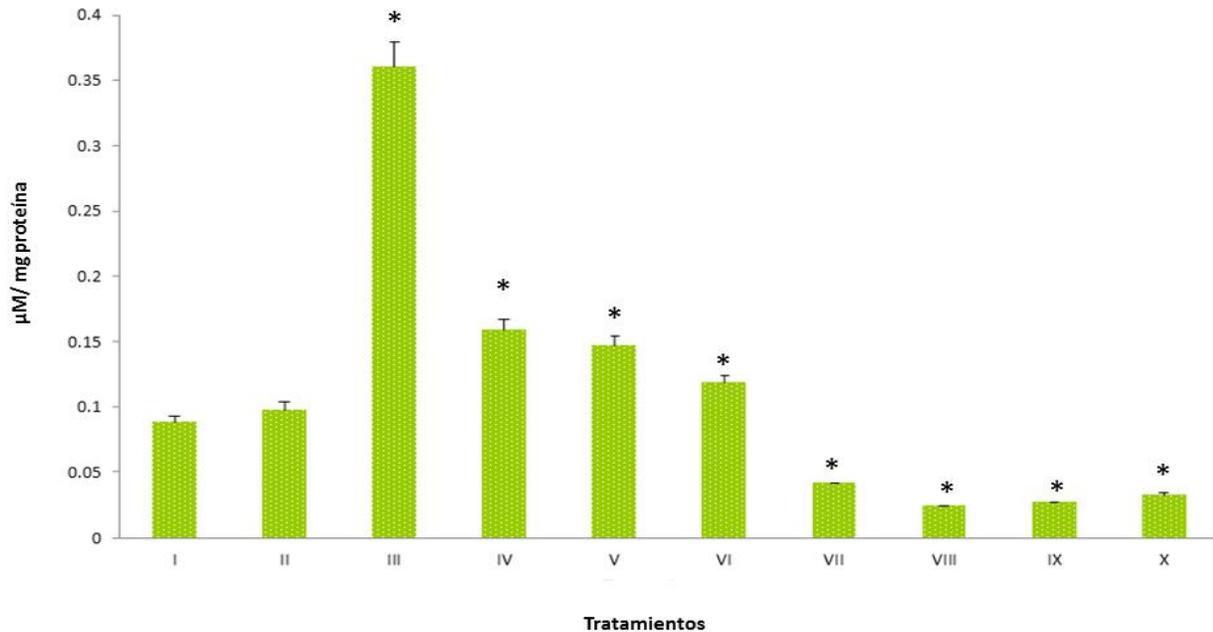


Fig. 12 Efecto de los extractos acuosos e hidroalcohólicos de *C.spicatus* sobre la concentración de nitritos (µM /mg de proteína) en homogenado de hígado de ratones hembra de la cepa CD-1.

Grupo I: Control negativo; Grupo II: Vehículo (aceite de oliva); Grupo III: Control positivo (inducción de cáncer con NiO); Grupo IV: Experimental (inducción de cáncer con NiO + extracto acuoso de rizoma (400 mg/kg)); Grupo V: Experimental (inducción de cáncer con NiO + extracto acuoso de tallo (400 mg/kg)); Grupo VI: Experimental (inducción de cáncer con NiO + extracto acuoso de hoja (400 mg/kg)); Grupo VII: Experimental (inducción de cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de rizoma (400 mg/kg)); Grupo VIII: Experimental (inducción de cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de tallo (400 mg/kg)); Grupo IX: Experimental (inducción de cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de hoja (400 mg/kg)); Grupo X: Experimental (inducción de cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de flor (400 mg/kg)).

8.5 Efecto de los Extractos Acuoso e Hidroalcohólico de *C. spicatus* en la Actividad de la Catalasa

Los extractos acuosos de rizoma y tallo de *C. spicatus* muestran una disminución significativa de la actividad plasmática de catalasa con respecto al control inducido a cáncer con óxido de níquel, por el contrario al extracto acuoso de hoja no presenta una disminución significativa de la actividad de la enzima.

Los resultados obtenidos en los extractos hidroalcohólicos de tallo y hoja de *C. spicatus* muestran una disminución significativa en la actividad de la enzima catalasa con respecto a nuestro control positivo, en contraste con los extractos hidroalcohólicos de rizoma y flor que presentan una actividad enzimática similar e incluso mayor que el control inducido a cáncer con óxido de níquel (Fig. 13).

En homogenado de hígado los extractos acuosos de rizoma, tallo y hoja no mostraron una disminución significativa de la actividad de la enzima catalasa con respecto al control inducido a cáncer con óxido de níquel. Por otro los extractos hidroalcohólicos de rizoma, tallo, hoja y flor muestran una disminución significativa en la actividad de la catalasa con respecto al grupo inducido a cáncer con óxido de níquel (Fig.14).

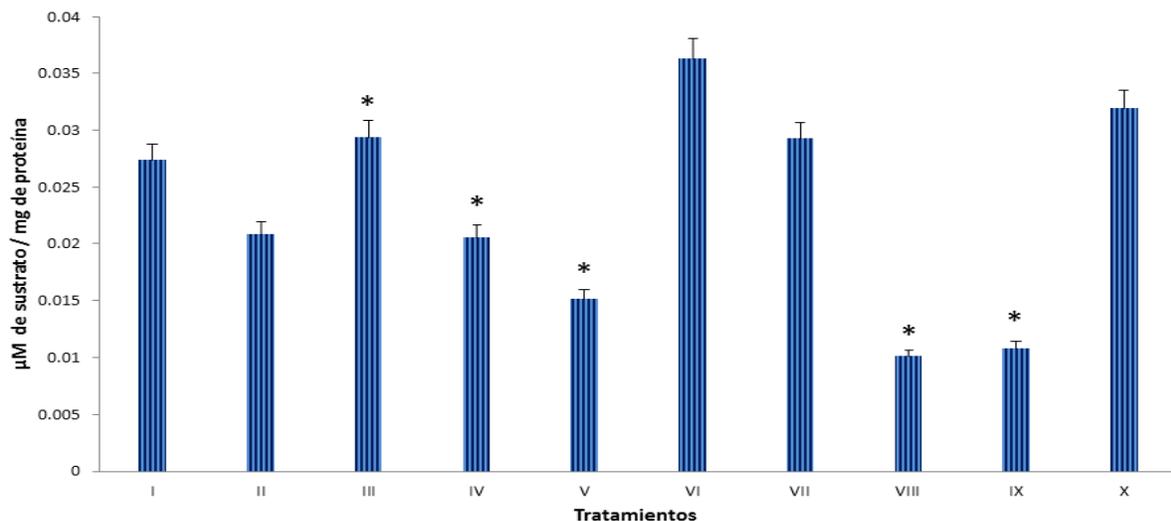


Fig. 13 Efecto de los extractos acuosos e hidroalcohólicos de *C.spicatus* sobre la actividad de la catalasa en plasma sanguíneo de ratones hembra de la cepa CD-1.

Grupo I: Control negativo; Grupo II: Vehículo (aceite de oliva); Grupo III: Control positivo (inducción de cáncer con NiO); Grupo IV: Experimental (inducción de cáncer con NiO + extracto acuoso de rizoma (400 mg/kg)); Grupo V: Experimental (inducción de cáncer con NiO + extracto acuoso de tallo (400 mg/kg)); Grupo VI: Experimental (inducción de cáncer con NiO + extracto acuoso de hoja (400 mg/kg)); Grupo VII: Experimental (inducción de cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de rizoma (400 mg/kg)); Grupo VIII: Experimental (inducción de cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de tallo (400 mg/kg)); Grupo IX: Experimental (inducción de cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de hoja (400 mg/kg)); Grupo X: Experimental (inducción de cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de flor (400 mg/kg)).

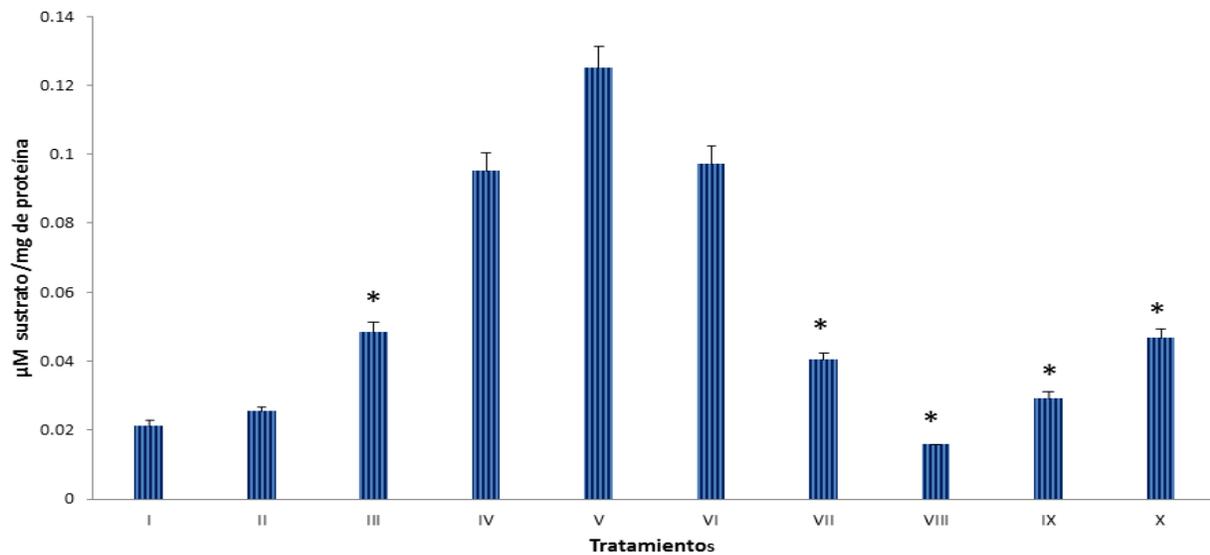


Fig. 14 Efecto de los extractos acuosos e hidroalcohólicos de *C.spicatus* sobre la actividad de la catalasa en homogenado de hígado de ratones hembra de la cepa CD-1

Grupo I: Control negativo; Grupo II: Vehículo (aceite de oliva); Grupo III: Control positivo (inducción de cáncer con NiO); Grupo IV: Experimental (inducción de cáncer con NiO + extracto acuoso de rizoma (400 mg/kg)); Grupo V: Experimental (inducción de cáncer con NiO + extracto acuoso de tallo (400 mg/kg)); Grupo VI: Experimental (inducción de cáncer con NiO + extracto acuoso de hoja (400 mg/kg)); Grupo VII: Experimental (inducción de cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de rizoma (400 mg/kg)); Grupo VIII: Experimental (inducción de cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de tallo (400 mg/kg)); Grupo IX: Experimental (inducción de cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de hoja (400 mg/kg)); Grupo X: Experimental (inducción de cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de flor (400 mg/kg)).

IX. Discusión

Registro Etnofarmacológico de *C. spicatus*

La Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que el 80 % de la población mundial utiliza plantas medicinales como forma de atención primaria a la salud (WHO, 2002). Sin embargo el conocimiento sobre el uso potencial de dichos recursos biológicos, se está perdiendo a un ritmo acelerado, tal es el caso que en la actualidad los medicamentos sintéticos han desplazado a las plantas, pese a ello un 30 % de los fármacos son obtenidos en forma directa o indirecta de éstas. Ante este panorama se ha remarcado la necesidad de preservar de manera urgente los recursos biológicos y los conocimientos asociados a los mismos, de manera que esta riqueza cultural debe ser escrita y validada a través de la investigación etnofarmacológica, la cual se enfoca principalmente al uso, al afecto, a la dosis empleada y a la forma de administración de los recursos vegetales (González et al., 2007).

Existen diversos estudios etnofarmacológicos y etnobotánicos dirigidos hacia la familia Costaceae, particularmente en el Género *Costus* con 2 especies principales; *Costus cylindricus* Jacq y *Costus pictus* D. Don (Pérez et al., 2011). Sin embargo ha surgido en las últimas décadas un interés particular a una especie del mismo género, *Costus spicatus* a la cual se le atribuye la misma propiedad que es distintiva de su familia, la propiedad diurética.

El estudio etnofarmacológico de *Costus spicatus* refleja que en la Comunidad de Limón Chiquito la especie posee propiedades antiinflamatorias, antiespasmódicas y dermatológicas, las cuales tienen similitud a las reportadas bibliográficamente (Keller et al., 2009). De igual manera se corrobora el uso del rizoma (Bernadete, 1999), tallo (Quintans et al., 2010) y hoja (Paés et al., 2013) de esta planta en la comunidad, observando que la flor no es una estructura utilizada por la comunidad debido a que se carece de información acerca de su forma de preparación, dosis y tiempo de administración.

Los pobladores utilizan la caña de jabalí estrictamente para uso medicinal destacando su forma de preparación en infusiones y cocimiento con un tiempo de tratamiento que comprende desde las 2 semanas a un mes, lo cual hace distintivo el tiempo de administración de la planta en dicha localidad. Se tiene reportado en modelos experimentales un periodo de tratamiento que comprende desde los 15 días (Quintans et al., 2010) hasta las 10 semanas (Keller et al., 2009). Con respecto a la dosis la Comunidad reportó un promedio de 40 g/L de H₂O en contraste con las dosis empleadas en organismos *in vivo* que van desde los 100 mg/kg hasta los 400 mg/kg, siendo esta última la dosis que presenta un efecto antiinflamatorio similar a 200 mg/kg de aspirina (Quintans et al., 2010).

Lo manifestado anteriormente, muestra como prioritaria la documentación etnofarmacológica de *C. spicatus* de manera que dicha especie se ha utilizado principalmente como medida de atención primaria para la salud.

Análisis Preliminar Fitoquímico de los Metabolitos Secundarios Presentes en los Extractos Acuoso e Hidroalcohólico de *C. spicatus*

Las plantas son consideradas como organismos fotosintéticos que están expuestos a ambientes muy oxidativos, por lo cual poseen un sistema antioxidante muy eficaz. De esta manera, su estudio ha reportado diversas sustancias conocidas como metabolitos, los cuales tienen efectos benéficos para la planta y para el hombre (Ludy et al., 2013).

Partiendo de ello, el presente estudio se enfocó a la fitoquímica de *Costus spicatus*, a la cual se le han atribuido numerosas propiedades curativas que han sido empleadas por la Medicina Tradicional.

Su análisis consistió en la realización de extractos hidroalcohólicos y acuosos, obteniendo como resultado en ambos extractos la presencia de ciertos metabolitos secundarios con actividad biológica importante como lo son los flavonoides, saponinas, glicósidos cardiotónicos, esteroides y triterpenos libres en todas las estructuras de la planta. Cabe mencionar que existen reportes que corroboran la presencia de este tipo de metabolitos secundarios en diferentes estructuras de la planta, tal es el caso de los flavonoides y saponinas encontrados en extractos hidroalcohólicos de rizoma, tallo y hoja, sin dejar de lado la presencia de éstos mismos en extractos acuosos de rizoma, hoja y flor (Paes et al., 2013).

Los resultados también indican la presencia de alcaloides, taninos, cumarinas, quinonas y lactonas sesquiterpénicas para ambos extractos, pero a diferencia de los anteriores metabolitos secundarios, éstos se encuentran distribuidos indiferenciadamente en la planta. Siendo los alcaloides y los taninos los distribuidos similarmente entre el tallo, la hoja y la flor para ambas extracciones, siguiendo con lo dicho, las cumarinas se encuentran en los extractos hidroalcohólicos de rizoma, hoja y flor así como su presencia en los extractos acuosos de hoja y flor. En cuanto a las quinonas y lactonas sesquiterpénicas se identificó su presencia en el rizoma, hoja y flor de dicha especie en ambas extracciones. De igual manera, existen artículos que avalan la presencia de alcaloides en extracciones hidroalcohólicas de rizoma y tallo, además de la presencia de taninos en hoja y flor de la caña de jabalí (Paes et al., 2013). Es importante mencionar que este es el primer reporte sobre la presencia de cumarinas, quinonas y lactonas sesquiterpénicas en *C. spicatus* por ello es necesario profundizar en su estudio.

Además de los resultados obtenidos en esta investigación, existen reportes que indican la presencia de 6 tipos de flavonoides en extractos metanólicos de hoja de *C. spicatus* y la presencia de saponinas esteroidales en rizoma con el mismo tipo de extracción (Bernadete et al., 2003).

Partiendo de ello, un importante foco a tratar es la presencia de flavonoides en la planta, ya que estos son compuestos con amplia actividad farmacológica debido a la estructura química que presentan, pues contienen un número variable de grupos hidroxilo fenólicos que le confieren la capacidad de secuestrar hierro y otros metales de transición (Escamilla et al., 2009). Debido a ello, se les ha considerado como potenciales moléculas protectoras ante los fenómenos de

daño oxidativo, presentando además su desempeño terapéutico en diversas patologías tales como diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, infecciones víricas, úlceras estomacales y duodenales e inflamaciones (Martínez et al., 2002).

La presencia de este tipo de compuestos en *C. spicatus* hace posible la validación de los usos terapéuticos de esta planta, así como su función antioxidante, puesto que este tipo de compuesto está implicado como uno de los componentes polifenólicos que presenta un mecanismo de acción reductora en las interacciones con las especies reactivas de oxígeno y otros radicales, retirando el oxígeno reactivo de aniones superóxidos, radicales hidroxilos, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos, bloqueando la acción deletérea de dichas sustancias sobre las células (Zulueta et al., 2009).

Diversos flavonoides han mostrado su eficiencia para eliminar los procesos de peroxidación lipídica de los fosfolípidos de las membranas, la peroxidación de los glóbulos rojos o la auto-oxidación de los homogenados de cerebro (Ursini et al., 1994). Así mismo, se han realizado estudios que implican la inhibición de la peroxidación lipídica producida por el hierro y aumentando la concentración de glutatión en la mucosa intestinal de ratas alimentadas durante tres días con quercetina (Merck, 2000). La presencia de quercetina en *C. spicatus* hace más atractiva la propuesta de uso como potencial antioxidante, ya que la quercetina es considerada como uno de los flavonoides que mejor reúne los requisitos para ejercer una efectiva función antioxidante, puesto que presenta una capacidad antioxidante de 4.7 mM medida como Trolox, lo que resulta 5 veces mayor al demostrado por las vitaminas E y C y tiene una hidrosolubilidad similar a la de la vitamina E (Laughton et al., 1989). Presenta efectos sinérgicos con la vitamina C, de manera que combinada con ésta permite al flavonoide mantener sus funciones antioxidantes durante más tiempo, por otra parte la quercetina protege de la oxidación a la vitamina E con la cual también presenta efectos sinergizantes.

En el hígado se ha descrito que la quercetina es capaz de inhibir la activación de las células estrelladas, así como la producción de óxido nítrico, alterando vías de expresión de proteínas celulares (Kawada et al., 1998), esto aunado a estudios *in vitro* donde se ha comprobado que diversos flavonoides inhiben la expresión de óxido nítrico sintetasa y la formación de óxido nítrico en macrófagos estimulados por LPS (Autore et al., 2001). También se tienen reportes en ratas con obstrucción biliar en las que se produce estrés oxidativo y una reducción de las defensas antioxidantes donde el tratamiento con quercetina ha demostrado la prevención de la peroxidación lipídica, la atenuación de los depósitos de colágeno y el proceso de fibrogénesis hepática (Peres et al., 2000). Ensayos clínicos han comprobado que la administración profiláctica de flavonoides disminuye la producción de radicales libres en la reperusión después del bypass en cirugía de reemplazamiento vascular (Miranda et al., 2000).

Otro tipo de flavonoide encontrado en las hojas de *C. spicatus* es el kaempferol, el cual junto con la quercetina controla las concentraciones intracelulares de glutatión, actuando a nivel del gen de regulación, son capaces de aumentar el nivel en un 50 % induciendo el sistema antioxidante celular y contribuyendo a la prevención de enfermedades (Myhrstad et al., 2002).

Por lo tanto, los flavonoides muestran efectivamente la capacidad antioxidante que depende fundamentalmente de su capacidad de eliminar hierro, hecho que se ha comprobado en células U937 tratadas con el agente tóxico terbutilhidroperóxido que aun en muy bajas concentraciones son capaces de evitar la rotura y la oxidación del ADN (Sestili et al., 2002). Aunado a esto, se ha visto que inhiben enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, como la fosfolipasa A₂; al mismo tiempo que estimulan otras con reconocidas propiedades antioxidantes, como la catalasa y la superóxido dismutasa (Sudheesh et al., 1999).

Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que los flavonoides tienen una acción antiproliferativa, anticarcinogénica y quimopreventiva, la cual confirma el papel protector de la quercetina ejerciendo efectos de inhibición frente a células cancerígenas en humanos: en colon (Ranelletti et al., 1992), glándula mamaria (Birt et al., 2001), ovario (Scambia et al., 1990), región gastrointestinal (Yoshida et al., 1990) y en leucemia (Ren et al., 2001). En cáncer de mama su acción anticancerígena podría deberse a su potente capacidad de inhibir la actividad de la aromatasas evitando de esta forma andrógenos en estrógenos (Pouget et al., 2002).

Las saponinas son otro tipo de metabolitos dilucidados en todas las estructuras de la planta y presentes en los dos tipos de extracciones. Las cuales son reconocidas por presentar diversos efectos biológicos que incluyen la actividad antitumoral, antiinflamatoria, antiparasitaria, hipocolesterolemica, molusquicida y antimicrobiana (Burris et al., 2012). Estudios realizados muestran que estos efectos están relacionados con sus propiedades de disrupción de membranas celulares y de formación de micelas con ácidos biliares (Puangpraphant et al., 2011), además que han demostrado importantes efectos citotóxicos sobre células tumorales A549, HeLa, HL-60, KB (Sparg et al., 2004).

En la familia Costaceae, la especie *Costus pictus* ha reportado la presencia de este tipo de metabolito al cual le ha atribuido su efectiva función analgésica (Shiny et al., 2013). Varios estudios han informado de efectos benéficos sobre la actividad antioxidante que presentan este tipo de compuestos en ensayos *in vitro* e *in vivo* (Chen et al., 2014).

Otro tipo de metabolito identificado en los extractos acuosos e hidroalcohólicos de *C. spicatus* y que se encuentra en todas las estructuras de la planta son los glicósidos cardiotónicos. Se tienen referencias de la actividad anticancerígena de este tipo de metabolitos a través del incremento de la expresión de Fas, incremento en los niveles de p21, alteración de la fluidez de la membrana y la inhibición de la topoisomerasa II (Prassas et al., 2008). Numerosos estudios sugieren la utilización de glicósidos cardiotónicos para el tratamiento del cáncer, por lo cual han desarrollado diversos experimentos *in vitro* donde se confirman los efectos antiproliferativos y apoptóticos en líneas celulares de cáncer de mama (Bielawski et al., 2006), próstata (McConkey et al., 2000), melanoma (Newman et al., 2006), páncreas (Newman et al., 2007), pulmón (Mijatovic et al., 2006), leucemia (Kawazoe et al., 1999), neuroblastoma (Kulikow et al., 2007) y adenocarcinoma renal (López et al., 2005). Sin embargo aún no se encuentran dilucidados por completo los mecanismos que hagan posible este efecto, así como el tipo de glicósido cardiotónico que lo ejerza. Estudios *in vivo* han demostrado que la combinación de

glicósidos cardiotónicos con radioterapia ha sido eficaz, esto fue mostrado con la aplicación de *ouabain* en células humanas de adenocarcinoma de pulmón sugiriendo que las células tratadas con este tipo de compuestos se acumulan en la fase G2m, en la que son más sensibles a la radiación (Nasu et al., 2002). *In vitro* e *in vivo* los estudios realizados han informado la capacidad de inhibir tumores en la etapa de carcinogénesis (Inada et al., 1993), pese a que en altas concentraciones la citotoxicidad de algunos glicósidos cardiotónicos puede resultar contraproducente, afortunadamente estudios en digitoxina han demostrado que en concentraciones bajas estos compuestos ejercen un importante efecto citoprotector que puede ser empleado en futuras terapias para el tratamiento de isquemia cerebral y enfermedades neurodegenerativas (Ahmed et al., 2008), así como para el tratamiento del cáncer donde se ha implementado una nueva fuente conocida como neoglicorandomización para la obtención de fármacos de primera línea (Langenhan et al., 2005).

Los esteroides y triterpenos libres también han sido estudiados por presentar propiedades antiinflamatorias, citotóxicas, anticancerígenas y antimicrobianas (Tholl et al., 2006). Existen estudios que indican que este tipo de metabolito secundario puede inhibir la señalización del factor NF κ que es el principal regulador de los procesos inflamatorios y de cáncer, señalando que la presencia de este tipo de compuestos en la planta puede tener un potencial anticancerígeno (Salminen et al., 2008). Se ha demostrado que el Celastrol es capaz de inducir apoptosis a través de la inhibición de NF κ en células tumorales (Sethi et al., 2007). En la familia Costaceae el género *Costus* reporta en la mayoría de sus especies la presencia de esteroides y triterpenos libres (Balunas et al., 2005).

Entre los candidatos prometedores para el desarrollo de fármacos que ayuden al tratamiento del cáncer encontramos a las quinonas y lactonas sesquiterpénicas, las cuales presentan diversos ensayos clínicos dirigidos para el tratamiento de esta patología. La Cribrostatin 6 es una quinona de origen natural la cual ha sido aislada y sintetizada para uso clínico, estudiada en líneas celulares de cáncer en las cuales induce apoptosis. Se han realizado diversos estudios que implican su papel en el ciclo celular y en la producción de especies reactivas de oxígeno al inducir la muerte celular por la vía de alquilación de ADN (Tucker, 2010). En cuanto a las lactonas sesquiterpénicas se tienen cerca de 1500 publicaciones que le adjudican propiedades anticancerígenas y antiinflamatorias debido a que poseen un centro alquil reactivo, una cadena lipofílica y una geometría molecular con características electrónicas (Zhang et al., 2005). Estudios *in vitro* e *in vivo* han reportado la inhibición de tumores en cáncer próstata (Denmeade et al., 2005), melanoma (Berger et al., 2005), pulmón (Zhang et al., 2008), lupus nephritis (Lu, 2002) y en carcinoma de laringe (Singh et al., 2002), sin embargo a pesar de presentar aparente selectividad hacia las células tumorales y sus favorables características, las lactonas sesquiterpénicas presentan algunos inconvenientes, como lo son su biodisponibilidad al tener amplias interacciones con proteínas plasmáticas y hidrofobicidad, además de presentar toxicidad no deseada en células normales (Ghantous et al., 2010). En el género *Costus* la presencia de este tipo de metabolito ha sido reportada en la especie *Costus speciosus* (Sabitha et al., 2012).

Por último entre los metabolitos encontrados en *C. spicatus* que se encuentran distribuidos indiferenciadamente en la planta, encontramos a los taninos los cuales presentan propiedades astringentes debido a su estructura química rica en grupos hidroxilos (Kumar et al., 2012). Los taninos son compuestos naturales fenólicos los cuales forman complejos con diversas proteínas que los hace menos susceptibles a fenómenos de daño oxidativo.

Un estudio realizado muestra que los taninos eran de 15- 30 veces más eficaces en la eliminación de radicales peroxilo que un compuesto fenólico simple y presentan importantes propiedades antioxidantes (Hagerman et al., 1998). Existen reportes sobre la presencia de alcaloides en la familia Costaceae, especialmente en *Costus speciosus* donde se le han realizado estudios acerca de su actividad anestésica (Sabitha et al., 2012). En contraste con las cumarinas que de igual manera presentan propiedad antioxidante por presentar una estructura química que contiene varios grupos hidroxilo y que en algunos casos varias de ellas puedes inhibir la peroxidación lipídica y secuestrar especies reactivas de oxígeno, caracterizadas por presentar propiedades antiinflamatorias y anticoagulantes (Borges et al., 2005). No obstante, pese a ser compuestos con actividad antioxidante no se han realizado estudios en líneas celulares de cáncer o en animales experimentales.

Como se puede observar los extractos hidroalcohólicos mostraron la presencia de un mayor número de metabolitos secundarios respecto a los extractos acuosos, esto debido a la polaridad de arrastre que presentan ambos extractos. Existen estudios que corroboran la eficacia en la utilización de extractos hidroalcohólicos puesto que las disoluciones hidroalcohólicas son más eficientes que el agua en la extracción de compuestos fenólicos (Yilmaz et al., 2006).

Se tiene conocimiento que el tiempo y la temperatura de extracción son parámetros importantes para optimizar el proceso, por ello en la extracción hidroalcohólica se manejó un tiempo equivalente a un mes a temperatura ambiente. Por el contrario la extracción acuosa se realizó en un tiempo de 25 min a punto de ebullición lo cual según lo reportado, un determinado valor de temperatura puede comenzar a producir la transformación o degradación de los compuestos de interés (Maier et al., 2008), pese a ello este tipo de extracción es la más empleada en la comunidad.

Efecto de los Extractos Acuoso e Hidroalcohólico de *C. spicatus* Sobre los Niveles de Óxido Nítrico

Las especies reactivas de oxígeno y las especies reactivas de nitrógeno son bien conocidas por jugar un doble papel, ya sea como especies perjudiciales o benéficas. A bajas concentraciones dichas especies regulan diferentes funciones fisiológicas importantes como vías de señalización celular, regulación de la defensa autoinmune, inducción de respuesta mitogénica, transducción de señal y la transcripción de genes. Por otro lado su sobreproducción da como resultado a un fenómeno conocido como estrés oxidativo, el cual es nocivo para diversas estructuras celulares incluyendo lípidos, proteínas, membranas celulares e incluso al propio ADN (Soodabeh et al., 2013).

Entre las especies reactivas de mayor interés encontramos al óxido nítrico que si bien cumple con importantes funciones de señalización fisiológica en concentraciones normales, también es participe en diferentes vías de señalización patológicas cuando existe una sobreproducción. Existen estudios que corroboran su participación en procesos inflamatorios como carcinomas, esclerosis muscular, artritis y colitis (Mohammad et al., 2010).

Ante este panorama el cuerpo humano ha desarrollado una serie de mecanismos para contrarrestar dicho daño, el cual es denominado sistema de defensa antioxidante. Dicho sistema está conformado por componentes que se producen de manera interna o externa conocidos como antioxidantes, los cuales pueden ser producidos de manera interna o externa. Estos antioxidantes son capaces de secuestrar radicales libres y de mejorar el sistema de defensa inmune, así como reducir el riesgo de padecer cáncer y otras enfermedades degenerativas (Pham et al., 2008). El interés por estudiar este tipo de moléculas se ha hecho creciente estos últimos años, buscando fuentes fitoquímicas que puedan proteger al cuerpo humano de diferentes enfermedades entre ellas el cáncer (Terao et al., 1997). Partiendo de ello, el presente estudio se analizó el efecto de los extractos acuosos e hidroalcohólicos de *C. spicatus* sobre el NO, radical conocido por estar implicado en el proceso de carcinogénesis a través de mutaciones sobre p53 (Díaz, 2004).

Los resultados obtenidos en plasma de los ratones hembra de la cepa CD-1 (Fig. 11) muestran, que efectivamente los niveles de nitritos disminuyen con la aplicación de los extractos acuosos e hidroalcohólicos de la caña de jabalí, pese que los organismos fueron tratados con óxido de níquel. Existen estudios que relacionan el proceso de carcinogénesis con la exposición del óxido de níquel a través de cambios en la metilación del ADN, modificación de las histonas y la red de microRNA creando una alteración epigenética que contribuye a la iniciación y progresión tumoral (Hong et al., 2013). Partiendo de esto, se tiene conocimiento que la actividad de los nitritos en plasma sanguíneo de ratón se ve afectada con la exposición de compuestos alteren la producción de esta molécula (Mayuko et al., 2004). El tratamiento con los extractos acuosos e hidroalcohólicos de *C. spicatus* disminuyen significativamente la concentración de óxido nítrico plasmático, siendo mayor el efecto en los extractos hidroalcohólicos en especial los de tallo y hoja.

En el hígado, al igual que en otros órganos el óxido nítrico cumple diversas e importantes funciones. Entre ellas se destaca su papel como mediador primario de lesiones en células hepáticas, así como su implicación en el los procesos de apoptosis, esto dependiendo al microentorno en el que es generado, así como la actividad de las óxido nítrico sintasas (Hortelano et al., 1997).

En *C. spicatus* los extractos acuosos e hidroalcohólicos mostraron una disminución significativa en la concentración de nitritos en hígado (Fig. 12), siendo particularmente los extractos hidroalcohólicos los de mayor efecto. Estudios señalan que en bajas concentraciones el óxido nítrico producido por la eNOS es necesario y suficiente para mantener la perfusión y proporcionar los efectos antiinflamatorios y antitrombóticos. Sin embargo a concentraciones

altas el óxido nítrico puede conducir a un daño mitocondrial y en el ADN, así como la generación de radicales peroxinitritos (Tuncyurek et al., 2006).

Por lo tanto, los resultados obtenidos sobre las concentraciones de nitritos en plasma e hígado indican que la caña de jabalí presenta un significativo efecto regulador contra la generación de este compuesto, lo que confirma el uso en particular de las estructuras de rizoma, tallo, hoja y flor para el tratamiento de enfermedades que conlleven procesos inflamatorios, entre ellos el cáncer.

Efecto de los Extractos Acuoso e Hidroalcohólico de *C. spicatus* en la Actividad de la Catalasa

La actividad de la enzima catalasa constituye uno de los primeros mecanismos de defensa contra la oxidación inducida por los radicales libres, ya que contiene una de las actividades catalíticas más rápidas que se conocen. Su expresión se encuentra elevada en hígado y sangre (Peraza, 2008).

Partiendo de esto, la actividad de dicha enzima fue evaluada en hígado y plasma de ratones inducidos a cáncer. Obteniendo como resultado en los extractos acuosos de rizoma y hoja una actividad enzimática significativa, al igual que en los extractos hidroalcohólicos de tallo y hoja. En sangre, la actividad de la enzima catalasa conforma uno de los principales sistemas de detoxificación ya que ésta permanece en constante contacto con diferentes potenciales dañinos, entre ellos las especies reactivas de oxígeno (Rauchova et al., 2004).

En contraste los resultados obtenidos en hígado reflejan una actividad significativa en los extractos hidroalcohólicos de rizoma, tallo, hoja y flor, teniendo un mayor efecto en el tratamiento con los extractos de tallo y hoja.

Claramente se observa que los resultados obtenidos en plasma difieren a los obtenidos en hígado. Esto debido a que existen estudios que indican que la actividad de la catalasa se ve más afectada en el hígado puesto que este órgano es blanco en los procesos de tumoración, por el contrario en el plasma donde su actividad es afectada pero no de manera sustancial (Lutosławska et al., 2003).

Finalmente, se tiene conocimiento que los radicales libres son capaces de aumentar o disminuir el riesgo de cáncer basado en diversas situaciones, entre ellas el estrés oxidativo. Esto a través de la generación excesiva de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno que se encuentran implicadas en el proceso de carcinogénesis, ya sea mediante un daño permanente al ADN, causando mutaciones en p53 o bien interfiriendo en la actividad de los factores de transcripción como el factor NF-kB (Soodabeh et al., 2013). Aunado a esto, una de las alternativas promisorias hoy en día para el tratamiento del cáncer es la terapia antioxidante, siendo los antioxidantes de origen natural los de mayor interés. Bajo esta línea diversos investigadores han dilucidado mecanismos que permitan la compresión de estos compuestos

en dicho proceso, ya sea a través de la inhibición de la tumorigénesis o por la prevención de lesiones oxidativas al ADN (Cragg, 2005).

Existen reportes que señalan que los componentes fenólicos constituyen uno de los principales y mayores grupos que presentan una fuerte actividad antioxidante. Entre los compuestos fenólicos de mayor interés encontramos a los flavonoides, glicósidos cardiotónicos, taninos, lactonas sesquiterpénicas y quinonas, las cuales se encuentran presentes en *C. spicatus*. La habilidad de estos compuestos fenólicos como agentes antioxidantes está basada en su capacidad de donar átomos de hidrógeno, así como sus propiedades estructurales idóneas para secuestrar radicales libres. Como hemos observado anteriormente, los extractos acuosos e hidroalcohólicos presentan una disminución significativa en las concentraciones de óxido nítrico, tanto en plasma como hígado así como una recuperación en la actividad enzimática de la catalasa pese a ser organismos que presentan un estrés oxidativo constante al estar presente el proceso de carcinogénesis (Raj Kapoor et al., 2010).

Efectivamente la presencia de este tipo de metabolitos secundarios hace posible la actividad biológica que presentan dichos extractos observando una marcada diferencia en la extracción hidroalcohólica. Posiblemente uno de los componentes que mayoritariamente ejerce esta acción sea la presencia de quercetina y kaemferol presente en la hoja de *C. Spicatus*, sin embargo al poseer mayoritariamente los metabolitos de interés los resultados indican que esta actividad antioxidante está ligada al conjunto de compuestos presentes en la planta. De esta manera, la presente investigación demuestra la eficacia que presenta *C. spicatus* ante fenómenos de daño oxidativo, haciendo presente que la utilización de la caña de jabalí para el tratamiento de diversas enfermedades relacionadas con los procesos inflamatorios es eficaz.

No obstante, el presente estudio marca una pauta importante para realizar investigación acerca de esta especie como posible agente anticancerígeno.

X. Conclusiones

El presente estudio realizado con el fin de evaluar el potencial antioxidante de *C. spicatus* nos permite elucidar:

- Respecto al registro etnofarmacológico obtenido de la comunidad Totonaca que las estructuras más utilizadas dentro de la población y con mayor efecto benéfico para dicha comunidad son el tallo y la hoja.
- En cuanto al análisis preliminar fitoquímico los flavonoides, saponinas, glicósidos cardiotónicos, esteroides y triterpenos libres predominaron en la especie, obteniendo mediante reacciones coloridas la presencia de estos metabolitos en todas las estructuras de la planta.
- El efecto de los extractos acuosos e hidroalcohólicos sobre la concentración de nitritos en plasma e hígado disminuyó significativamente, lo que con lleva a una disminución de radicales libres con la aplicación de dichos extractos. Observando que las estructuras de hoja y tallo presentan mayor efecto.
- La actividad de la enzima catalasa efectivamente fue modificada significativamente con la aplicación de los extractos hidroalcohólicos de hoja y tallo

Finalmente se concluye que *Costus spicatus* (Jacq.) Sw., presenta actividad antioxidante. Obteniendo que los extractos hidroalcohólicos y acuosos presentan un efecto protector ante el daño oxidativo, dilucidando entre las estructuras más eficaces de mayor a menor grado la hoja, el tallo, la flor y el rizoma. Sugiriendo que dicho potencial es debido en conjunto a la presencia de compuestos fenólicos presentes en la especie.

XI. Referencias

1. Adachi M., Zhang Y., Zhao X., Minami T., Kawamura R., Hirota Y. Clin Cancer. 2004 (10); 3853-3862.
2. Agarwal A., Saleh A. Utility of oxidative stress in the male infertility clinic. Natl J Androl. 2002; 8:1-9.
3. Arango G. Alcaloides y compuestos nitrogenados. [Manual] Medellín. Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmacéutica; 2008: 5-16.
4. Arango G. Compuestos derivados del ácido shikimico. [Manual] Medellín. Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmacéutica; 2010: 8-13.
5. Autore G., Rastrelli L., Lauro MR. Inhibition of nitric oxide synthase expression by a methanolic extract of *Crescentia alata* its derived flavonols. Life Sci, 2001; 70:523-534.
6. Ávalos AG., Pérez E. Metabolismo secundario de las plantas. Reduca, Fisiología Vegetal. 2009; 2(3):119-145.
7. Azevedo LFP., Faria TSA., Pessanha FF., Araujo MF., Lemos GCS. Triagem fitoquímica e atividade antioxidante de *Costus spicatus* (Jacq.) S.w. Rev. Bras. Pl.Med., Campinas. 2014; 16(2): 209-215.
8. Balunas M J., Kinghorn AD. Drug discovery from medicinal plants. Life Sci.2005; 78: 431–441.
9. Benavides T., Pinzón A. Óxido nítrico: implicaciones fisiopatológicas. Rev Col Anest. 2008; 36: 45-52.
10. Berger, T.G. Artesunate in the treatment of metastatic uveal melanoma first experiences. Oncol. Rep. 2005; 14: 1599–1603.
11. Bermúdez A., Oliveira M., Velázquez D. La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. Interciencia. 2005; 30 (8): 453-459.
12. Bernadete Pereira., Roney RB., Parente JP. A furastanol glycoside from rhizomes of *Costus spicatus*. Phytochemistry 1999; 51 (7): 931-935.
13. Birt DF., Hendrich S., Wang W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. Pharmacol Ther, 2001; 90:157-177.
14. Borges F., Roleira F., Milhazes N., Santana L., Uriarte E. Simple Coumarins and Analogues in Medicinal Chemistry: Occurrence, Synthesis and Biological Activity. Currente Medicinal Chemistry. 2005; 12: 887-916.
15. Brambilla D, Mancuso C, Scuderi MR, Bosco P, Cantarella G, Lempereur L, et. al. The role of antioxidant supplement in immune system, neoplastic, and neurodegenerative disorders: a point of view for an assessment of the risk/benefit profile. Nutr J. 2008; 7: 1-9.
16. Bravo J., Fita I., Gouet P., Jouve HM., Melik A., Murshudov GN. Structure of catalases: Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. New York: Scandalios J G. 1997: 215-228.
17. Bruce A, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. Fourth Ed. Garland Science; 2002.
18. Bruneton J. Pharmacognosy Phytochemistry, Medicinal Plants , 2nd ed. Paris: Lavoisier Publishing; 2008.
19. Buga GM, Ignarro LJ. Nitric oxide: biology and pathobiology. EUA: Academic Press; 2000.

20. Burris KP., Harte FM., Davidson PM., Stewart CN., Zivanovics. Composition and bioactive properties of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil): a review. *Chil J Agricult Res.* 2012; 72: 268-274.
21. Céspedes M, Ela M. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar radicales libres. *Rev Cubana Inv Biomed* 1996; 15(2):75-78.
22. Chen Y., Miao Y., Huang L., Li J., Sun H, Zhao Y., Yang J., Zhou W. Antioxidant activities of saponins extracted from *Radix trichosanthis*: an *in vivo* and *in vitro* evaluation. *BMC Complementary and Alternative Medicine.* 2014; 14: 86-92.
23. Coll A., Mercado MI., Grau A., Catalán CA. Lactonas Sesquiterpénicas de *Smallanthus siegesbeckius* (Heliantheae, Asteraceae). *Boletín Latinoamericano del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.* 2007; 6 (5): 187-188.
24. Córdova A., Ruiz G., Córdova C., Córdova M., Guerra J., Rodríguez B., Arancibia K. Estrés oxidativo y antioxidantes en la conservación espermática. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias.* 2009; 3 (1): 1-38.
25. Coulter I, Hardy M, Shekelle P, Morton SC. Effect of the supplemental use of antioxidants vitamin C, vitamin E, and coenzyme Q10 for the prevention and treatment of cancer. *J Gen Intern Med.* 2003; 21: 735-744.
26. Cragg, G.M., Newman, D.J. Plants as a source of anti-cancer agents. *J. Ethnopharmacol.* 2005; 100 : (2), 72–79.
27. Cruz GL :*Livro Verde das Plantas Medicinai s e Industriais do Brasil.* Belo Horizonte, Velloso AS, 1965; 46-48.
28. Da Silva BP, Parente JP. Bioactive polysaccharides from *Costus spicatus*. *Carbohydr Polym.* 2003; 51: 239–242.
29. DeBerardinis, R.J., Lum J.J., Hatzivassiliou G. The biology of cancer metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.* 2008; 7 (1): 11-20.
30. Denmeade SR., Isaacs JT. The SERCA pump as a therapeutic target: making a „smart bomb“ for prostate cancer. *Cáncer Biol. Ther.* 2005; 4: 14–22.
31. Díaz A. Óxido nítrico, mutagénesis y cáncer. *Rev Cubana Invest Bioméd.* 2004; 23 (3): 184-189.
32. Diplock A. Antioxidant nutrients and disease prevention: an overview. *Am J Clin Nutr.* 1991; 53 (S1):89-93.
33. Dominguez AS. *Phytochemistry Methods Frontiers.* 1a Ed. México, 1990: 118-126.
34. Drögue W. Free Radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002; 82: 47-95.
35. Duchon RM. Section III: Mitochondria, β -cell function, and type 2 diabetes. Roles of mitochondria in health and disease. *Diabetes* 2004; 53(1): 96-102.
36. Eguiarte LE., Rendón A., Rebollar DJ. Caballero N., Martínez A. Hacia una Etnobotánica Mexicana y Moderna. *Boletín de la Sociedad Botánica de México.* 2001; 69: 123-126.
37. Escamilla CI., Cuevas EY., Guevara J. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Rev. Fac. Med.* 2009; 52(2): 73-75.
38. Escamilla JC., Cuevas ME., Guevara FJ. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Rev Fac Med UNAM.* 2009; 52 (2): 73-75.

39. Fang SH, Rao YK, Tzeng YM. Inhibitory effects of flavonol glycosides from *Cinnamomum osmophloeum* on inflammatory mediators in LPS/IFN-gamma-activated murine macrophages. *Bioorg. Med Chem.* 2005; 13: 2381–2388.
40. Fang SH., Rao YK., Tzeng YM. Inhibitory effects of flavonol glycosides from *Cinnamomum osmophloeum* on inflammatory mediators in LPS/IFN-gamma-activated murine macrophages. *Bioorg Med Chem.* 2005; 13: 2381–2388.
41. Feig D., Reid T. and Loeb L. Reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Res.* 2004; 54(1):890-894.
42. Ferrer V., Fonseca C., Garcia E., Martinez F. Óxido nítrico, importancia biológica y participación en algunas funciones cardiovasculares y hematológicas. *Medissan* 1998; 2 (3): 45-53.
43. Ford R. The nature and the status of ethnobotany. 1a ed..Anthropological Papers N° 67. University of Michigan. Ann Arbor, MI, EEUU. 1978.
44. Galati G., O'Brien PJ. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic Biol Med.* 2004; 37:287-303.
45. García B. E., Saldaña B. A., Saldaña G. L. El estrés oxidativo y los antioxidantes en la prevención del cáncer. *Revista Habanera de Ciencias Médicas.* 2012. 12 (2): 187-196 .
46. García T., Saldaña A., Saldaña G. El estrés oxidativo y los antioxidantes en la prevención del cáncer. *Revista Habanera de Ciencias Médicas.* 2012; 12 (2): 187-196.
47. García Triana B, Pérez Trueba G. Especies reactivas del oxígeno y cáncer: mecanismos de acción. Ed. Biomed-CECAM; 2001.
48. Gasparri, S. Estudo da atividade antioxidante mutagênica/antimutagênica induzida pelo extrato vegetal da *Costus*. Dissertação (Mestrado – Área de concentração em Diagnóstico Genético e Molecular) -Universidade Luterana do Brasil, Canoas.2005; 1: 78-82.
49. Gaziano JM., Glynn RJ., Christen WG., Kurth T., Belanger C., MacFadyen J. Vitamins E and C in the prevention of prostate and total cancer in men: the Physicians Health Study II randomized controlled trial. *JAMA.* 2009; 301(1):52-62.
50. Ghantous, A. et al. Structure–activity relationship of seco-tanaphthalides isolated from *Achillea falcata* for inhibition of HaCaT cell growth. *Eur. J. Med. Chem.* 2009; 44: 3794–3797.
51. Goncharova EI, Nadas A, Rossman TG. Serum deprivation but not inhibition of growth per se, induces a hypermutable state in Chinese hamster G12 cells. *Cancer Res.* 1996; 56: 752-756.
52. González M., Ramírez D. Antecedentes y situación reguladora de la medicina herbaria en Cuba. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat.* 2007 (6): 118 - 124.
53. Grenfell A., Velazquez A., Sierra M. Oxido nítrico, estrés nitrosante y función mitocondrial. *Revista de Endocrinología y Nutrición* 2006; 14: 227-232.
54. Gurib-Fakim, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol. Aspects Med.* 2006; 27: 1–93.
55. Gutiérrez G. Eficacia de la Suplementación con L-Arginina (vs. Placebo) sobre Respuesta al Tratamiento Quimioterapéutico Neoadyuvante en Pacientes con Cáncer de Mama [Tesis de Maestría]. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Superior de Medicina. 2010.
56. Gutiérrez J., Morales J.A. Production of free radicals derived from oxygen and hepatocyte damage. *Medicina Interna de México*, 2004 (20):287-295.
57. Gutiérrez Salinas J. ¿Qué sabe usted acerca de los radicales libres? *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas.* 2006; 37(4): 69-73.

58. Guyton KZ, Kensler TW. Oxidative mechanism in carcinogenesis. *Brit Med Bull.* 1993; 49:523-544.
59. Hagerman A., Riedl K., Jones A., Sovik K., Ritchard N., Hartzfeld P., Riechel T. High Molecular Weight Plant Polyphenolics (Tannins) as Biological Antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 1998 ; 46 : 1887-1892.
60. Halliwell, B. "How to characterize a biological antioxidant", in *Free Radical Research Communication.* 1990; 9: 1-32.
61. Halliwell, B., Gutteridge, M., *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, Nueva York, USA, 3rd Ed., 1999: 48-61.
62. Hansberg T. Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mensaje Bioquímico.* 2002; 26:19-54.
63. Hart C, Cohen R, Norwood M, Stebbing J. The emerging harm of antioxidants in carcinogenesis. *Future Oncol.* 2012; 8(5):535-548.
64. Hasnian BJ, Mooradian AD. Recent trials of antioxidant therapy: What should we be telling our patients?. *Clev Clin J Med.* 2004; 71(4):327-334.
65. Helaine M., Hagerman A. *Oxidative Stress exercise and aging.* Edit Imperial College Press Miami University, USA 2006; 1: 74-82.
66. Hernán A., Greig D., Castro P., Verdejo H., Mellado R., García L., Díaz G., Quiroga C., Chiong M., Lavandero S. Ácido úrico; una molécula con acciones paradójicas en la insuficiencia cardiaca. *Rev Med Chile.* 2011; 139: 505-515.
67. Hong S., Magdy S., Costa M. Nickel and Epigenetic Gene Silencing. *Genes Open acces.* 2013; 1: 1-5.
68. Hortelano S, Dallaporta B, Zamzami N. Nitric oxide induces apoptosis via triggering mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett.* 1997; 410:373-377.
69. Inada, A. et al. Anti-tumor promoting activities of natural products. II. Inhibitory effects of digitoxin on two-stage carcinogenesis of mouse skin tumors and mouse pulmonary tumors. *Biol. Pharm. Bull.* 1999; 16: 930-931.
70. INECC.org. 2013. Consulta electrónica: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/download/274.pdf>
71. Jaruga P, Dizdaroglu M. Repair of products of oxidative ADN base damage in human. *Nucl. Acids Res.* 1996; 24 (8): 1389-1394.
72. Jones DP, Carlson JL, Mody VC, Cal J. Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radic Biol Med.* 2000;28(4):625-35.
73. Kawada N., Seki S., Inoue M., Kurobi T. Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin and N-acetylcysteine, on the function of cultured rat hepatic stellate cells and Kupffer cells. *Hepatology.* 1998; 27:1265-1274.
74. Kawazoe N., Watabe M., Masuda Y., Nakajo S., Nakaya K. Tiam1 is involved in the regulation of bufalin-induced apoptosis in human leukemia cells. *Oncogene.* 1999; 18:2413-2421.
75. Keller AC., Vandebroek I., Liu Y., Balick MJ., Kronenberg F., Kennelly EJ., Brillantes AM. *Costus spicatus* tea failed to improve diabetic progression in C7BLKS/J db1 db mice, a model of type 2 diabetes mellitus. *Journal of Ethnopharmacology.* 2009; 121(2): 248-254.
76. Kim M., Cho H., Jung M, Hong M., Lee S., Shin B., Ahn B. and Jung Y. Extracellular signal-regulated kinase and AP-1 pathways are involved in reactive oxygen species-induced urokinase

- plasminogen activator receptor expression in human gastric cancer cells. *Int J Oncol.* 2005; 26(6):1669-1674.
77. Kliebenstein DJ. Metabolitos secundarios e interacciones planta/medio ambiente: una visión a través de *Arabidopsis thaliana*. *Plantas, Celular y del Medio ambiente.* 2004; 27: 675-684.
 78. Kress WJ., The phylogeny and classification of the Zingiberales. *Ann. Missouri Bot. Gard .* 1990; 77:698-721.
 79. Kubo A, Corley DA. Meta-analysis of antioxidant intake and the risk of esophageal and gastric cardia adenocarcinoma. *Am J Gastroenterol.* 2007; 102(10):2323-2330.
 80. Kuchino, Y.; Mori, F.; Kasai, H.; Inoue, H.; Iwai, S.; Miura, K.; Ohtsuka, E. and Nishimura, S. Misreading of DNA templates containing 8-hydroxy- doxyguanosine at the modified base and at adjacent residues. *Nature* 1987; 327: 77-79.
 81. Kulikov A., Eva A., Kirch U., Boldyrev A., Bobis G. Ouabain activates signaling pathways associated with cell death in human neuroblastoma. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007; 1768: 1691–1702.
 82. Kumar PA., Upadhyaya K. Tannins are Astringent. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry.* 2012; 1 (3): 1-6.
 83. Lacy A ., O’Kennedy R . Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer. *Curr Pharm Des.* 2004; 10 (30): 3797 – 3811.
 84. Ladio A. Los desafíos actuales de la Etnobotánica. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.* 2006; 5(2): 27-31.
 85. Lafrenie R, Shaughnessy SG, Orr FM. Cancer cell interactions with injured oactivated endothelium. *Cancer Metastasis Res.* 1992; 11:37-88.
 86. Langenhan J M., Peters NR., Guzei, IA., Hoffmann FM., Thorson JS. Enhancing the anticancer properties of cardiac glycosides by neoglycorandomization. *Proc. Natl Acad. Sci.* 2005; 102: 12305–12310.
 87. Laughton MJ., Halliwell B., Evans PJ. Antioxidant and prooxidant actions of the plant phenolic quercetin, gossypol and myricetin. Effect on lipid peroxidation, hydroxyl radical generation, and bleomycin-dependent damage to DNA. *Biochem Pharmacol.* 1989, 38:2859-2886.
 88. Lin J., Wang J., Jiann B., Yu C., Tsai J., Huang J. and Wu T. Correlation of p53 protein accumulation and Bcl-2 overexpression with histopathological features in prostatic cancer. *J Formos Med Assoc.* 2005; 104(11):864-867.
 89. Lo YYC, Wong JMS, Cruz TF. Reactive oxygen species mediated cytokine activation of c-Jun NH2-terminal kinases. *J Biol Chem.* 1996; 271(15):703-707.
 90. López I., Leyva E., García RF. Las Naftoquinonas: más que pigmentos naturales. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas.* 2011; 42(1): 6-17.
 91. López L., M. et al. Digitoxin inhibits the growth of cancer cell lines at concentrations commonly found in cardiac patients. *J. Nat. Prod.* 2005; 68: 1642–1645.
 92. Lucindo J., Quintans J., Santana M., Melo M., De Sousa D., Santos I., Siqueira R., Lima T., Silveira G., Antonioli A., Ribeiro L., Santos M. Antinociceptive and anti-infkammatory effects of *Costus spicatus* in experimental animals. *Pharmaceutical Biology.* 2010; 48 (10): 1097-1102.
 93. Ludy MSc., Baquero P., Vanegas J., Rendón M., Santos R., Hernández P. Actividad antioxidante y antibacteriana de extractos de hojas de cuatro especies agroforestales de la Orinoquía colombiana. *Revista Cubana de Plantas Medicinales.* 2013; 18 (1): 57-70.

94. Lutosławska G., Tkaczyk J, Panczenko B, Hubner WE, Skierska E. Plasma TBARS, blood GSH concentrations, and erythrocyte antioxidant enzyme activities in regulatory and anovulatory menstrual cycles. *Clin Chim Acta*. 2003; 331: 159-163.
95. Maas, P.J.M. Costoideae (Zingiberaceae). *Flora Neotropicana*. 1972; 8: 1-140.
96. Mahato SB., Ganguly AN., Sahu NP. Steroid saponins. *Phytochemistry* . 1982; 21 (5): 959-978.
97. Maier T., Goppert A., Kammerer D.R., Schieber A., Carle R. Optimization of a process for enzyme-assisted pigment extraction from grape (*Vitis vinifera* L.) pomace. *Eur. Food Res. Technol*. 2008; 227: 267–275.
98. Maldonado O., Nahum E., Bernabé M., Ceballos G. y Mendez E. Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. *Rev. Med*. 2010;1: 32-37.
99. Maldoni, B. “Alkaloids: Isolation and Purification. *Journal of Chemical Education*. 1991; 68: 700-703.
100. Manfred L. 7000 Recetas Botánicas a Base de 1300 Plantas Medicinales Americanas. Buenos Aires, Editorial Kier. 1947: 75-83.
101. Mann G., Thorne H., Balleine R., Butow P., Clarke C., Edkins E., Evans G., Fereday S., Haan E., Gattas M., Giles G., Goldblatt J., Hopper J., Kirk J., Leary J., Lindeman G., Niedermayr E., Phillips K., Picken S., Pupo G., Saunders C., Scott C., Spurdle A., Suthers G., Tucker K., Chenevix G. and Kathleen C. Consortium for Research in Familial Breast Cancer. Analysis of cancer risk and BRCA1 and BRCA2 mutation prevalence in the kConFab familial breast cancer resource. *Breast Cancer Res*. 2006; 8(1):1-12.
102. Marek WR. Nitric oxide. Biological mediador modulador and factor of injury: it is role. *Rev Hum Med*. 2004; 9(2); 27-33.
103. Martínez A. Esteroides cardiotónicos. [Manual] Medellín. Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmacéutica; 2002.
104. Martínez C., Vargas C., Arancibia S. Estrés oxidativo y neurodegeneración . *Rev. Fac.Med UNAM*, 2003;46:229-235.
105. Martínez F S., González GJ., Culebras JM., Tuñon MJ. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp* 2002; 17(6): 271-278.
106. Martínez MA. Saponinas Esteroides. [Manual] Medellín. . Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmacéutica; 2001.
107. Martínez S., González J., Culebras JM., Tuñon MJ. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp* 2002; 17(6): 271-278.
108. Martino V. Los Flavonoides como promisorios agentes preventivos y terapéuticos. *Acta Farm. Bonaerense*. 2000; 19(4): 303-308.
109. Mayor O. Estrés oxidativo y sistema de defensa antioxidante. *Rev. Inst. Med. Trop*. 2010; 5 (2): 23-29.
110. Mayuko K., Takako Y., Masahiro A. Simoltaneous measurement of nitric oxide, blodd glucose and monoamines in the hippocampus of diabetic rat: an in vvo microdialysis study. *Neurochemistry International*. 2004; 44: 65-73.
111. McAlindon TE., Biggee BA. Nutritional factors and osteoarthritis: recent developments. *Curr Opin Rheumatol*. 2005; 17:647-652.
112. McConkey DJ., Lin Y., Nutt LK., Ozel, H. Z. Newman, R. A. Cardiac glycosides stimulate Ca²⁺ increases and apoptosis in androgen-independent metastatic human prostate adenocarcinoma cells. *Cancer Res*. 2000; 60: 3807–3812.

113. Meeran SM, Katiyar SK. Cell cycle control as a basis for cancer chemoprevention through dietary agents. *Front Biosci.* 2008; 13: 2191-2202.
114. Melik A., Bravo J., Carpena X., Switala J., Maté MJ., Fita I., Loewen P. Substrate flow in catalases deduced from the cristal structures of active site variants of HP11 from *Escherichia coli*. *Proteins.* 2001; 44: 270-281.
115. Mena V., Riverón R. Óxido nítrico/ sepsis, controversias en su metabolismo, funciones y utilización. *Rev. Cubana Pediatr* 1999; 71(4): 238-244.
116. Merck, S.A. Bioflavonoides: Quercetina y Rutina. Industrias Químicas. Informe a Profesionales, 2000; 1: 25-28.
117. Mijatovic T., Dufrasne F., Kiss R. "Cardiotonic steroids mediated targeting of the Na⁺/K⁺-ATPase to combat chemoresistant cancers." *Current Medicinal Chemistry.* 2012; 19(5): 627-646.
118. Miranda CL., Apondo GL., Stevens JK., Deinzer ML., Buhler DR. Prenylated chalcones and flavanones as inducers of quinone reductases in mouse Hepa 1clc7 cells. *Cancer Letts.* 2000, 149:21-29.
119. Miwa S, Muller FL, Beckman KB. The basics of oxidative biochemistry. In: Miwa S, Muller FL, Beckman KB, editors. *Oxidative Stress in Aging: From Model Systems to Human Diseases.* Totowa, NJ: Humana Press; 2008;1: 11-37.
120. Mohammad A., Nabavi S., Bahramian F., Reza A. Antioxidante and free radical scavenging activity of *H. officinalis* L. Var. *Angustifolius*, *V. Odorata*, *B. Hyrcana* and *C. speciosum*. *Pak. J. Pharma Sci.* 2010; 23 (1): 29-34.
121. Montero E. Los radicales libres y las defensas antioxidantes. *An FacMed (Perú).* 1996; 57 (4):278- 281.
122. Mora A., Aragón DM., Ospinga LF. Caracterización del estrés oxidativo en ratas wistar diabéticas por estreptozotocina. *VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica.* 2009; 16 (3): 311-319.
123. Myhrstad MC., Carlsen H., Nordstrom O., Blomhoff R., Moskaug JJO. Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the gamma-glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *Free Radic Biol Med,* 2002; 32:386-393.
124. Nasu S., Milas L., Kawabe S., Raju U., Newman, R. Enhancement of radiotherapy by oleandrin is a caspase-3 dependent process. *Cancer Lett.* 2002; 185: 145–151.
125. Newman RA. Autophagic cell death of human pancreatic tumor cells mediated by oleandrin a lipid-soluble cardiac glycoside. *Integr Cancer Ther.* 2007; 6: 354–364.
126. Newman RA. Cardiac glycosides stimulate Ca²⁺ increases and apoptosis in androgen independent metastatic human prostate adenocarcinoma cells. *Cancer Res.* 2000; 60: 3807–3812.
127. Núñez Sellés AJ. Antioxidants therapy: Myth or reality? *J Braz Chem Soc.* 2005;16:699-710.
128. Núñez Sellés AJ. Terapia antioxidante, estrés oxidativo y productos antioxidantes: retos y oportunidades. *Rev Cubana Salud Pública.* 2011; 37(5): 644-660.
129. Oliveira A., Rodriguez AF., Lopez C. The association of fruits, vegetables, antioxidant vitamins and fiber intake with high-sensitivity C reactive protein: sex and body mass index interactions. *Eur J Clin Nutr.* 2009; 63(11):1345-1352.

130. OMS. “Estrategias de la OMS sobre medicina tradicional”. Geneva, 2002. Disponible en: <http://www.amhb.org.br/medicinas/estrategia.pdf>.
131. Ortiz, A., Castillo R., Beausoleil, I. Carcinogénesis por óxido de níquel en 2 líneas de ratones consanguíneas. *Revista Cubana de Oncología*, 1995; 15: 24-35.
132. Otero W., Velasco H. The protective role of bilirubin in human beings. *Rev Col Gastroenterol*. 2009; 24: 287-294.
133. Paes LS., Mendoça MS., Casas LL. Aspectos estruturais e fitoquímicos de partes vegetativas de *Costus spicatus* (Jacq.)Sw. (Costaceae). *Rev. Bras. Pl.Med.*, Campinas. 2013; 15(3): 380-390.
134. Pardo M., Gómez E. Etnobotánica: aprovechamiento tradicional de plantas y patrimonio cultural. *Anales de Jardín Botánico de Madrid*. 2003; 60(1): 171-182.
135. Pasqualotto FF., Sharma RK., Potts JM., Nelson DR., Thomas AJ., Agarwal A. Seminal oxidative stress in patients with chronic prostatitis. *Urology*. 2000; 55: 881-885.
136. Peng W., Li Y., Zhu C., Han X., Yu B. Synthesis of tamarixetin and 3-O-neohesperidoside. *Carbohydrate Research*. 2005; 340: 1682-1688.
137. Pengelly, A. *The constituents of Medicinal Plants*. 2nd Ed. U.K. Cabi Publishing; 1996.
138. Peraza RL. Catalasa en radicales libres y estrés oxidativo aplicaciones médicas. Editor Koningsberg F.M. ed. *El Manual Moderno*. México 2008; 183-200.
139. Peres W., Tuñón MJ., Collado PS., Herrmann S., Marroni N., González GJ. The flavonoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction. *J Hepatol*, 2000;33:742-750.
140. Pérez A., Abilés J. y Castaño J. Estrés oxidativo y su implicación en distintas patologías. *Nutrición Clínica en Medicina*. 2008; 2: 45-64.
141. Pérez MM., Sueiro OM., Boffill CM., Morón RF., Marrero FE., Rodríguez RM., Méndez OR., González MD. Estudio etnobotánico de las plantas más utilizadas como diuréticas en la Provincia de Villa Clara, Cuba. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 2011; 10(1): 46-55.
142. Pham-Huy LA, He H and Pham-Huyc C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedical Science*. 2008; 4(2): 89- 96.
143. Pouget C, Fagnere C, Basly JP. Synthesis and aromatase inhibitory activity of flavanones. *Pharm Res*, 2002; 19:286-291.
144. Prassas and E. P. Diamandis, “Novel therapeutic applications of cardiac glycosides,” *Nature Reviews Drug Discovery*. 2008; 7 (11):926-935.
145. Puangpraphant S, Berhow, De Mejia EG. Mate (*Ilex paraguariensis* St Hilare) saponins induce caspase-3-dependet apoptosis in human colon cancer cell in vitro. *Food Chem*. 2011; 125: 1171-1178.
146. Putman C., Arvai A., Bourne Y., Tainer J. Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism . *Journal of Molecular Biology*. 2000; 296 (1): 295-309.
147. Quintans LJ., Santana MT., Melo MS., Sousa DP., Santos I., Siqueira RS., Lima TC., Silveira G., Antonioli A., Ribeiro L., Santos M. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Costus spicatus* in experimental animals. *Pharmaceutical Biology*. 2010; 48(10): 1097-1102.
148. Rahman I., Tomasi A. The role of oxidants and antioxidants in the regulation of chronic diseases. *Free Radic Res*.2003; 37:349-354.

149. Raj Kapoor B, Burkan ZE, Senthilkumar R. Oxidants and human diseases: role of antioxidant medicinal plants-a review. *Pharmacologyonline*. 2010; 1: 1117-1131.
150. Ranelletti FO., Ricci R., Larocca LM. Growth-inhibitory effect of quercetin and presence of type-II estrogen binding sites in human colon-cancer cell lines and primary colorectal tumors. *Int J Cancer*. 1992; 50:486-492.
151. Rauchová H., Vokurková M., Koudelová J. Developmental Changes of Erythrocyte Catalase Activity in Rats Exposed to Acute Hypoxia. *Physiol. Res*. 2005; 54 : 527: 532.
152. Reitter RJ. Oxidative processes and antioxidative mechanisms. *FASEB J*. 1995; 9:526-533.
153. Ren W., Qiao Z., Wang H. Tartary buckwheat flavonoid activates caspase 3 and induces HL-60 cell apoptosis. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 2001; 23:427-432.
154. Roberts DD., Isenberg JS., Ridnour LA., Wink DA. Nitric oxide and its gatekeeper in tumor angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2007; 13(3): 795-798.
155. Sabitha AR., Sulakshana G., Patnaik S. *Costus speciosus* , an antidiabetic plant. *FSJ Pharm Res*. 2012; 1 (3):52-53.
156. Sáez Tormo G. Biopatología de los radicales libres. *Fac Med Valencia*. 2009; 32:283-300.
157. Salinas, N.R. & J. Betancur. La familia Costaceae en Colombia. *Actualidades Biológicas* .2007; 1: 83-88.
158. Salminen A., Lehtonen M., Suuronen T., Kaarnirante K., Huuskonen J. Terpenoides: natural inhibitors of NF-kB signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. *Cell. Mol. Life Sci*. 2008 ; 65: 2979-2999.
159. Sánchez B. Mecanismo de acción del óxido nítrico en el organismo y su acción como agente terapéutico. *Revista Mexicana de Enfermería Cardiológica* 2003; 11(2): 72-76.
160. Sánchez M., Torres J., Tormos C., Iradi A., Oliva M. and Muniz P. Impairment of antioxidant enzymes, lipid peroxidation and 8-oxo-2-deoxyguanosine in advanced epithelial ovarian carcinoma of a spanish community. *Cancer Lett*.2006; 233 (1): 28-35.
161. Scambia G., Ranelletti FO., Panici PB. Inhibitory effect of quercetin on OVCA 433 cells and presence of type II estrogen binding sites in primary ovarian tumors and cultured cell. *Br J Cancer*, 1990; 62:942-947.
162. Segler, D.S. *Plant Secondary Metabolism*. Kluwer. Nueva York. 2001: 17-31.
163. Sestili P., Diamantini G., Bedini. Plant-derived phenolic compounds prevent the DNA single-strand breakage and cytotoxicity induced by tert-butylhydroperoxide via an iron-chelating mechanism. *Biochem J*, 2002; 364:121-128.
164. Sethi G., Ahn K.S., Pandey MK, Aggarwal BB. Celastrol, a novel triterpene, potentiates TNF-induced apoptosis and suppresses invasion of tumor cells by inhibiting NF-kB-regulated gene products and TAK1-mediated NF-kB activation. *Blood* . 2007; 109: 2727–2735.
165. Shi X, Jiang H, Mao Y, Ye J, Saffiotti U. Vanadium (IV)-mediated free radical generation and related 2'-deoxyguanosine hydroxylation and ADN damage. *Oncology*. 1996; 106:27-38.
166. Shyni CT., Saxena A., Prakash GS. Phytochemical investigation of the insulin plant "*Costus pictus*" D. Don. *Int J Pharm Biomed Res*. 2013; 4 (2): 97-104.
167. Singh, N.P., Verma, K.B. Case report of a laryngeal squamous cell carcinoma treated with artesunate. *Arch. Oncol*. 2002; 10: 279–280.
168. Son TG, Camandola S, Mattson MP. Hormetic dietary phytochemicals. *Neuromol Med*. 2008; 10(4):236-246.

169. Soodabeh S., Abdollahi M. Antioxidants: Friends or foe in prevention of treatment of cancer: The debate of the century. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2013; 271: 49-63.
170. Sparg SG., Light ME., Staden J. Biological activities and distribution of plant saponins. *J Ethnopharmacol*. 2004;94:219–243.
171. Specht, C.D. & D.W. Stevenson A new phylogeny-based generic classification of Costaceae (Zingiberales). *Taxon*. 2006; 55(1): 153-163.
172. Stanner SA., Hughes J., Kelly CN., Buttriss J. A review of the epidemiological evidence for the antioxidant hypothesis. *Public Health Nutr*. 2004; 7:407-422.
173. Sudheesh S., Sandhya C., Sarah KA., Vijayalakshmi NR. Antioxidant activity of flavonoids from *Solanum melongena*. *Phytother Res* 1999; 13: 393-396.
174. Taiz, L. y Zeiger, E. *Plant Physiology*. Fourth Edition. Sinauer Associates. USA. 2006: 211-241.
175. Taylor EL, Megson IL, Haslett C, Rossi AG. Nitric oxide: a key regulator of myeloid inflammatory cell apoptosis. *Cell Death Differ*. 2003; 10(4):418-430.
176. Terao J., Piskula MK. Flavonoids as inhibitors of lipid peroxidation in membranes. In Rice-Evans CA and Packer L. (editor), *Flavonoids in health and disease*. Marcel Dekker. New York. 1997;1: 277-295.
177. Tholl, D. Terpene synthases and the regulation diversity and biological roles of terpene metabolis. *Curr. Opin Plant Biol*. 2007; 9: 297–304.
178. Thomson, R.H. *Naturally Occurring Quinones*. 1a Ed. USA. Butter Worths Scientific Publications; 1957:28-47.
179. Tolosa L., Cañizares E. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos propóleos de Campeche. *Ars Pharmaceutica*. 2002; 43 (2): 187-204.
180. Trédan O, Galmarinin CM, Patel K, Tannock IF. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99: 1441-54.
181. Tropicos.org. 2013. Consulta electrónica: <http://www.tropicos.org/Name/34500638?langid=66>.
182. Tucker H. The anticancer mode of action of the quinone natural product cribrastatin 6. [Tesis de Doctorado] University of Illinois at Urban Champaign. 2010.
183. Tuncyurek P., Yenisey FK., Soyder A., Bocakci T., Cevikel M. Nitric oxide as an Independent Regulatory Factor in Regenerating Rat Liver. *Acta chir belg*. 2006; 106 : 581-587.
184. UNAM. 2013. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. Consulta electrónica: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7037>.
185. Ursini F., Maiorino M., Morazzoni P. A novel antioxidant flavonoid (IdB 1031) affecting molecular mechanisms of cellular activation. *Free Rad Biol Med*, 1994, 16:547-553.
186. Valko M., DieterLeibfritz, Moncol J., Cronin M., Mazur M., Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2007 ; 39: 44-84.
187. Van Ginkel, A. Apuntes del Máster y Diplomatura de posgrado de la UAB “Plantas Medicinales y Fitoterapia”. Módulo 2. Cultivo de plantas medicinales. Tecnología y Producción. 2003.

188. Vaz da Silva M., Loureiro AI., Falcao A., Nunes T., Rocha JF., Fernandez C. Effect of food on the pharmacokinetic profile of trans-resveratrol. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2008; 46(11):564-570.
189. Venereo G. Daño oxidativo, Radicales libres y Antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit.* 2002; 31 (2):126-133.
190. Vertugno M., Maino A., Cardia G., Quaranta MG., Cardia L. A randomised, double masked, clinical trial of a high dose of vitamin A and vitamin E supplementation after photorefractive keratectomy. *Br J Ophthalmol.* 2001; 85:537-539.
191. Vovides A. Flora del Bajío y de Regiones adyacentes. Instituto de Ecología, A.C. 1993; 18: 1-14.
192. WHO. Estrategia de la OMS sobre la medicina tradicional. 2002 Ginebra, Suiza.
193. Winnicka K., Bielawski K., Bielawska, A. Cardiac glycosides in cancer research and cancer therapy. *Acta Pol. Pharm.* 2006 ; 63, 109–115.
194. Yilmaz, Y., Toledo RT. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis.* 2006; 19: 41-44.
195. Yoshida M., Sakai T., Hosokawa N. The effects of quercitin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells. *FEBS Lett,* 1990; 260:10-13.
196. Zamora N. Flora Digital de la Selva. Organización para Estudios Tropicales. 2006; 1: 1-7.
197. Zhang, S. et al. Anti-cancer potential of sesquiterpene lactones: bioactivity and molecular mechanisms. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents.* 2005; 1: 239–249.
198. Zhou J., Zhang, Y. Cancer stem cells: models, mechanisms and implications for improved treatment. *Cell Cycle.* 2008; 7: 1360–1370.
199. Zorrilla A.E., Eirez M., Izquierdo M. Papel de los radicales libres sobre el ADN: carcinogénesis y terapia antioxidante. *Rev Cubana Invest Biomed.* 2004; 22 (1):51-57.
200. Zulueta A., Esteve MJ., Frígola A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry.* 2009;114(1):310-316.

XII. Anexos

12.1 Entrevista Etnofarmacológica



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza
Unidad Multidisciplinaria de Investigación, L.7. P.A. Terapia Molecular



N° de Entrevista:

Fecha:

Sexo:

Nombre del entrevistado:

Edad:

1. ¿Qué enfermedades ha padecido y cuáles han presentado sus familiares más cercanos?
2. ¿Qué alimentos consume regularmente?
3. ¿Con qué nombre (s) conoce a la planta?
4. ¿Cuál es el uso que usted le ha dado a la planta?
5. ¿Conoce algún otro uso de la planta?
6. ¿Cómo supo usted del uso medicinal de la planta? ¿Quién le recomendó su uso?
7. ¿Qué parte de la planta utilizo? ¿Tuvo una preparación? ¿Se usa sola o combinada?
8. ¿Le advirtieron sobre algún efecto adverso sobre el uso de la planta?
9. ¿Cómo fue su aplicación?
10. ¿Cómo inicio y progresó su padecimiento?
11. ¿Cuánto tiempo transcurrió desde la detección del problema hasta el inicio del tratamiento?
12. ¿Cuánto duró el tratamiento y con qué frecuencia?
13. ¿Cuáles fueron sus observaciones más importantes durante el tratamiento?
14. ¿Además de utilizar la planta, tenía otro tratamiento? ¿Cuál era?
15. ¿Presento algunas molestias durante el uso?
16. ¿Al término del tratamiento usted ha observado nuevas lesiones?

Nota:

12.2 Reacciones Químicas utilizadas para la Identificación de Metabolitos Secundarios

Alcaloides

Reactivo de Mayer: Se prepara disolviendo 0.65 g HgCl₂ (J.T. Baker, grado RA) en 30 ml de H₂O y 2.5 g de KI (Meyer, grado RA) aforado a 50 ml. Los alcaloides se detectan a la formación de un precipitado blanco o de color crema soluble en C₂H₄O₂ y C₂H₆O.

Reactivo de Dragendorf: Se prepara mezclando 2g de (Bi(NO₃)₃·5H₂O (J.T. Baker, grado RA) en 5 ml de HNO₃ al 30% con una solución de 6.8 % KI (Meyer, grado RA) en 12.5 ml de H₂O. Se deja en reposo por 24 hr, se decanta y se afora a 25 ml. La presencia de alcaloides se detecta por la formación de un precipitado naranja-rojizo cuando se le adiciona el reactivo a una solución acida de alcaloides.

Reactivo de Wagner: Se disuelven 0.31 g de I sublimado (J.T. Baker, grado RA) y 0.5g de KI (Meyer, grado RA) en 25 ml de H₂O. Los alcaloides se detectan a la formación de un precipitado de color naranja-rojizo.

Cumarinas:

Reactivo de Baljet: Se prepara disolviendo 0.25g de C₆H₃N₃O₇ (Meyer, grado RA) en 25 ml de C₂H₆O y 2.5g de NaOH (J.T. Baker, grado RA) en 25 ml de H₂O. La prueba es positiva cuando aparece una coloración o precipitado de color rojo.

Reactivo de Hidroxamato Férrico: Se prepara una solución de Clorhidrato de hidroxilamina (J.T. Baker, grado RA) 2% C₂H₆O y NaOH (J.T. Baker, grado RA), se calienta de 2-5 min a 100° C hasta que aparezca una espuma de color rojizo. Se enfría y acidula con HCL y se añade FeCl₃ (J.T. Baker, grado RA), la formación de una coloración violeta da positiva la prueba.

Esteroides y Triterpenos libres

Reactivo de Lieberman-Burchard: Se prepara mezclando 1 ml de CHCl₃ y 1 ml de C₄H₆O₃ (Sigma, grado RA). La formación de una coloración azul – verde indica la presencia de un núcleo esteroide. Si la coloración es roja- naranja indica la presencia de núcleo triterpenico.

Flavonoides

Reacción de Shinoda: Los extractos acuosos e hidroalcoholicos se disolvieron en C₂H₆O y se le adicionaron limaduras de Mg (J.T. Baker, grado RA), posteriormente se adiciono HCL gota a gota, hasta la formación de una coloración violeta, rojiza o naranja que destaca la presencia de flavonoides.

Glicósidos Cardiotónicos

Reactivo de Baljet: Se prepara disolviendo 0.25g de C₆H₃N₃O₇ (Meyer, grado RA) en 25 ml de C₂H₆O y 2.5g de NaOH (J.T. Baker, grado RA) en 25 ml de H₂O. La prueba es positiva cuando aparece una coloración o precipitado de color rojo.

Reactivo de Keller- Killiani: Se prepara disolviendo 1 g de FeCl₃·6H₂O (Mallinckrod, G.A), 2% en C₂H₄O₂, se aplica 1 ml a los extractos e inmediatamente se agrega gota a gota H₂SO₄, la formación de una coloración verde o parda, da positiva la prueba.

Reactivo de Lieberman-Burchard: Se prepara mezclando 1 ml de CHCl_3 y 1 ml de $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3$ (Sigma, grado RA). La formación de una coloración azul – verde indica la presencia de un núcleo esteroide. Si la coloración es roja- naranja indica la presencia de núcleo triterpenico.

Lactonas Sesquiterpénicas

Reactivo de Hidroxamato Férrico: Se prepara una solución de Clorhidrato de hidroxilamina (J.T. Baker, grado RA) 2% $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ y NaOH (J.T. Baker, grado RA), se calienta de 2-5 min a 100°C hasta que aparezca una espuma de color rojizo. Se enfría y acidula con HCl y se añade FeCl_3 (J.T. Baker, grado RA), la formación de una coloración violeta da positiva la prueba.

Reactivo de Lieberman-Burchard: Se prepara mezclando 1 ml de CHCl_3 y 1 ml de $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3$ (Sigma, grado RA). La formación de una coloración azul – verde indica la presencia de un núcleo esteroide. Si la coloración es roja- naranja indica la presencia de núcleo triterpenico.

Naftoquinonas y Antroquinonas

Reacción Bornträger-Kraus: Los extractos acuosos e hidroalcoholicos se trataron con una solución de KOH (J.T. Baker, grado RA) al 5%, se filtró y acidulo con 3 gotas de HCl , se sacudió con C_6H_6 y se dejó en reposo durante 3 h. Posteriormente se observa la separación de a fase bencénica, a la cual se añade una solución de NH_4OH (J.T. Baker, grado RA) 2%. La formación de una coloración rosa al rojo intenso dará la prueba positiva.

Saponinas:

Ensayo de espuma: Consiste en agitar las muestras de extractos hasta la formación de espuma, la prueba es positiva si la espuma es estable por 15-30 min.

Reactivo de Lieberman-Burchard: Se prepara mezclando 1 ml de CHCl_3 y 1 ml de $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3$ (Sigma, grado RA). La formación de una coloración azul – verde indica la presencia de un núcleo esteroide. Si la coloración es roja- naranja indica la presencia de núcleo triterpenico.

Taninos

Reactivo de Gelatina-Sal: Se prepara disolviendo 0.25 g de gelatina en 25 ml de H_2O que contengan 10% NaCl (J.T. Baker, grado RA), la prueba da positivo si se forma un precipitado de color blanco.

Reacción de Cloruro Férrico: A los extractos acuosos e hidroalcoholicos, se les adiciona de 2 -5 gotas de cloruro ferrico hexahidratado (Mallinckrod, G.A) al 10 %. La aparición de una coloración verde, azul o negro da positiva la prueba.

Las dos pruebas son necesarias para comprobar la presencia de taninos.

Solución de Bouin: Se prepara una solución saturada de $\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_7$ en 13 ml de formalina al 10%, se agrega 1 ml de $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ al momento de ser utilizado.

12.3 Fotografías de Formación de Tumores

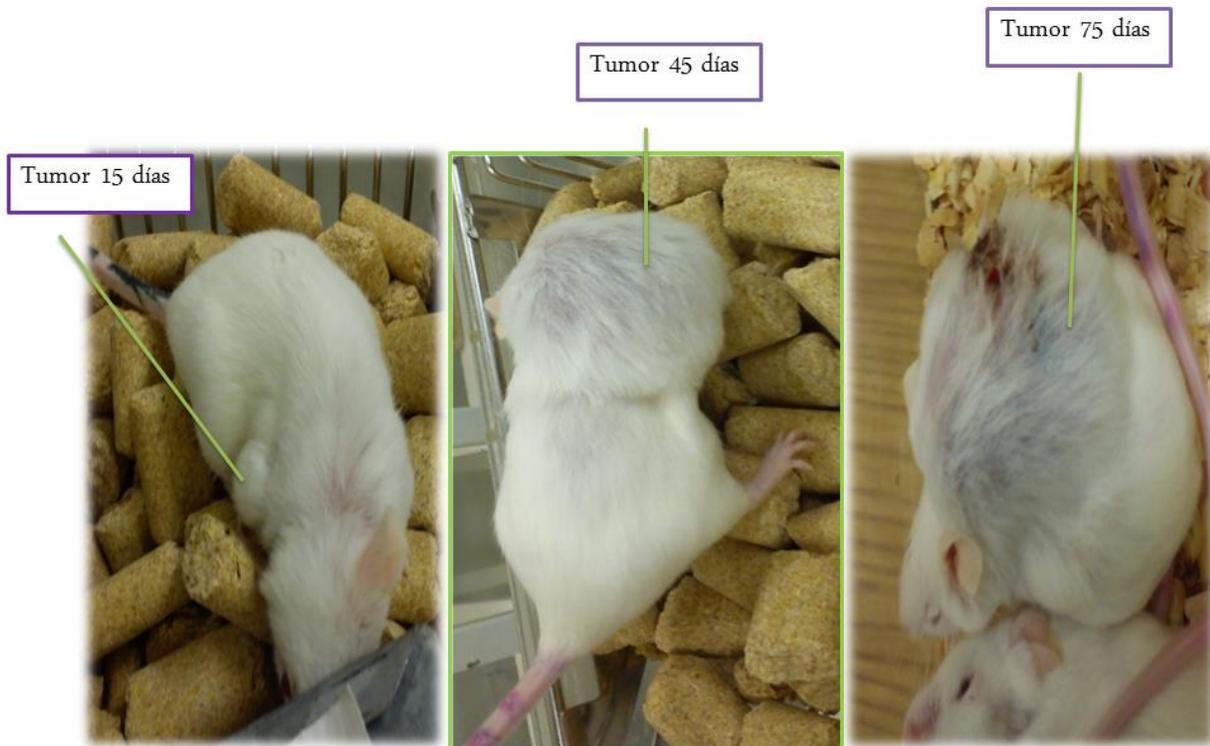


Fig. 15 Formación de tumor en cuello (lado derecho) del ratón hembra (cepa CD-1) inducida con NiO.



Fig. 16 Tumor disectado del cuello