



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Actividad antioxidante de los extractos de *Heliotropium angiospermum* M. en un modelo de cáncer

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

Alejandra Berenice Ramírez Mendoza

DIRECTORA DE TESIS:

M en C. Catalina Machuca Rodríguez

MÉXICO D.F, JUNIO DE 2015





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Actividad antioxidante de los extractos de *Heliotropium angiospermum* M. en un modelo de cáncer

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

Alejandra Berenice Ramírez Mendoza

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 y García Figueroa

Suplente: Dra. Hortensia Rosas Acevedo

Suplente: M. en C. Rodrigo Anibal Mateos Nava

MÉXICO D.F, JUNIO 2015

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

AGRADECIMIENTOS

A los miembros del jurado:

Dr. Benny Weiss Steider

M en C. Catalina Machuca Rodríguez

Dra. Francisca Leonora Sánchez y García Figueroa

Dra. Hortensia Rosas Acevedo

M. en C. Rodrigo Anibal Mateos Nava

Por dedicarle tiempo a la revisión de mi tesis, agradezco cada una de sus correcciones y valiosas aportaciones para que mi trabajo mejorara.

A la Universidad Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, por haberme formado como profesionista de calidad.

A todos los profesores que contribuyeron a mi formación profesional, en especial a la M. en C. Catalina Machuca Rodríguez y al Dr. Ernesto Mendoza Vallejo, ya que no solo me forjaron como una excelente profesional, sino también me hicieron crecer en el ámbito personal. Gracias

A mis amigos y compañeros de laboratorio que además de brindarme una gran amistad, también compartieron sus conocimientos conmigo, gracias a ustedes mi estadía en el laboratorio fue un completo aprendizaje.

A la comunidad de Limón Chiquito, en especial a la señora Verónica Ramírez por brindarme las facilidades para el desarrollo de esta investigación.

DEDICATORIAS

A mis padres:

Esta tesis va dedicada principalmente a ustedes ya que sin su apoyo no hubiera podido llegar hasta donde estoy ahora, no hay palabras para describir cuan agradecida estoy por todo lo que han hecho por mí, me han regalado la mejor herencia que toda persona puede tener.

A ti mamá gracias por tu infinito amor, comprensión y apoyo, porque siempre has estado en las buenas y en las malas, gracias por esos regaños, esas palabras de aliento que sin dudarlas han hecho de mí una mejor persona, porque a pesar de cada tropiezo que he tenido me has brindado tu mano para levantarme y seguir adelante, te agradezco el ser mi consejera, mi apoyo, tu eres mi mejor regalo, y sin ti nunca hubiera podido culminar esta etapa, gracias por acompañarme en este camino, te amo.

A ti papá que siempre has estado pendiente de mí, que me has cuidado y brindado tu apoyo, gracias por regalarme palabras de aliento, por cada consejo, por guiarme por un camino recto, pero sobre todo por confiar en mí, este logro también es tuyo, te amo.

A mis hermanos:

Gracias por acompañarme en esta trayectoria, por estar conmigo y brindarme su apoyo.

A ti Marilú gracias por todo lo que has hecho por mí, por cada consejo y palabra de aliento que me has dado, por cuidarme y procurarme, gracias por ser la mejor hermana del mundo, te amo.

A ti Iván gracias porque a pesar de todo siempre me has apoyado y has estado pendiente de mí, gracias por brindarme tu apoyo, eres el mejor hermano del mundo, te amo.

A mis profesores:

A usted profesora Catalina, por haberme abierto las puertas de su laboratorio y brindarme su amistad, por cada regaño y cada palabra de aliento, por ayudarme a seguir adelante y transmitirme cada conocimiento, pero sobre todo por hacer de mí una mejor persona y una gran profesional. Gracias.

A usted profesor Ernesto gracias por el apoyo incondicional que me brindó, por el gran cariño que siempre nos demostró, por la confianza, pero sobre todo por su gran amistad.

A mis amigos:

A cada uno de ustedes gracias por brindarme su amistad y su apoyo durante toda la carrera, porque sin su compañía este camino no hubiera sido igual. Los quiero.

A ti Mónica gracias por brindarme tu apoyo, por darme ánimo cuando lo necesito, porque a pesar de todo siempre has estado ahí, gracias por recorrer este camino conmigo.

A ti Karla gracias por brindarme tu amistad, tus consejos y esas palabras de aliento cada vez que las necesitaba, gracias por compartir este camino, eres una gran amiga para mí.

A ti Nalleli gracias por brindarme tu apoyo, tu amistad, tu cariño, gracias por acompañarme durante esta estadía.

A ti Xochi gracias por brindarme tu amistad, por darme ánimos y consejos.

A ti Antonio gracias por cada risa y cada momento divertido, gracias por tu amistad.

A ti Karla Karina gracias por tu amistad, apoyo, por cada risa y aventura.

A ti Ivon gracias por brindarme tu amistad y esa camaradería en el laboratorio.

A ti Pedro por compartir tus conocimientos conmigo y apoyarme en el tiempo que estuve en el laboratorio.

Índice

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
III. MARCO TEÓRICO	3
3.1 Radicales libres	3
3.1.1 Daños por radicales libres	3
3.1.2 Producción de radicales libres	4
3.1.3 Reactividad de los radicales libres	4
3.1.4 Especies reactivas	4
3.1.5 Especies reactivas de oxígeno	5
3.1.6 Especies reactivas de nitrógeno	7
3.1.7 Óxido nítrico y su formación	7
3.1.8 Radicales libres y carcinogénesis	8
3.1.8.1 Radicales libres y su acción en diferentes tipos de cáncer	9
3.2 Agentes antioxidantes	10
3.2.1 Clasificación de los agentes antioxidantes	10
3.2.2 Catalasa	12
3.2.3 Terapia antioxidante	12
3.3 Familia Boraginaceae	13
3.3.1 Género <i>Heliotropium</i>	14
3.3.2 <i>Heliotropium angiospermum</i> (Boraginaceae)	14
3.3.3 Clasificación taxonómica de <i>Heliotropium angiospermum</i>	14
3.3.4 Sinónimos	14
3.3.5 Nombres comunes	14
3.3.6 Nombres comunes en lenguas indígenas de México	15
3.3.7 Descripción morfológica	15
3.3.8 Hábitat	15
3.3.9 Ecología	15

3.3.10 Distribución en México	16
3.4 Estudios de <i>Heliotropium angiospermum</i>	16
3.4.1 Estudios químicos	16
3.4.2 Estudios farmacológicos, toxicológicos y citotóxicos	17
3.4.3 Estudios etnobotánicos	17
3.5 Metabolitos secundarios	17
3.5.1 Alcaloides	18
3.5.2 Flavonoides	18
3.5.3 Glicósidos cardiotónicos	19
3.5.4 Saponinas	19
3.5.5 Esteroides y triterpenos libres	19
3.5.6 Lactonas sesquiterpénicas	19
3.5.7 Cumarinas	20
3.5.8 Naftoquinonas y antroquinonas	20
3.5.9. Taninos	20
IV. Justificación	21
V. Hipótesis del trabajo	22
VI. Objetivo	22
VII. Metodología	23
7.1 Localidad de colecta	23
7.2 Registro etnofarmacológico de <i>Heliotropium angiospermum</i>	23
7.3 Procesamiento del material vegetal	23
7.4 Obtención de los extractos hidroalcohólico y acuoso	24
7.5 Secado de extractos	24
7.6 Identificación de metabolitos secundarios	24
7.6.1 Alcaloides	24
7.6.1.1 Reactivo de Dragendorff	24
7.6.1.2 Reactivo de Mayer	25
7.6.1.3 Reactivo de Wagner	25

7.6.2 Flavonoides	25
7.6.2.1 Reacción de Shinoda	25
7.6.3 Glicósidos cardiotónicos	25
7.6.3.1 Reactivo de Baljet	26
7.6.3.2 Reactivo de Keller-Killiani	26
7.6.3.2 Reactivo de Lieberman-Burchard	26
7.6.4 Saponinas	26
7.6.4.1 Reactivo de Lieberman-Burchard	26
7.6.5 Esteroides y triterpenos libres	26
7.6.5.1 Reactivo de Lieberman-Burchard	27
7.6.6 Lactonas sesquiterpénicas	27
7.6.6.1 Reactivo hidroxamato férrico	27
7.6.6.2 Reactivo de Lieberman-Burchard	27
7.6.7 Cumarinas	27
7.6.7.1 Reactivo de Baljet	28
7.6.7.2 Reactivo hidroxamato férrico	28
7.6.8 Naftoquinonas y antroquinonas	28
7.6.8.1 Reacción de Bornträger-Kraus	28
7.6.9. Taninos	28
7.6.9.1 Reactivo gelatina-sal	28
7.7 Inducción de carcinoma a modelos experimentales	28
7.8 Tratamiento con extractos	29
7.9 Obtención de plasma	30
7.10 Cuantificación de NO por el método de Griess	30
7.11 Cuantificación de proteína total por el método de Biuret	30
7.12 Actividad de la catalasa por el método de Chance y Machley	31
7.13 Análisis estadístico	31
VII. Resultados	32
8.1 Registro etnofarmacológico de <i>Heliotropium angiospermum</i>	32

8.2 Rendimiento de los extractos hidroalcohólico y acuoso de <i>Heliotropium angiospermum</i>	34
8.3 Análisis preliminar fitoquímico de los extractos acuoso e hidroalcohólico de <i>Heliotropium angiospermum</i>	34
8.4 Efecto de los extractos hidroalcohólico y acuoso de <i>Heliotropium angiospermum</i> sobre los niveles de NO	35
8.5 Efecto de los extractos hidroalcohólico y acuoso de <i>Heliotropium angiospermum</i> en la actividad de la catalasa	36
IX. Discusión	37
Registro etnofarmacológico de <i>Heliotropium angiospermum</i>	37
Análisis preliminar fitoquímico de los extractos hidroalcohólico y acuoso de <i>Heliotropium angiospermum</i>	38
Efecto de los extractos hidroalcohólico y acuoso de <i>Heliotropium angiospermum</i> sobre los niveles de NO en plasma sanguíneo.	42
Efecto de los extractos hidroalcohólico y acuoso de <i>Heliotropium angiospermum</i> en la actividad de la catalasa	43
X. Conclusiones	45
XI. Referencias	46
XII. Anexos	59

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura de un radical libre.

Figura 2. Generación de especies reactivas de oxígeno a partir de las reacciones de Haber- Weiss y la reacción de Fenton.

Figura 3. Transporte mitocondrial como generador de ERO.

Figura 4. Síntesis del NO.

Figura 5. Interacción de radicales libres con antioxidantes.

Figura 6. Descomposición del peróxido de hidrógeno mediada por catalasa.

Figura 7. a) *Heliotropium angiospermum*, b) hoja, c) flor, d) frutos.

Figura 8. Distribución de *Heliotropium angiospermum* en la República Mexicana.

Figura 9. Estructura química de un flavonoide.

Figura 10. Localidad Limón Chiquito.

Figura 11. Posibles lugares de interacción de los flavonoides con el proceso carcinogénico (indicados con asteriscos). Las flechas cortas indican el efecto potenciador (flecha hacia arriba) o inhibidor (flecha hacia abajo) de la actividad. ERO: especies reactivas de oxígeno; ODC: ornitina descarboxilasa; PKC: proteína cinasa C.

Índice de tablas

Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno.

Tabla 2. Especies reactivas de nitrógeno.

Tabla 3. Acción de los radicales libres sobre diferentes tipos de cáncer.

Tabla 4. Clasificación de los antioxidantes.

Tabla 5. Propiedades de los principales antioxidantes y tipo de radical libre que neutralizan.

Tabla 6. Ejemplos de enfermedades y su posible tratamiento con antioxidantes.

Tabla 7. Estudios químicos de *Heliotropium angiospermum*.

Tabla 8. Inducción de carcinoma a modelos experimentales.

Tabla 9. Dosis aplicada de los extractos hidroalcohólico y acuoso de *Heliotropium angiospermum* a ratones de la cepa CD-1.

Tabla 10. Rendimiento de los extractos de *Heliotropium angiospermum*.

Tabla 11. Análisis fitoquímico preliminar de *Heliotropium angiospermum*.

Tabla 12. Estudios realizados con glicósidos en líneas celulares.

Tabla 13. Estudios *in vivo* realizados con saponinas en diferentes líneas celulares.

Índice de graficas

Gráfica 1. Principales estructuras utilizadas de *Heliotropium angiospermum*.

Gráfica 2. Usos medicinales de *Heliotropium angiospermum*.

Gráfica 3. Efecto de los extractos de *Heliotropium angiospermum* sobre la concentración de NO en plasma de ratones hembra de la cepa CD-1.

Gráfica 4. Efecto de los extractos de *Heliotropium angiospermum* sobre la actividad de la catalasa en plasma de ratones hembra de la cepa CD-1.

Abreviaturas

RL: Radicales libres

ERO: Especies reactivas de oxígeno

ERN: Especies reactivas de nitrógeno

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintetasa

cNOS: Forma constitutiva

iNOS: Forma inducible

GPx: Glutati3n peroxidasa

SOD: Super3xido dismutasa

Zn: Zinc



Actividad antioxidante de los extractos de *Heliotropium angiospermum* M. en un modelo de cáncer

I. RESUMEN

Heliotropium angiospermum (Boraginaceae), es una herbácea originaria de América, se encuentra distribuida desde el sur de Estados Unidos hasta Sudamérica, es popularmente conocida como “cola de alacrán”, y es utilizada en la medicina tradicional para tratar diversos padecimientos del aparato digestivo, respiratorio y de las vías urinarias.

Entre las especies bioactivas que caracterizan esta especie vegetal se encuentran los alcaloides derivados de pirrolizidina, lindelofidina, y glicósidos como el blumenol A y B.

El objetivo de este trabajo fue analizar fitoquímicamente el extracto hidroalcohólico y acuoso de *Heliotropium angiospermum* mediante métodos coloridos; así como su actividad antioxidante en un modelo de cáncer inducido con óxido de níquel (NiO).

El análisis fitoquímico consistió en una serie de reacciones específicas para cada metabolito secundario (glicósidos cardiotónicos (Baljet, Lieberman y Keller), alcaloides (Dragendorf y Mayer), taninos (gelatina-sal), flavonoides (Shinoda), saponinas (espuma), esteroides y triterpenos libres (Lieberman) y lactonas sesquiterpénicas (Lieberman e hidroxamato férrico)).

La actividad antioxidante fue analizada *in vivo* administrando dosis de 5 mg/mL y 10 mg/mL de los extractos (hidroalcohólico y acuoso) durante 15 días a ratones hembra de la cepa CD-1 inducidos a un proceso de carcinogénesis con la finalidad de evaluar parámetros como la concentración de nitritos y la actividad enzimática de la catalasa en plasma sanguíneo de ratón.

Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que existe disminución de la concentración de nitritos en plasma sanguíneo con la aplicación de extractos de hoja 10 mg/mL y tallo 5 mg/mL, y los extractos acuosos de hoja 5mg/mL y tallo de 5mg/mL y 10mg/mL.

Por último se observó incremento en la actividad de la enzima catalasa con la aplicación de extractos hidroalcohólicos de hoja de 5 mg/mL y tallo de 10 mg/mL y los extractos acuosos de hoja de 5 mg/mL y 10 mg/mL y tallo de 10 mg/mL, por lo que se puede concluir que la especie vegetal *Heliotropium angiospermum* presenta moléculas con efecto antioxidante.



II. INTRODUCCIÓN

Desde hace aproximadamente 2,500 millones de años, cuando aparecieron los vegetales y generaron oxígeno, se inició una mutación progresiva de la naturaleza. Muchas especies sucumbieron y otras debieron readaptarse.¹ La utilización del oxígeno y otros factores en nuestra vida origina radicales libres (RL), los cuales a través de diversos estudios se ha demostrado que están implicados en la patogenia de muchas enfermedades, siendo capaces de dañar en forma reversible o irreversible, diversas biomoléculas muy importantes para ciertas actividades celulares fundamentales para la vida.²

Los RL se forman naturalmente en el cuerpo y tienen una función importante en muchos procesos normales de las células. Sin embargo, en concentraciones altas, éstos pueden ser peligrosos para el cuerpo, ya que para conseguir la estabilidad modifican a moléculas de su alrededor provocando así la aparición de nuevos RL, por lo que se crea una reacción en cadena que dañara los componentes principales de las células, incluso el ADN, las proteínas y las membranas celulares.³

Este daño, especialmente el generado al ADN puede tener un papel en la formación del cáncer.⁴ El cáncer es un conjunto de enfermedades de origen multifactorial. Se caracteriza principalmente por un crecimiento anormal, una proliferación acelerada y no controlada de las células, con capacidad de formar un tumor y metástasis en diferentes tejidos.^{5,6} El estrés oxidante se ha definido como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio que debe existir entre las sustancias o factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas del oxígeno.^{7,8}

En la actualidad estudios confirman que la ingesta de antioxidantes se ve íntimamente relacionada con la reducción del riesgo de padecer algún tipo de cáncer.⁸ Por lo que en los últimos años ha existido un creciente interés por analizar el efecto que puede tener la terapia antioxidante mediante diversos compuestos extraídos de las plantas.⁹

Tomando en cuenta lo anterior en el presente trabajo se realizó un estudio fitoquímico preliminar de los extractos hidroalcohólico y acuoso de *Heliotropium angiospermum*, mediante métodos coloridos; así como su actividad antioxidante en un modelo de cáncer inducido con óxido de níquel.

III. MARCO TEÓRICO

3.1 Radicales libres (RL)

Un radical libre se puede definir como una molécula (orgánica o inorgánica) en general extremadamente inestable y muy reactiva, el cual presenta una configuración electrónica de capas abiertas por lo que llevan al menos un electrón desapareado, el cual es muy susceptible de crear un enlace con algún otro átomo o molécula (Figura 1). Para conseguir la estabilidad modifican a moléculas de su alrededor provocando así la aparición de nuevos radicales libres, por lo que se crea una reacción en cadena que dañará a muchas células¹⁰.

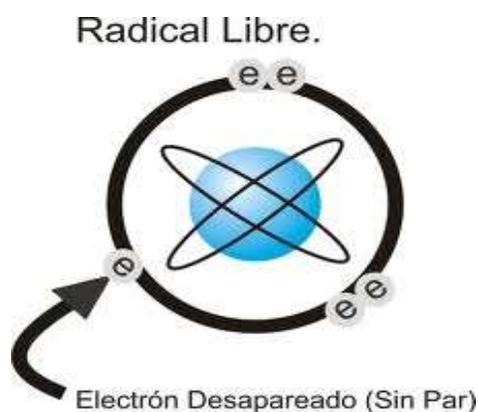


Fig 1. Estructura de un radical libre

3.1.1 Daños por RL

Pueden producir diferentes daños a nivel celular como:

- Atacar lípidos y proteínas de la membrana celular, por lo tanto la célula no puede realizar sus funciones vitales (división celular, transporte de nutrientes, eliminación de desechos, etc.). El radical superóxido O_2^- , que se encuentra normalmente en el metabolismo, provoca una reacción en cadena de la lipoperoxidación de los ácidos grasos de los fosfolípidos de la membrana celular.
- Atacan a carbohidratos produciendo alteraciones de la estructura, o fragmentación con la pérdida de la función de estas moléculas.
- Atacan al ADN impidiendo que tenga lugar la replicación celular y contribuyendo al envejecimiento celular.¹¹



3.1.2 Producción de RL

Los mecanismos de producción de RL son el resultado natural de la óxido-reducción de las moléculas orgánicas. La formación de estas moléculas reactivas se da por medio de dos reacciones, la primera por fusión homolítica y la segunda por fusión heterolítica. Independientemente de estas reacciones los RL se pueden formar por dos tipos de factores: endógenos y exógenos.¹²

- Factores endógenos

Los RL están presentes en los procesos normales del organismo tales como el metabolismo de los alimentos, la respiración y el ejercicio. La producción de estas moléculas se da específicamente por 3 mecanismos; transferencia electrónica, ruptura hemolítica y por pérdida de un protón de una molécula.³

- Factores exógenos

La formación de RL a nivel extracelular se encuentra dada por factores fisicoquímicos, como son: radiaciones ionizantes, contaminación ambiental, aditivos químicos en algunos alimentos, el tabaquismo, dietas ricas en grasas, atmósferas con altas concentraciones de oxígeno, la exposición a algunos metales, medicamentos y pesticidas.¹³

3.1.3 Reactividad de los RL

Los RL son especies fuertemente oxidativas y atacan a moléculas que contienen en su estructura dobles enlaces de carbono-carbono o anillos de carbono, de tal forma que, aminoácidos, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos que componen a las macromoléculas de la célula, pueden ser “atacadas” y alterar su función o estructura. Se debe tomar en cuenta que, para que exista un daño a la célula, los RL deben llevar a cabo tres pasos: Iniciación la cual consiste en la producción inicial de los RL ya sea por alteraciones internas de la célula o por elementos externos a ella; el segundo paso es la propagación, en esta fase los RL producen otros RL y éstos a su vez atacan otras moléculas diseminando el daño a través de la célula; y por último, el tercer paso a cumplir es la degradación, en esta etapa se han producido biomoléculas que la célula no podrá utilizar por lo que serán desechadas.¹⁴

3.1.4 Especies reactivas

En la actualidad se conocen 4 tipos de especies reactivas que incluyen: a las especies reactivas de oxígeno (ERO), de nitrógeno (ERN), de hierro (ERH), y por último a las de cobre (ERC).¹⁵ Dentro de este gran grupo de especies reactivas, las más relevantes a nivel celular son las ERO y las ERN, ambas definidas por su capacidad prooxidante, que estará

determinada por factores como: reactividad, especificidad, selectividad y difusibilidad.^{16,17, 18}

Estos dos tipos de especies reactivas (ERO Y ERN) tienen relevancia importante y su estudio se ha incrementado en los últimos años, ya que son las responsables de generar muchas patologías humanas.¹⁹

3.1.5 Especies reactivas de oxígeno (ERO)

El oxígeno molecular (O_2) es uno de los gases más importantes de la Tierra, constituye el 21% de la atmósfera, 89% del peso del agua de mar y al menos 47% de la corteza terrestre. Por lo mismo, la mayor parte de los seres vivos utilizan el oxígeno para respirar y obtener energía. Sin embargo, a partir de esta molécula se forman otras más reactivas conocidas como ERO.²⁰ Esta expresión es un término colectivo que involucra no sólo los RL derivados del oxígeno, sino también a los pro-radicales derivados de la reducción molecular del oxígeno (Tabla 1), y que además son muy reactivos, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el ácido hipocloroso (HOCl).²¹

Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno

Radicales	Pro-radicales
Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	Oxígeno singulete (O_2)
Hidróxilo (OH^{\cdot})	Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
Peroxilo (RO_2^{\cdot})	Ozono (O_3)
Alcoxilo (RO^{\cdot})	Anión peroxinitrito ($ONOO^-$)
Hidroperóxilo (HO_2^{\cdot})	Ácido hipocloroso (HOCl)
Tiol (RS^{\cdot})	Ácido hipobromoso (HOBr)

Cabe destacar que las ERO pueden formarse espontáneamente por medio de dos reacciones; la reacción de Haber-Weiss y la reacción de Fenton. En la reacción tipo Haber-Weiss, una especie reactiva reacciona con un pro-radical y de esa manera se forman varios RL. En la reacción tipo Fenton, un compuesto pro-radical reacciona con un catalizador (generalmente un metal de transición como por ejemplo el hierro) para formar a los RL (Figura 2).¹⁴

Las ERO regulan diversos procesos celulares y existen muchos sitios dentro de la célula donde estas pueden formarse, uno de los más importantes y con mayor formación de RL debido a su función primordial de producción de energía química es la cadena respiratoria de las mitocondrias (Figura 3), seguido por los peroxisomas y el citosol.^{14,20}

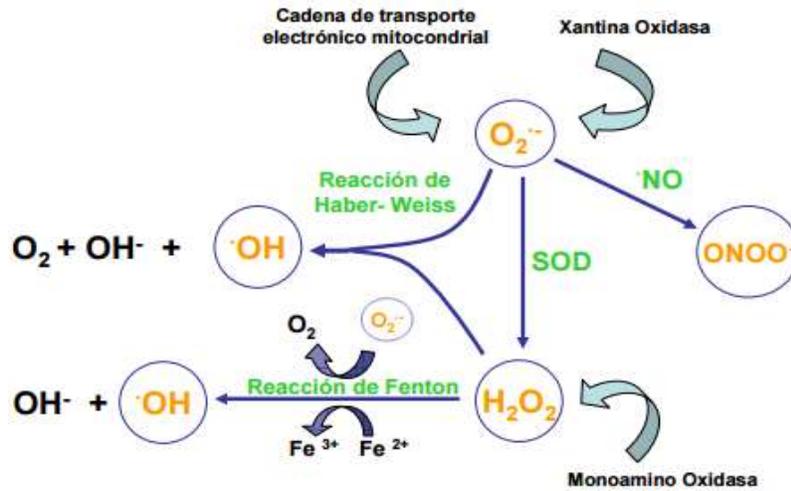


Figura 2. Generación de especies reactivas de oxígeno a partir de las reacciones de Haber- Weiss y la reacción de Fenton.²⁰ Tomada de Rodríguez 2009.

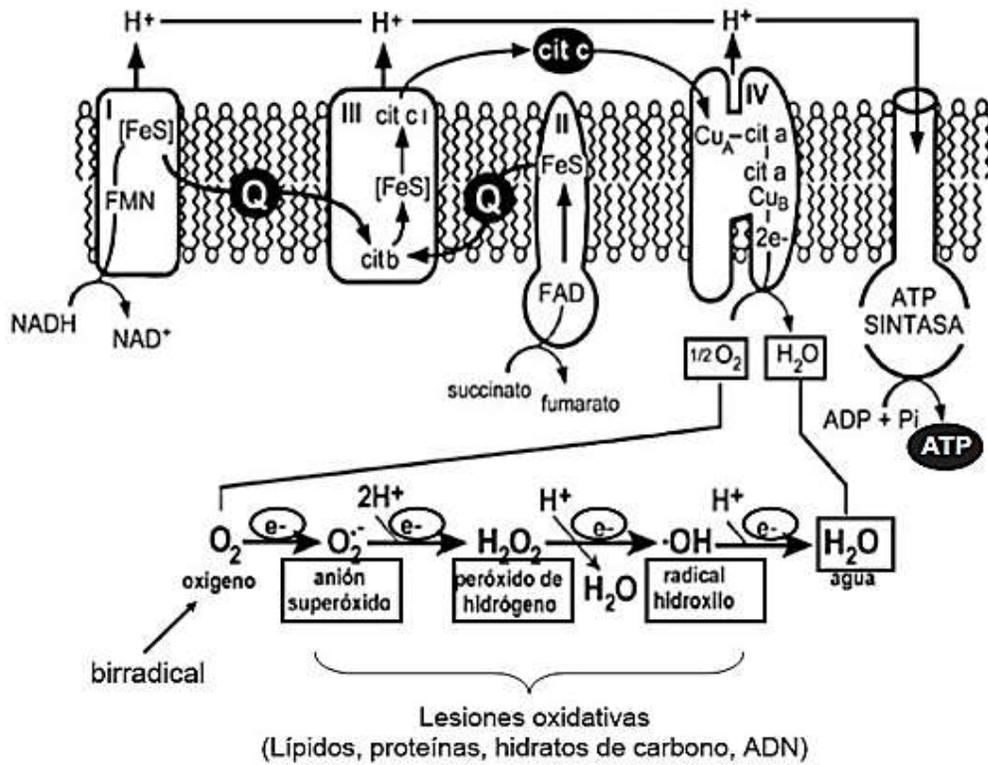


Figura 3. Transporte mitocondrial como generador de ERO.²² Tomada de Marotte et al. 2013

3.1.6 Especies reactivas de nitrógeno (ERN)

El representante más relevante de las ERN (Tabla 2) es el óxido nítrico (NO^{\cdot}), ya que interviene en diversas funciones biológicas, que incluyen vasodilatación, neurotransmisión, y su actividad antimicrobiana y tumoral, además de ser ampliamente reconocido por su papel de mensajero molecular. El NO^{\cdot} es originado a partir de la L-arginina, y bajo ciertas condiciones éste puede ser transformado a otras ERN, tales como: el catión nitrosonium (NO^+), anión nitroxilo (NO^-), peroxinitrito (ONOO^-) y el dióxido de nitrógeno (NO_2).^{3, 23}

Tabla 2. Especies reactivas de nitrógeno

Radicales	Pro-radicales
Óxido nítrico (NO^{\cdot})	Ácido nitroso (HNO_2)
Dióxido de nitrógeno (NO_2^{\cdot})	Catión nitrosilo (NO^+)
	Anión nitrosilo (NO^-)
	Trióxido de dinitrógeno (N_2O_3)
	Peroxinitrito (ONOO^-)
	Ácido peroxinitroso (ONOOH)
	Catión nitrilo (NO_2^+)
	Alquil-peroxinitritos (R-OONO)

3.1.7 Óxido nítrico (NO) y su formación

El óxido nítrico se forma por la unión de dos átomos de nitrógeno (N) y otro de oxígeno (O), es una molécula pequeña y neutra que carece de carga, esta característica le permite difundirse libremente a través de las membranas celulares, es un gas incoloro que se encuentra en la naturaleza a razón de aproximadamente 10 partes por billón, esta molécula al estar bajo ciertas condiciones de presión y humedad presenta una vida media de 3.8s a 6.2.^{24, 25, 26}

Prácticamente todas las células tienen la capacidad de sintetizar NO a partir del aminoácido L-arginina con la ayuda de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS). Este proceso es complejo y requiere de el fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADPH), y también la participación de cofactores como: dinucleótido de flavina y adenina (FAD), mononucleótido de flavina y adenina (FMN), tetrahidrobiopterina (H4B) y hierro protoporfirina IX (hemo) y son dependientes de calcio (Figura 4).²⁵

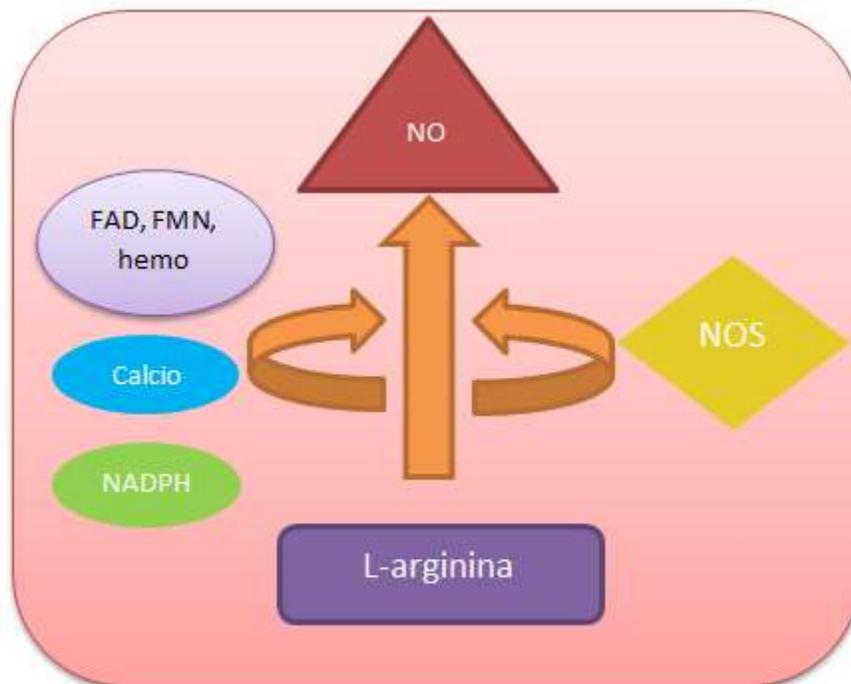


Figura 4. Síntesis del NO. Modificada de Díaz et al., 2009.

En las células se han identificado 3 isoformas de la enzima NOS, dos de ellas, la endotelial y la neuronal, están presentes en las células en todo momento y por ello se denominan formas constitutivas (cNOS). La tercera es inducible (iNOS) y se expresa como respuesta a diferentes estímulos. Las cNOS, median las respuestas vasodilatadoras endotelio-dependientes, mientras que la forma neuronal, son calcio-calmodulina dependientes, y están presentes en el endotelio, plaquetas, miocardio, tejido nervioso y músculo esquelético y por último la iNOS calcio-independiente puede ser liberada de células endoteliales, músculo liso vascular, miocitos, macrófagos y neutrófilos.^{24, 25}

3.1.8 Radicales libres y carcinogénesis

Los daños generados por las ERO y ERN incluyen modificaciones de las macromoléculas celulares, como lípidos, donde ocurre peroxidación modificando la estructura de la membrana; proteínas, donde pudiera perderse la reactividad enzimática; y ADN, dando lugar a la carcinogénesis.¹⁹

La molécula de ADN al ser uno de los principales blancos del ataque por RL en la célula, sufre modificaciones las cuales son relevantes para la pérdida de la homeostasis celular, la cual puede prolongarse como consecuencia de las funciones del ADN como reservorio activo de



información. Por esta razón se estudian intensamente los agentes y mecanismos del daño por ERO y ERN.²⁷

En la molécula de ADN, los grupos nucleofílicos de la desoxirribosa y de las bases nitrogenadas quedan expuestos al ataque electrofílico de las ERO, que llegan al interior del núcleo celular, ya sean generadas como consecuencia de un agente externo, o por medio de procesos metabólicos celulares.²⁸

La carcinogénesis se desarrolla como un proceso microevolutivo que requiere de la acumulación de múltiples eventos que tienen lugar en un clon de células y comprenden 3 estadios: el primer estadio es conocido como iniciación y en esta etapa se da la inducción de mutación en el ADN de una célula somática; en el segundo estadio o promoción se lleva a cabo una estimulación de la expansión tumoral del clon mutado; y en la última fase llamada progresión se encuentra la malignización del tumor. En estudios realizados se ha comprobado que las ERO y ERN pueden estimular el desarrollo tumoral en las 3 etapas mencionadas.^{29,30,31}

En las últimas décadas se destaca el posible papel de las ERO en la angiogénesis, este proceso es de gran significación en el desarrollo y posterior difusión de las células tumorales, donde los breves episodios de hipoxia-reoxigenación, sobre las células del endotelio microvascular humano, causaron la formación de ERO y la activación del factor de transcripción nuclear (NF-Kappa B), acelerando significativamente el grado de morfogénesis tubular o neovascularización de dicho proceso.²⁸

3.1.8.1 Radicales libres y su acción en diferentes tipos de cáncer

Diversos estudios experimentales han tratado de dilucidar el mecanismo de acción implicado en la transformación maligna de la célula inducida por los RL (Tabla 3).

Tabla 3. Acción de los radicales libres sobre diferentes tipos de cáncer

Tipo de cáncer	Acción de RL
Mama	Acumulación de mutaciones en BRCA1/2. ³² Aumento de 8-oxo-dG ^{33,34}
Pulmón	Aumento de 8-oxo-dG. ^{3,33,34}
Próstata	Mutan p53, asociadas a una sobreexpresión de Bcl-2. ³⁵ Aumento de 8-oxo-dG. ^{33,34}
AGS, Gástrico	Inducen la expresión de uPAR (activador del receptor uroquinasa de plasminógeno) vía Erk-1/2 y AP-1, estimulando su capacidad invasiva. ³⁶
Colorectal	Alteraciones moleculares en genes supresores de tumores, como el 5q (APC y MCC), el 17p (p53), el 18q (DCC) y el 22q. ³⁷
Leucemia linfóide	Aumento de peroxidación (MDA y 8-oxo-dG). ³⁸
Ovario	Aumento de 8-oxo-dG ^{33,34}

3.2 Agentes antioxidantes

Las células han desarrollado mecanismos que las protegen del efecto nocivo de los RL con base en un complejo sistema de defensa constituido por los agentes antioxidantes. Así, cuando se incrementa la producción de estas moléculas reactivas, estos mecanismos se activan para controlar y estabilizar el ambiente redox intra o extracelular. Los antioxidantes se definen como aquellas sustancias que, presentes en bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable (biomoléculas), retardan o previenen la oxidación para proteger a los diferentes órganos y sistemas. Al interactuar con el radical libre, el antioxidante cede un electrón, se oxida y se transforma en un radical libre débil no tóxico (figura 5).³⁹

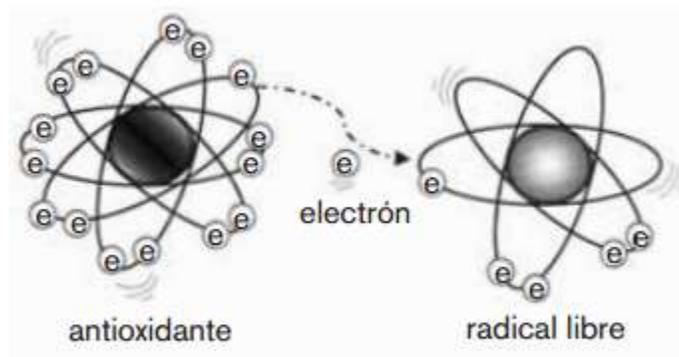


Figura 5. Interacción de radicales libres con antioxidantes.

3.2.1 Clasificación de los agentes antioxidantes

Existen dos tipos de antioxidantes:

- Endógenos: Son aquellos que se producen por el propio sistema biológico, y se les conoce como enzimáticos.
- Exógenos: Son aquellos que provienen a partir de la dieta consumida y son conocidos como no enzimáticos (Tabla 4).

Los antioxidantes cuentan con diversas propiedades y cada uno de ellos mediante el sistema biológico neutraliza a los RL como se muestra en la Tabla 5.^{10,39}



Tabla 4. Clasificación de los antioxidantes

Antioxidantes	
Enzimáticos	No enzimáticos
Enzima glutatión peroxidasa (GPx)	Vitamina E o alfa-tocoferol
Catalasa	Vitamina C o ácido ascórbico
Glutatión reductasa	Carotenoides
Glutatión S transferasa	Ácido úrico.
Proteínas que se unen a metales (ferritina, transferrina)	Bilirrubina.
	Albúmina.
	Melatonina
	Estrógenos
	Polifenoles

Tabla 5. Propiedades de los principales antioxidantes y tipo de radical libre que neutralizan.

Antioxidante	Tipo de RL que neutraliza
Superóxido dismutasa	Enzima intracelular o extracelular responsable de remover los radicales superóxidos.
Catalasa	Esta enzima presente en los peroxisomas, remueve al peróxido de hidrógeno.
Glutatión peroxidasa	Esta enzima intracelular contiene selenio, remueve los radicales peróxidos.
Vitamina C (Ácido ascórbico)	Es un poderoso inhibidor de la oxidación de lípidos, regenera la vitamina E y es protector de los efectos del tabaco. Actúa específicamente con el radical superóxido aniónico y el radical hidroxilo.
Vitamina E (Tocoferol)	Principal antioxidante soluble en lípidos; previene la oxidación de grasas. Actúa específicamente con el oxígeno singulete y el radical de ácido graso polinsaturado.
Glutatión	Poderoso antioxidante que protege contra los efectos dañinos de metales pesados, tabaco y alcohol. Limita la actividad de los radicales superóxido aniónico, peróxido de hidrógeno, oxígeno singulete.
Melatonina	Es un antioxidante potente que altera la actividad de las enzima superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa e inhibe la actividad de la sintasa de óxido nítrico. Se ha reportado que la melatonina es capaz de neutralizar el radical hidroxilo, radical peroxilo, oxígeno singulete, óxido nítrico y proteínas oxidadas.
Estrógenos	Neutralizan RL lipofílicos, disminuyendo la peroxidación lipídica de las membranas celulares.

3.2.2 Catalasa

La catalasa es una enzima antioxidante presente en la mayoría de los organismos aerobios. Esta enzima cataliza la dismutación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua (H_2O) y oxígeno (O_2) (Figura 6), evitando así que se forme el radical hidroxilo y el oxígeno singulete, especies de oxígeno que son muy reactivas.⁴⁰

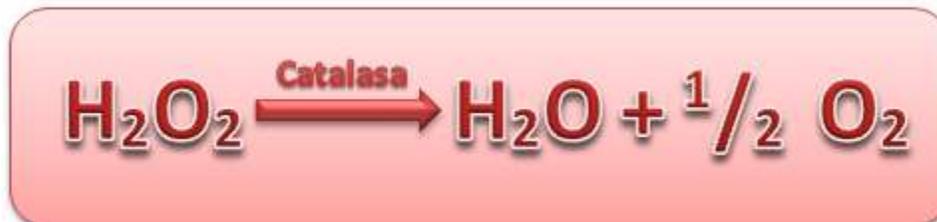


Figura 6. Descomposición del peróxido de hidrógeno mediada por catalasa

Se han identificado tres grupos de catalasas: 1) las catalasas monofuncionales, que contienen un grupo hemo y están presentes tanto en los organismos procariotas como en los eucariotas, 2) las Mn-catalasas, que son enzimas hexaméricas que no tienen hemo, tienen Mn en el sitio activo y sólo están presentes en algunos organismos procariotas anaerobios y 3) las catalasas-peroxidasas, que tienen actividad de catalasa y de peroxidasa, contienen hemo y sólo están presentes en las bacterias y los hongos.⁴¹

La mayoría de los organismos aerobios tienen catalasas monofuncionales, en el hombre, la catalasa protege la hemoglobina del peróxido de hidrógeno que se genera en los eritrocitos. También tiene un papel de protección en la inflamación, evita el envejecimiento, ayuda a la prevención de mutaciones, y ciertos tipos de cáncer.^{40,41}

3.2.3 Terapia antioxidante

La función y efecto que tienen los antioxidantes en la salud es evitar la oxidación de sustancias que puedan provocar alteraciones fisiológicas, por lo que en la actualidad se estudia el efecto que dichas moléculas puedan tener sobre diferentes enfermedades (Tabla 6), a esta práctica se le conoce como terapia antioxidante. De entre las diversas enfermedades que se pueden tratar con estos compuestos, se encuentra el cáncer, el cual está implicado con el estrés oxidativo mitocondrial.⁴²

La función mitocondrial tiene una estrecha relación con el incremento de RL (en especial las ERO), por lo que se ha convertido este órgano celular en el blanco farmacológico para la investigación al buscar entender las interacciones que pueden llegar a tener la mitocondria los RL y los antioxidantes.^{28,43}



Los antioxidantes juegan un papel predominante en la prevención de diferentes tipos de cáncer, en la actualidad existen numerosos estudios clínicos que describen la efectividad del uso terapéutico de antioxidantes en dicha enfermedad.^{42,43,44}

Tabla 6. Ejemplos de enfermedades y su posible tratamiento con antioxidantes

Enfermedad	Blanco	Antioxidante
Infertilidad masculina	Espermatozoide	Zn
Infertilidad femenina	Hormona luteinizante	SOD-1
Diabetes	Células beta pancreáticas	SOD-extracelular
VIH	Plasma	SOD
Cáncer	Sangre, células, cancerígenas, hígado, pulmón, riñón, piel, ovarios, próstata	SOD, GPX, catalasa
Alzheimer, Huntington	Neuronas	SOD-1, SOD, GPX
Parkinson	Neuronas	Catalasa, polifenoles
Daño cerebral	Oclusión arterial	SOD, GPX SOD
Daño post-isquémico	Cerebro	Catalasa, SOD-1
Enfermedad de Crohn	Tracto gastrointestinal	SOD, GPX, catalasa
Alergia al polen	Células sanguíneas	SOD, GPX, catalasa
Pérdida auditiva	Cóclea	SOD-1

Por otro lado, y aunado a la terapia antioxidante, en los últimos años ha existido un creciente interés por una nueva alternativa terapéutica que consiste en la utilización de plantas medicinales para el tratamiento de diferentes enfermedades (entre ellas el cáncer), ya que éstas contienen metabolitos secundarios con efectos antioxidantes, que al ser metabolizados en el organismo producen efectos benéficos a la salud.⁴⁵

3.3 Familia Boraginaceae

La familia Boraginaceae presenta 148 géneros y 2740 especies, se encuentran distribuidas en regiones templadas y subtropicales, menos frecuentes en las regiones tropicales y frías. Incluye hierbas, arbustos o árboles, están presentes en gran variedad de hábitats. En América Central y Sudamérica, las especies están presentes desde el nivel del mar hasta los 4000 metros de altura o más en los Andes.^{46,47,48}



3.3.1 Género *Heliotropium*

Los Heliotropos (*Heliotropium*) es un género de planta de la familia Boraginaceae con 250 a 300 especies. Varias de ellas son populares como plantas de jardín. *Heliotropium* se reconoce dentro de las Boraginaceae por sus frutos secos, y el estilo entero o solo bífido (no dividido en 4 lóbulos). Como muchas Boraginaceae, la inflorescencia está enroscada en el ápice, con las flores insertados hacia un solo lado (cima helicoidal). Se distribuye en las regiones del matorral xerófilo, bosques tropicales caducifolios y perennifolios, dunas costeras, manglar.^{49,50,51}

3.3.2 *Heliotropium angiospermum* (Boraginaceae)

Heliotropium angiospermum (Boraginaceae) es un arbusto que crece en zonas del sureste de México, en particular Veracruz, Yucatán y Quintana Roo, donde se conoce comúnmente como "cola de alacrán" o "cola de gato". Se distribuye en las regiones del matorral xerófilo, bosques tropicales caducifolios y perennifolios, dunas costeras, manglar.⁵²

3.3.3 Clasificación taxonómica de *Heliotropium angiospermum*

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Lamiales

Familia: Boraginaceae

Subfamilia: Heliotropioideae

Género: *Heliotropium* L.

Especie: *angiospermum* M.

3.3.4 Sinónimos

Heliotropium parviflorum L.; *Heliotropium humile* Lam.; *Heliotropium oblongifolium* Mart. & Galeotti; *Heliotropium rugosum* Mart. & Galeotti.⁵³

3.3.5 Nombres comunes

Cola de alacrán, rabo de mico, alancrancillo, yerba del espasmo, cola de mono y rabo de alacrán.⁵³

3.3.6 Nombres comunes en lenguas indígenas de México

Macapura (guarigia, Sonora), ne-maax (maya, Yucatán), soguilla (San Bernardo, Sonora), tascuyu-tuuan (totonaca, El Tajín, Ver.), totoli-ya capipilol (chililico, Huejutla, Hgo.), nej ma'ax, nej sina'an, ta ulu'um ma'ax (maya, Yucatán).⁵³

3.3.7 Descripción morfológica

Es una herbácea que mide entre 15 cm a 2 m. de altura, presenta hojas alargadas con forma de lanza, sus flores pequeñas son blancas y numerosas, en espigas formando una inflorescencia parecida a la cola de alacrán, frutos muy arrugados de 2 a 3 mm de largo, y contienen dos semillas (Figura 7)^{53,54}.

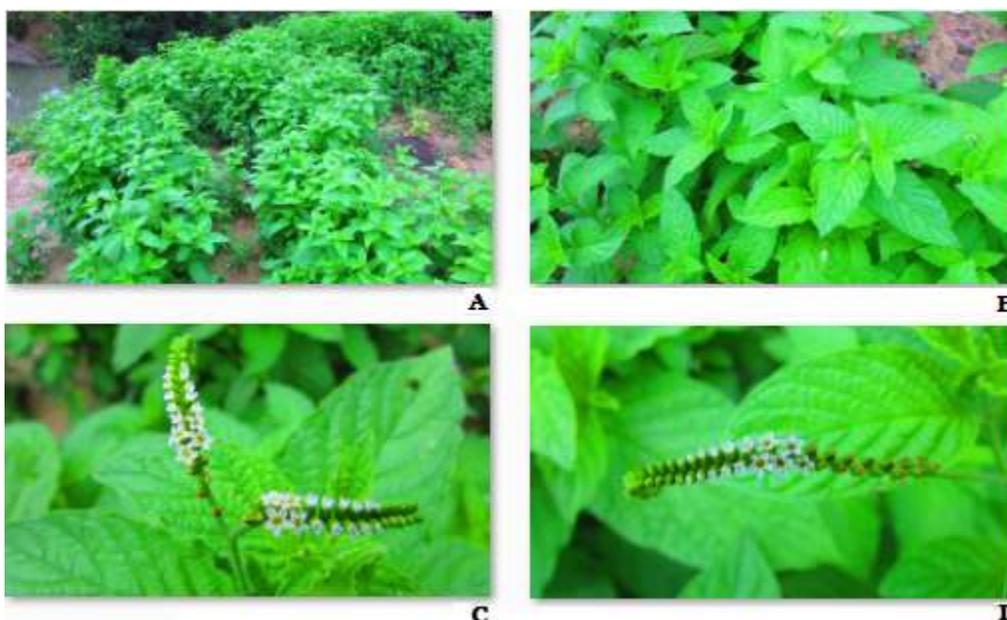


Figura 7. a) *Heliotropium angiospermum*, b) hoja, c) flor, d) frutos. Fotos tomadas por Ernesto Mendoza Vallejo

3.3.8 Hábitat

Es una planta principalmente ruderal y arvense.⁵²

3.3.9 Ecología

Especies que contienen alcaloides pirrolizidínicos son visitados a menudo por lepidópteros (mariposas), para abastecerse con estas sustancias. Parece que son la materia prima para producir ferohormonas de algunos grupos, o para utilizarlos para la defensa química. Algunos cultivos de arroz plátano, caña de azúcar y guayabo resultan afectados debido a que son tóxicos.⁵³

3.3.10 Distribución en la República Mexicana

Baja California Norte, Baja California Sur, Campeche, Chiapas, Coahuila, Colima, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán (Figura 8).⁵⁴



Figura 8. Distribución de *Heliotropium angiospermum* en la República Mexicana

3.4 Estudios de *Heliotropium angiospermum*

Los estudios realizados sobre esta especie vegetal son escasos, pero se basan principalmente en la química, farmacología, toxicología, citotoxicidad y etnobotánica.

3.4.1 Estudios químicos

En la tabla 7 se muestra la identificación de los compuestos químicos presentes en *Heliotropium angiospermum*.

Tabla 7. Estudios químicos de *Heliotropium angiospermum*

Estructura	Identificación
Planta completa	Alcaloides de pirrolizidina lindelofidina, hidroximetil-1-2-epoxi-pirrolizidina, retronecina, supinidina y tachelantamidina. ⁵³
Hoja	Alcaloides espermidina, espermina, y putrecina. ⁵³



Inflorescencia	Alcaloides espermidina y espermina. ⁵³
Tallo	Alcaloides de pirrolizidina. ⁵³
Hojas	Alcaloides de pirrolizidina, glicósidos como el blumenol A y B, loliólido, β -sitosterol, α -amirina y β -amirina. ^{55,56}

3.4.2 Estudios farmacológicos, toxicológicos y citotóxicos

Los extractos de *Heliotropium angiospermum* M. también parecen ser promisorios en su actividad antiparasitaria. Los experimentos preliminares *in vitro* indican que pueden inhibir el crecimiento de *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania mexicana*.⁵⁷

El extracto acuoso obtenido de hojas con tallos presentó un ligero efecto estimulante en tejido de útero aislado de rata.⁵³

3.4.3 Estudios etnobotánicos

Es común su uso en el tratamiento de padecimientos del aparato digestivo, como colitis, diarrea, empacho o gastroenteritis. Con mayor frecuencia se le emplea para curar la disentería, uso referido en el sureste de la República Mexicana en los estados de Quintana Roo y Yucatán. Se recomienda tomar un té preparado con las hojas de la planta. Además, la infusión elaborada con la raíz sirve para curar el "empacho". Para sanar los granos del cuerpo se toman baños o lavados locales, con el cocimiento de las hojas. Por otro lado, se menciona útil contra afecciones de tipo respiratorio como gripe y tos, y en casos de picadura de alacrán e inflamaciones.^{53,54}

3.5 Metabolitos secundarios

El metabolismo se puede definir como un conjunto de reacciones químicas que realizan las células de los seres vivos para sintetizar sustancias complejas a partir de otras más simples, o para degradar las complejas y obtener las simples. Las plantas, organismos autótrofos, además del metabolismo primario presente en todos los seres vivos, poseen un metabolismo secundario que les permite producir y acumular compuestos de naturaleza química diversa, que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos; estos compuestos se denominan metabolitos secundarios, los cuales se distribuyen diferencialmente entre grupos taxonómicos, y se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, es decir que su producción está restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especie. Estos metabolitos presentan propiedades biológicas y desempeñan funciones

ecológicas, también se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes, entre otros.^{58,59,60}

3.5.1 Alcaloides

Aunque no existe una definición exacta para los alcaloides, éstos son definidos como: “Un compuesto orgánico de origen natural (generalmente vegetal), nitrogenado (el nitrógeno se encuentra generalmente intracíclico), 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”. Su actividad biológica a nivel del sistema nervioso, dio pie a las primeras investigaciones, siendo los alcaloides las primeras sustancias naturales estudiadas. La diversidad estructural y la variedad en la actividad biológica, de los alcaloides, hacen de este grupo, los más importantes entre las sustancias naturales de interés terapéutico. Un gran número de medicamentos se han obtenido de plantas que contienen alcaloides, éstos se han aislado principalmente en plantas superiores y se han encontrado en más de 100 familias de Fanerógamas y, en menor proporción en Criptógamas.⁶¹

3.5.2 Flavonoides

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales, son un grupo muy amplio de compuestos polifenólicos caracterizados por una estructura benzo- γ -pirano, están compuestos de dos anillos fenilos (A y B), ligados mediante un anillo pirano (C), lo cual nos deja en un esqueleto de difenilpiranos: C6-C3-C6.

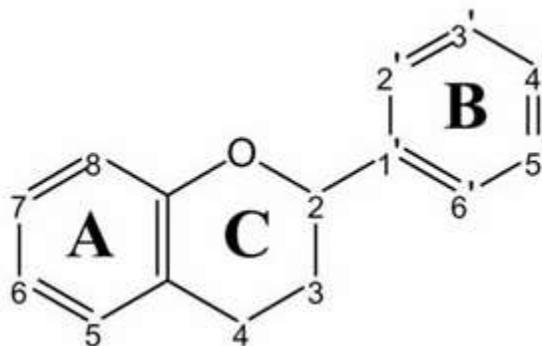


Figura 9. Estructura química de un flavonoide

Estos metabolitos son muy importantes para el desarrollo y buen funcionamiento de las plantas, ya que actúan como atrayentes de animales en la ovoposición, como agentes protectores contra la luz UV o contra la infección por organismos fitopatógenos; el organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación; están ampliamente distribuidos en plantas,



frutas, verduras y en diversas bebidas. Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer.⁶²⁻⁶⁷

3.5.3 Glicósidos cardiotónicos

Los glicósidos cardiotónicos son sustancias amargas, las cuales están constituidas de una porción esteroide, una porción glicosídica y un anillo de gama-lactona, alfa,β-insaturada o delta-lactona-alfa,β-insaturada, que actúan sobre el músculo cardiaco; estos metabolitos también aumentan la fuerza de contracción del miocardio y reducen la conductividad dentro del nódulo auriculoventricular (AV), ayuda a tratar las taquicardias supraventriculares, en particular para controlar la respuesta ventricular en la fibrilación auricular persistente y por tanto se utilizan como medicamentos contra la insuficiencia cardiaca. Se conocen entonces según el anillo lactónico dos grandes clases de cardiotónicos: Los cardenolidos, con anillo de gama-lactona, α y los bufanolidos o escilanolidos, con anillo de delta-lactona.^{68,69}

3.5.4 Saponinas

Son un grupo de glicósidos solubles en agua, que tienen la propiedad de hemolizar la sangre y disminuir la tensión superficial del agua, formando espuma abundante. Las saponinas son heterósidos (azúcar + aglicón) que se caracterizan por su capacidad de producir espuma cuando se agita una solución acuosa que las contiene.⁷⁰

3.5.5 Esteroides y triterpenos libres

Los triterpenos son compuestos con un esqueleto carbonado basado en seis unidades de isopreno que deriva del escualeno, hidrocarburo acíclico de 30 carbonos. Son de estructura relativamente compleja generalmente tetracíclicos o pentacíclicos y pueden contener grupos hidroxilo, cetona o aldehído y ácido carboxílico, que en contacto con soluciones ácidos forman dobles enlaces dando tonalidades rojas, azules o verdes. Estos metabolitos secundarios presentan propiedades antihipertensivas, antiinflamatorias y antioxidantes.⁷¹

3.5.6 Lactonas sesquiterpénicas

Poseen un esqueleto fundamental con 15 átomos de carbono, que, teóricamente deriva de la unión de tres fragmentos de isopreno (2-metilbutadieno-1,3), cabeza, cola y algunos



productos de transposición. Parte del esqueleto es un anillo metilbutenólido. Son sustancias amargas, de farmacología poco estudiada, pero provenientes de plantas usualmente reportadas como medicinales, por lo que es probable que sean los agentes medicinales.⁷²

3.5.7 Cumarinas

Son un grupo muy amplio de principios activos fenólicos y tienen en común la estructura química de 1-benzopiran-2-ona. Se caracterizan porque presentan fluorescencia bajo la luz ultravioleta a 365 nm. Constituyen una clase de metabolitos secundarios, ampliamente distribuidos en el reino vegetal, pudiendo también ser encontrados en hongos y bacterias. Estructuralmente son lactonas del ácido o-hidróxi-cinámico (2H-1-benzopiran-2-onas) siendo el representante más simple de la cumarina. Estos metabolitos son derivados del ácido cinámico por ciclización de la cadena lateral del ácido O-cumárico.⁷²

3.5.8 Naftoquinonas y antroquinonas

Son pigmentos naturales que poseen grupos carboxilo, hidroxilo o metilo como sustituyentes en forma libre o condensada, con monoascaridos que al ser tratados con soluciones alcalinas forman complejos de color rojo cereza. Estos metabolitos secundarios se encuentran distribuidos en diferentes taxas, se les atribuye actividades biológicas como agentes antibacterianos, antiparasitarios, antifúngicos, y anticancerígenos.⁷¹

3.5.9. Taninos

Están constituidos por un amplio grupo de compuestos hidrosolubles con estructura polifenólica, capaces de precipitar ciertas macromoléculas (proteínas, alcaloides, celulosa, gelatina). Esta capacidad para precipitarlas es la base de sus dos propiedades principales: su capacidad de curtir la piel y su propiedad astringente. Los taninos son capaces de reaccionar con las proteínas salivares y las glicoproteínas, por lo que la saliva pierde su poder lubricante y se obtiene un efecto astringente.⁷²



IV. Justificación

Según las estadísticas en la década pasada el cáncer ha sido la principal causa de muerte en el mundo, ocupando México el tercer lugar, esta patología se ha relacionado con un estrés oxidante persistente, entendido como la continua pérdida del balance entre las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERO y ERN), y los complejos sistemas antioxidantes. Esto ha conllevado a la producción de diversos fármacos, la mayoría de ellos sintéticos, para coadyuvar al tratamiento de tal enfermedad, algunas han resultado exitosas y otras han producido resultados poco favorables, por lo cual se busca que la investigación farmacéutica se centre en el análisis de productos naturales como los fitofármacos que a ciertas dosis de forma selectiva regulen el proceso de carcinogénesis, dichos tratamientos son obtenidos de plantas medicinales. Por tal motivo el presente estudio se enfocó en el potencial antioxidante de los extractos de *Heliotropium angiospermum* M. sobre la regulación del estrés oxidativo.



V. Hipótesis del trabajo

Si los extractos hidroalcohólico y acuoso de *Heliotropium angiospermum* M. presentan moléculas capaces de modificar el potencial redox en el sistema éstos estimularán una respuesta antioxidante en un modelo de cáncer inducido a ratones hembras de la cepa CD-1.

VI. Objetivo

- General
 - ✓ Evaluar la actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólico y acuoso de tallo y hoja de *Heliotropium angiospermum* M. en la concentración de nitritos y actividad de catalasa en un modelo de cáncer inducido a ratones hembras.
- Particulares
 - ✓ Realizar un registro etnofarmacológico de *Heliotropium angiospermum* en el Ejido de Limón Chiquito en Cazones de Herrera Veracruz.
 - ✓ Realizar un análisis fitoquímico preliminar de los extractos acuoso e hidroalcohólico de *Heliotropium angiospermum*.
 - ✓ Inducción de carcinoma con óxido de níquel a ratones hembra de la cepa CD-1
 - ✓ Determinar el efecto de los extractos hidroalcohólico y acuoso de *Heliotropium angiospermum* sobre la concentración de nitritos en plasma sanguíneo de ratón.
 - ✓ Evaluar el efecto de los extractos acuoso e hidroalcohólico de *Heliotropium angiospermum* sobre la actividad enzimática de catalasa en plasma sanguíneo de ratón

VII. Metodología

7.1 Localidad de colecta

Heliotropium angiospermum fue colectada en el mes de septiembre del 2013 en la localidad Limón Chiquito, Cazones de Herrera Veracruz (20° 40' 44.4'' N, 97° 16' 43.5'' O a 15 msnm). La especie fue identificada y cotejada en el herbario MEXU, UNAM.



Figura 10. Localidad Limón Chiquito. Imagen tomada de Google Earth, 2014

7.2 Registro etnofarmacológico de *Heliotropium angiospermum*

La información etnofarmacológica de esta especie se recabo mediante entrevistas (Anexo 1), que contenían datos personales como nombre, sexo, edad, y datos acerca de la planta como padecimiento para el que se utiliza, forma de preparación, forma de administración, frecuencia de uso, entre otros cabe mencionar que dichas entrevistas sólo se realizaron a habitantes del lugar que habían utilizado la planta.

7.3 Procesamiento del material vegetal

Una vez que se obtuvo la especie, las hojas y tallos de *Heliotropium angiospermum* se enjuagaron con agua destilada y posteriormente se trituraron en un molino de mano.



7.4 Obtención de los extractos hidroalcohólico y acuoso

➤ Extracto hidroalcohólico

Cada 100 gr de material vegetal fresco y molido (raíz, tallo, hoja, semilla y flor) de *Heliotropium angiospermum* se extrajo con una solución de etanol agua (70:30) en proporción 1:5. La mezcla se guardó en frascos ámbar por 4 semanas, al cumplir dicho tiempo el extracto hidroalcohólico se filtró al vacío con papel Whatman del No.1 y se concentró a temperatura ambiente en una campana de extracción.

➤ Extracto acuoso

Cada 100 gr de material vegetal de cada una de las estructuras (raíz, tallo, hoja, semilla y flor) de *Heliotropium angiospermum* fueron sometidos a un cocimiento con 1400 mL de agua, una vez obtenida la infusión se filtró con gasas y fueron almacenadas en frascos ámbar en un cuarto frío.

7.5 Secado de extractos

Ambos extractos (hidroalcohólico y acuoso) se secaron colocando 50 mL de extracto en cristalizadores de 125 x 65 hasta secarlo completamente.

7.6 Identificación de metabolitos secundarios

7.6.1 Alcaloides

Las técnicas para la identificación de los alcaloides están basadas en la capacidad que tienen los alcaloides en estado de sal (extractos ácidos), de combinarse con el yodo y metales pesados (bismuto, mercurio, tungsteno) produciendo reacciones de precipitación. Estas reacciones de precipitación se basan en un intercambio del anión del reactivo en acción, que reemplaza a los aniones pequeños de las sales de los alcaloides.^{61,73,74}

Para la identificación de estos metabolitos se realizó una solución patrón de cada extracto concentrado de 100 mg/mL, a partir de éste se hicieron disoluciones de 2, 4, 6 y 10 mg/mL, posteriormente se agregaron los reactivos de Dragendorff, Mayer y Wagner, y se observó la coloración que presentaba cada reacción.

7.6.1.1 Reactivo de Dragendorff

Se mezclan 2 g de nitrato de bismuto pentahidratado ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (J.T. Baker, grado RA)) en 5 mL de ácido nítrico (HNO_3 (Meyer, grado RA)) al 30% con una solución de 6.8 g de yoduro de potasio (KI (Meyer, grado RA)) en 12.5 mL de agua, posteriormente se deja



en reposo por 24 horas, se decanta y se afora a 25 mL. La adición de este reactivo a una solución ácida de alcaloides presentará un precipitado naranja rojizo.

7.6.1.2 Reactivo de Mayer

Se disuelven 0.65 g de bicloruro de mercurio (HgCl_2 (J.T. Baker, grado RA)) en 30 mL de agua y 2.5 g de yoduro de potasio (KI (Meyer, grado RA)) y se afora a 50 mL. Los alcaloides se detectan con la formación de un precipitado blanco o de color crema soluble en ácido acético ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ (J.T. Baker, grado RA)) y etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ (J.T. Baker, grado RA)).

7.6.1.3 Reactivo de Wagner

En 25 mL de agua se disuelve 0.31g de yodo sublimado (I sublimado (J.T. Baker, grado RA)) y 0.5 g de yoduro de potasio (KI (Meyer, grado RA)). Esta reacción presenta la formación de un precipitado de color naranja-rojizo.

7.6.2 Flavonoides

Estos metabolitos pueden formar complejos con metales como Mg^{2+} y Fe^{3+} , que al acidularlas viran a reacciones coloreadas. Por tal motivo se utilizó la reacción de Shinoda, donde el ácido clorhídrico oxida al magnesio metálico dando como producto al hidrógeno molecular y cloruro de magnesio.^{75,76} Se realizó una solución patrón de cada extracto concentrado de 100 mg/mL, a partir de éste se hicieron disoluciones de 2, 4, 6 y 10 mg/mL, posteriormente se realizó la reacción antes mencionada y se observó la coloración que presentaban las muestras.

7.6.2.1 Reacción de Shinoda

La muestra se disuelve en etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ (J.T. Baker, grado RA)), y se le adicionan limaduras de magnesio (Mg (J.T. Baker, grado RA)), posteriormente se agrega gota a gota ácido clorhídrico (HCl), hasta la formación de una coloración rojiza, naranja o violeta.

7.6.3 Glicósidos cardiotónicos

Para la identificación de estos metabolitos se utilizó una solución patrón de cada extracto concentrado de 100 mg/mL, a partir de éste se hicieron disoluciones de 2, 4, 6 y 10 mg/mL, posteriormente se agregó a cada muestra por separado los reactivos de Baljet, Keller-Killiani y Lieberman Burchard, y se observó la reacción colorida que éstos presentaban. Es importante mencionar que las tres pruebas deben de dar positivo para su correcta identificación.



7.6.3.1 Reactivo de Baljet

Se disuelven 0.25g de ácido pícrico ($C_6H_3N_3O_7$ (Meyer, grado RA)) en 25 mL de etanol (C_2H_6O (J.T. Baker, grado RA)) y 2.5g de hidróxido de sodio (NaOH (J.T. Baker, grado RA)) en 25 mL de agua. Esta prueba de identificación es positiva cuando se presenta un precipitado o coloración rojiza.

7.6.3.2 Reactivo de Keller-Killiani

Se disuelve 1 g de cloruro de hierro hexahidratado ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (Mallinckrod, G.A), 2% en ácido acético ($C_2H_4O_2$ (J.T. Baker, grado RA)), posteriormente se aplica 1 mL a la muestra e inmediatamente se adiciona gota a gota ácido sulfúrico (H_2SO_4 (Meyer, grado RA)). Para que esta reacción de positiva debe existir la formación de una coloración verde o parda.

7.6.3.2 Reactivo de Lieberman-Burchard

Se mezcla 1mL de cloroformo ($CHCl_3$ (J.T. Baker, grado RA)) y 1 mL de anhídrido acético ($C_4H_6O_3$ (Sigma, grado RA)). Al agregar este reactivo a la muestra la reacción debe virar a coloraciones roja-naranja, la cual indica la presencia de un núcleo triterpénico; en cambio si la coloración es azul-verde, nos indica la presencia de un núcleo esteroide.

7.6.4 Saponinas

La identificación de estos metabolitos se llevó a cabo mediante la reacción de Lieberman-Burchard. Se utilizó una solución patrón de cada extracto concentrado de 100 mg/mL, a partir de éste se hicieron disoluciones de 2, 4, 6 y 10 mg/mL, posteriormente se agregó el reactivo y se observó las coloraciones presentes.

7.6.4.1 Reactivo de Lieberman-Burchard

Se mezcla 1mL de cloroformo ($CHCl_3$ (J.T. Baker, grado RA)) y 1 mL de anhídrido acético ($C_4H_6O_3$ (Sigma, grado RA)). Al agregar este reactivo a la muestra la reacción debe virar a coloraciones roja-naranja, la cual indica la presencia de un núcleo triterpenico; en cambio si la coloración es azul-verde, nos indica la presencia de un núcleo esteroide.

7.6.5 Esteroides y triterpenos libres

La identificación de estos metabolitos se llevó a cabo mediante la reacción de Lieberman-Burchard. Se utilizó una solución patrón de cada extracto concentrado de 100 mg/mL, a partir de éste se hicieron disoluciones de 2, 4, 6 y 10 mg/mL, posteriormente se agregó el reactivo y se observó las coloraciones presentes.



7.6.5.1 Reactivo de Lieberman-Burchard

Se mezcla 1mL de cloroformo (CHCl_3 (J.T. Baker, grado RA)) y 1 mL de anhídrido acético ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3$ (Sigma, grado RA)). Al agregar este reactivo a la muestra la reacción debe virar a coloraciones roja-naranja, la cual indica la presencia de un núcleo triterpenico; en cambio si la coloración es azul-verde, nos indica la presencia de un núcleo esteroide.

7.6.6 Lactonas sesquiterpenicas

La identificación de estos metabolitos utilizando los reactivos de Lieberman-Burchard e hidroxamato férrico, se utilizó una solución patrón de cada extracto concentrado de 100 mg/mL, a partir de este se hicieron disoluciones de 2, 4, 6 y 10 mg/mL, posteriormente se agregaron los reactivos mencionados y se observaron las reacciones coloridas.

7.6.6.1 Reactivo hidroxamato férrico

Se prepara una solución de clorhidrato de hidroxilamina (J.T. Baker, grado RA) 2% etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ (J.T. Baker, grado RA)) y hidróxido de sodio (NaOH (J.T. Baker, grado RA)), se calienta de 2-5 min a 100 °C hasta la aparición de una espuma de color rojizo, posteriormente se enfría y acidula con ácido clorhídrico (HCl (J.T. Baker, grado RA)) y se añade cloruro de hierro (FeCl_3 (J.T. Baker, grado RA)). Para considerar esta prueba positiva se debe observar una coloración violeta.

7.6.6.2 Reactivo de Lieberman-Burchard

Se mezcla 1mL de cloroformo (CHCl_3) y 1 mL de anhídrido acético ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3$ (Sigma, grado RA)). Al agregar este reactivo a la muestra la reacción debe virar a coloraciones roja-naranja, la cual indica la presencia de un núcleo triterpenico; en cambio si la coloración es azul-verde, nos indica la presencia de un núcleo esteroide.

7.6.7 Cumarinas

Estos metabolitos secundarios se identificaron mediante las pruebas de los reactivos de hidroxamato férrico. Se utilizó una solución patrón de cada extracto concentrado de 100 mg/mL, a partir de este se hicieron disoluciones de 2, 4, 6 y 10 mg/mL, y se observó la coloración presente en cada reacción. Para confirmar la presencia de cumarinas, las dos pruebas deben de ser positivas.



7.6.7.2 Reactivo hidroxamato férrico

Se prepara una solución de clorhidrato de hidroxilamina (J.T. Baker, grado RA) 2% etanol (C_2H_6O) y hidróxido de sodio (NaOH(J.T. Baker, grado RA)), se calienta de 2-5 min a 100 °C hasta la aparición de una espuma de color rojizo, posteriormente se enfría y acidula con ácido clorhídrico (HCl (J.T. Baker, grado RA)) y se añade cloruro de hierro ($FeCl_3$ (J.T. Baker, grado RA)). Para considerar esta prueba positiva se debe observar una coloración violeta.

7.6.8 Naftoquinonas y antroquinonas

Para la identificación de este metabolito se utilizó la reacción de Bornträger-Krauss, se preparó una solución patrón de cada extracto concentrado de 100 mg/mL, a partir de éste se hicieron disoluciones de 2, 4, 6 y 10 mg/mL, y se observó la coloración que esta reacción presentaba.

7.6.8.1 Reacción de Bornträger-Kraus

Las muestras se trataron con una solución de hidróxido de potasio (KOH (J.T. Baker, grado RA)) al 5%, posteriormente se filtró y aciduló con 3 gotas de ácido clorhídrico (HCl (J.T. Baker, grado RA)), se sacudió con benceno (C_6H_6 (J.T. Baker, grado RA)) y se dejó en reposo durante 3 horas, posteriormente se observa la separación de la fase bencénica, a la cual se le añade una solución de hidróxido de amonio (NH_4OH (J.T. Baker, grado RA)) 2%. Si se presenta una coloración rosa a rojo intenso la prueba es positiva.

7.6.9. Taninos

La identificación de los taninos se realizó agregando el reactivo gelatina-sal a cada una de las muestras, utilizando una solución patrón de cada extracto concentrado de 100 mg/mL, del cual se hicieron disoluciones de 2, 4, 6 y 10 mg/mL.

7.6.9.1 Reactivo gelatina-sal

Se disuelven 0.25g de gretina en 25 mL de agua, en una solución al 10% de cloruro de sodio (NaCl (J.T. Baker, grado RA)), la prueba se considera positiva si existe la formación de un precipitado blanco.

7.7 Inducción de carcinoma a modelos experimentales

Se utilizaron 55 ratones hembra de la cepa CD-1 de un mes de edad, divididos en 11 grupos experimentales como se muestra en la tabla 8. La inducción de carcinoma a modelos experimentales se realizó con modificaciones en el método estandarizado por



Ortiz et al., 1995⁷⁷, el cual consistió en la administración de una sola dosis intramuscular de 20 mg/kg de óxido de níquel (NiO).

Tabla 8. Inducción de carcinoma a modelos experimentales

Grupo experimental	Inducción de carcinoma	Número de organismos
Grupo I	Control	5
Grupo II	Vehículo (aceite de oliva)	5
Grupo III	Inducción de cáncer con NiO	5
Grupo IV	Inducción de cáncer con NiO	5
Grupo V	Inducción de cáncer con NiO	5
Grupo VI	Inducción de cáncer con NiO	5
Grupo VII	Inducción de cáncer con NiO	5
Grupo VIII	Inducción de cáncer con NiO	5
Grupo IX	Inducción de cáncer con NiO	5
Grupo X	Inducción de cáncer con NiO	5
Grupo XI	Inducción de cáncer con NiO	5

7.8 Tratamiento con extractos

Después de 3 meses de la inducción de carcinoma con NiO, se administró una dosis diaria de 5mg/mL y 10 mg/mL de los extractos de tallo y hoja durante 15 días, se eligieron estas estructuras ya que son las más utilizadas en la localidad estudiada. La dosis aplicada a los modelos experimentales se obtuvo mediante entrevistas etnofarmacológicas realizadas a pobladores de la comunidad de Limón Chiquito, ya que para esta especie vegetal no existe reportada una DL₅₀. La aplicación de los tratamientos se distribuyó como se muestra en la tabla 9.

Tabla 9. Dosis aplicada de los extractos hidroalcohólico y acuoso de *Heliotropium angiospermum* a ratones de la cepa CD-1

Grupo experimental	Tratamiento	Dosis
Grupo I	Control negativo	----
Grupo II	Vehículo (aceite de oliva)	----
Grupo III	Control positivo (NiO)	----
Grupo IV	Extracto hidroalcohólico de hoja	5mg/mL
Grupo V	Extracto hidroalcohólico de hoja	10 mg/mL
Grupo VI	Extracto hidroalcohólico de tallo	5mg/mL
Grupo VII	Extracto hidroalcohólico de tallo	10 mg/mL
Grupo VIII	Extracto acuoso de hoja	5mg/mL
Grupo IX	Extracto acuoso de hoja	10 mg/mL
Grupo X	Extracto acuoso de tallo	5mg/mL
Grupo XI	Extracto acuoso de tallo	10 mg/mL



7.9 Obtención de plasma

Los grupos experimentales fueron sacrificados por decapitación, la sangre obtenida se colectó en tubos con EDTA, posteriormente fueron centrifugados a 5000 rpm durante 5 min, a una temperatura de 4°C, las muestras fueron almacenadas en hielo hasta el momento de su análisis.

7.10 Cuantificación de NO por el método de Griess

Para la cuantificación de NO se preparó una curva patrón de NaNO₂ (J.T. Baker, grado RA), en concentración de 0 a 100 µM, y se leyó a 540 nm en el espectrofotómetro UV (Genesys 20, 4001/4, Thermo Fisher Scientific). En un tubo de ensayo se agregaron 100 µl de plasma sanguíneo, enseguida se adicionó 1 mL de sulfanilamida (J.T. Baker, grado RA) al 1% (p/v) en H₃PO₄ (J.T. Baker, grado RA) al 5% (v/v), las muestras se dejaron incubar durante 15 min en la oscuridad a temperatura ambiente. Al terminar el tiempo de incubación se agregó 1 mL de diclorhidrato de N-(1-naftil) etilendiamina (J.T. Baker, grado RA), y se dejó reposar durante 15 min a temperatura ambiente en la oscuridad, una vez transcurrido el tiempo, las muestras fueron leídas a una absorbancia de 540 nm en el espectrofotómetro UV.

Esta reacción se basa en la formación de un cromóforo magenta por la reacción de sulfanilamida con nitrito en medio ácido, seguido de un acoplamiento con aminas bicíclicas tales como N-(1-naftil) etilendiamina.⁷⁸

7.11 Cuantificación de proteína total por el método de Biuret

Para la cuantificación de proteína se realizó una curva patrón de una solución patrón de albúmina de huevo (Sigma), en un intervalo de concentración de 0 a 10 mg/mL, posteriormente se agregaron 2 mL de reactivo de Biuret y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente, al término del tiempo se leyó a una absorbancia de 545 nm en el espectrofotómetro UV (Genesys 20, 4001/4, Thermo Fisher Scientific). Posteriormente se adicionó 50 µl de plasma sanguíneo y 2mL de reactivo de Biuret, incubándolas por un intervalo de 20 minutos a temperatura ambiente, después del tiempo transcurrido, las muestras se leyeron a 545 nm en un espectrofotómetro UV.

Esta reacción se basa en la formación de un cromóforo violeta por la reacción del Cu²⁺ y cuatro grupos NH de los enlaces peptídicos en medio básico, la intensidad que presente la coloración es directamente proporcional a los enlaces peptídicos existentes en la muestra.



7.12 Actividad de la catalasa por el método de Chance y Machley

Para medir la actividad de la enzima catalasa se utilizó el método estandarizado de Chance y Machley (1954)⁷⁹. Este protocolo se basa en el principio de que la catalasa es capaz de reducir al H₂O₂ en una molécula de agua y ½ de oxígeno molecular. Para esta cuantificación se utilizó un espectrofotómetro UV (UNICO, S-2150 UV) por medio del siguiente procedimiento:

En una celda de cuarzo, se agregaron 3000 µL de sustrato (H₂O₂ 27 mM en solución PBS, pH 7.0) (LASA, grado RL) y 50 µL de plasma sanguíneo, posteriormente se registró la absorbancia a 240 nm cada 10 segundos durante 5 minutos.

Una vez terminado el proceso, se calculó el cambio en la absorbancia a 240 nm por minuto (ΔA_{240}) como la pendiente de la parte lineal de la gráfica de A₂₄₀ contra el tiempo. Finalmente para calcular la actividad de catalasa se utilizó la siguiente ecuación:

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

En dónde; ϵ es el coeficiente de extinción molar del H₂O₂ a 240 nm (37.36 µmol⁻¹ mL Abs); FD es el factor de dilución (3050/50= 61), es importante mencionar que la ecuación se corrigió por la concentración de proteína en cada muestra (determinada por el método de Biuret).

7.13 Análisis estadístico

Los datos fueron sometidos a un análisis estadístico ANOVA con el programa Excel 2010, considerando un nivel de confianza del 95 %.

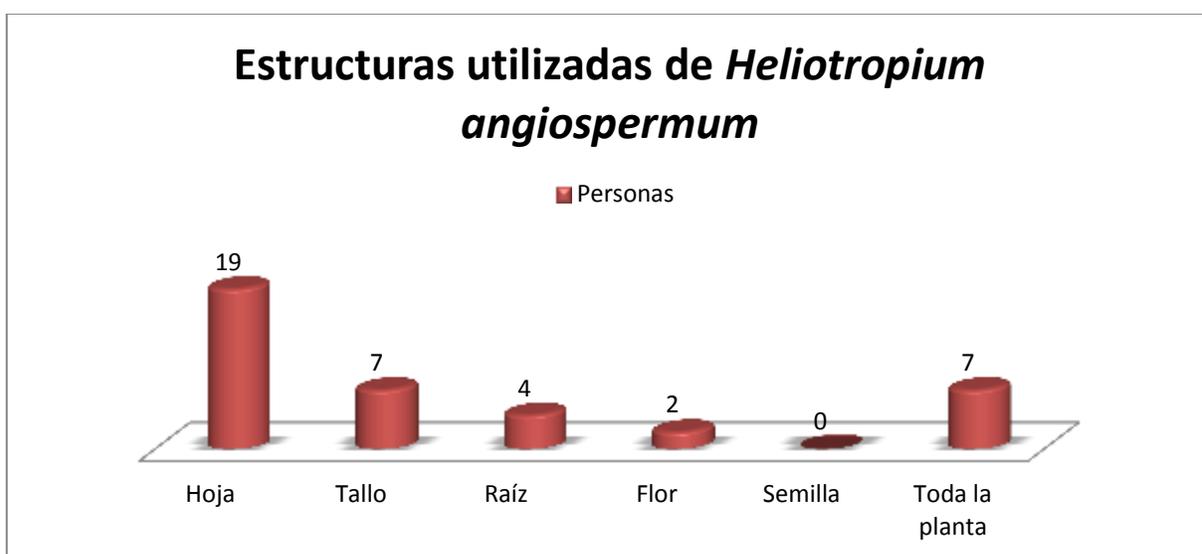
VII. Resultados

8.1 Registro etnofarmacológico de *Heliotropium angiospermum*

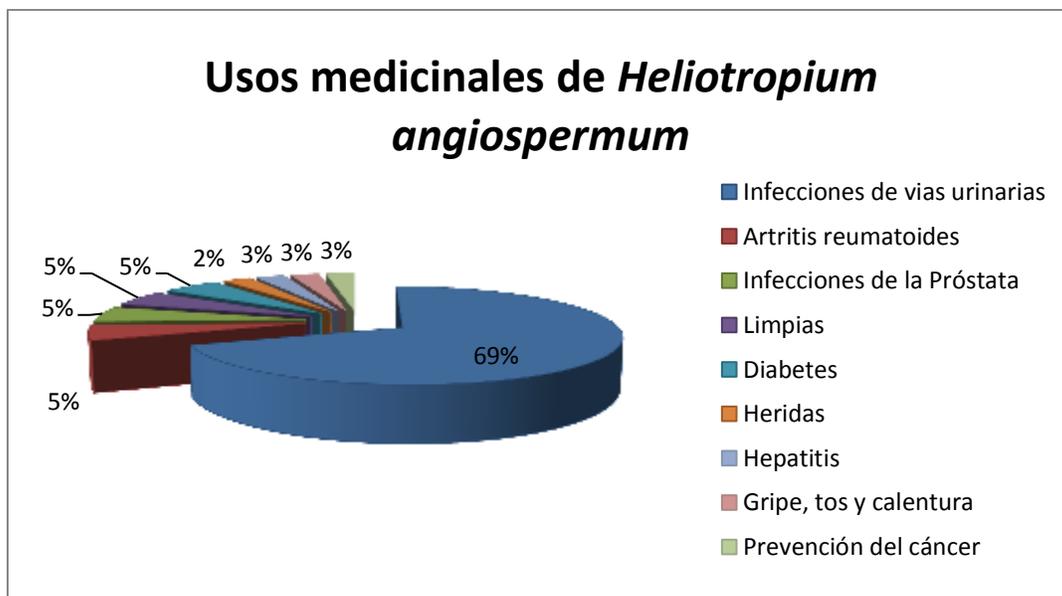
El registro etnofarmacológico se realizó mediante una entrevista dirigida exclusivamente a personas de la comunidad de Limón Chiquito que han utilizado esta especie vegetal. Se obtuvieron un total de 39 entrevistas, 27 de ellas corresponden al sexo femenino y 12 al sexo masculino; lo que representa al 2.52% de esta población. Dicha entrevista contenía 18 preguntas, de las cuales las que tenían mayor relevancia para nuestro estudio fueron:

- Sexo y edad
- Uso medicinal o padecimiento
- Dosis empleada
- Frecuencia de uso
- Estructura utilizada
- Forma de preparación

Una vez obtenidos los datos requeridos se realizó un análisis de información, en donde se obtuvo que las personas que utilizan esta especie vegetal tienen un rango de edad entre los 23 y 84 años; las principales estructuras utilizadas son la hoja y el tallo (Gráfica 1). La forma de preparación es en cocimiento e infusiones durante un periodo de 7 días a 1 mes; la administración es de forma oral en dosis de 25 g de planta por litro de agua aproximadamente. Los principales usos medicinales de *Heliotropium angiospermum* se muestran en la gráfica 2.



Gráfica 1. Principales estructuras utilizadas de *Heliotropium angiospermum*



Grafica 2. Usos medicinales de *Heliotropium angiospermum*

De acuerdo a los usos reportados bibliográficamente y a los obtenidos mediante la entrevista, se puede observar que los padecimientos que se tratan con dicha planta son similares en ambas consultas, sin embargo cabe destacar que en esta población se le dan usos que aún no se encuentran reportados en la literatura consultada^{53,54}, tales como la diabetes, el cáncer y la hepatitis.



8.2 Rendimiento de los extractos hidroalcohólico y acuoso de *Heliotropium angiospermum*

El rendimiento de cada uno de los extractos se obtuvo mediante el siguiente cálculo:

$$\% R = \frac{EO (g)}{TMV (g)} * 100$$

En donde R es el rendimiento, EO es el extracto obtenido y TMV es el total de la muestra vegetal.⁸⁰ Los rendimientos obtenidos se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Rendimiento de los extractos de *Heliotropium angiospermum*

Extracto	Rendimiento				
	Raíz	Tallo	Hoja	Flor	Semilla
Acuoso	0.29%	0.26%	1.42%	1.02%	1.11%
Hidroalcohólico	2.73%	2.36%	3.01%	3.19%	2.88%

8.3 Análisis preliminar fitoquímico de los extractos acuoso e hidroalcohólico de *Heliotropium angiospermum*

Para el análisis fitoquímico preliminar se utilizaron los extractos acuoso e hidroalcohólico de *Heliotropium angiospermum* de las estructuras de raíz, tallo hoja, flor y semilla, con la finalidad de determinar en qué estructura se encontraba la mayor cantidad de metabolitos secundarios. Este estudio mostró en mayor abundancia la presencia de alcaloides, glicósidos cardiotónicos, flavonoides y cumarinas (Tabla 11).

Tabla 11. Análisis fitoquímico preliminar de *Heliotropium angiospermum*.

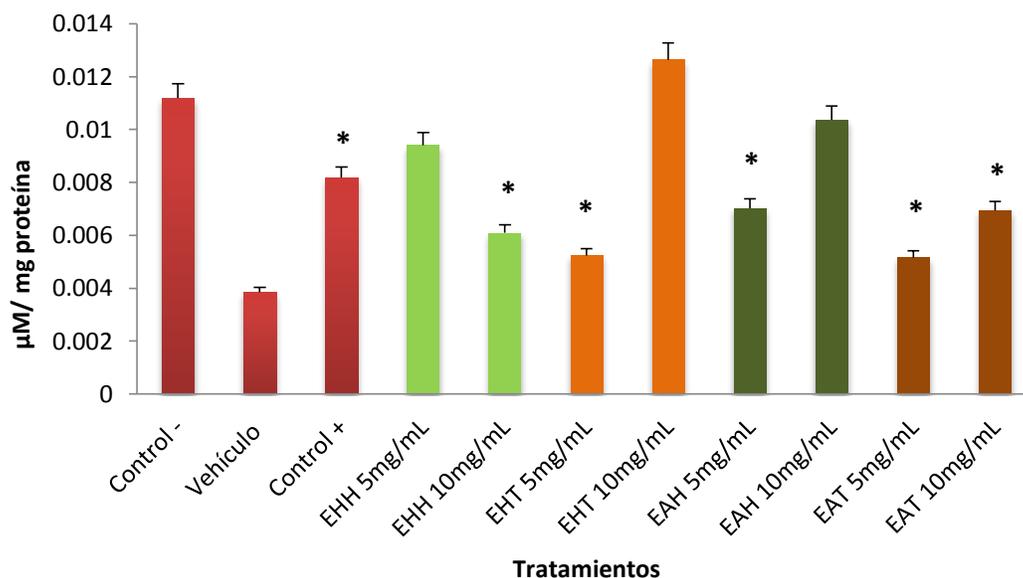
Metabolito secundario	Extracto acuoso					Extracto hidroalcohólico				
	Estructura vegetal									
	R	T	H	F	S	R	T	H	F	S
Alcaloides	++	++	+++	+++	+++	+	+	+++	++	+++
Glicósidos cardiotónicos	-	+	+	+	+++	++	++	+++	++	++
Esteroides y triterpenos libres	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Flavonoides	+	+	++	++	++	+	-	-	-	-
Taninos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saponinas	-	-	-	-	-	+	-	+++	-	+
Cumarinas	+++	-	+++	+++	+++	-	-	-	-	-
Naftoquinonas y antroquinonas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ Presencia escasa, ++ Presencia relativamente abundante, +++ Presencia abundante, - No detectado

8.4 Efecto de los extractos hidroalcohólico y acuoso de *Heliotropium angiospermum* sobre los niveles de NO

Los resultados obtenidos muestran un aumento significativo en los niveles NO en plasma en el grupo inducido a cáncer con óxido de níquel con respecto al vehículo. Por el contrario los grupos inducidos a cáncer y tratados con los extractos hidroalcohólico de hoja 10 mg/ml y tallo 5 mg/mL, y los extractos acuosos de hoja 5mg/mL y tallo de 5mg/mL y 10mg/mL, disminuyen las concentraciones de NO respecto al control positivo (grafica 3).

Cabe mencionar que los extractos hidroalcohólico de hoja 5mg/mL y tallo 10 mg/mL, y el extracto acuoso de hoja de 10 mg/mL, aumentan la concentración de nitritos respecto al control positivo.



Grafica 3. Efecto de los extractos de *Heliotropium angiospermum* sobre la concentración de nitritos en plasma de ratones hembra de la cepa CD-1. *p < 0.05 (ANOVA)

Control negativo; Vehículo (aceite de oliva); Control positivo (inducción a cáncer con NiO); EHH 5 mg/mL; EHH 10 mg/mL; EHT 5 mg/mL; EHT 10 mg/mL; EAH 5 mg/mL; EAH 10 mg/mL; EAT 5 mg/mL; EAT10 mg/mL.

EHH: Extracto hidroalcohólico de hoja

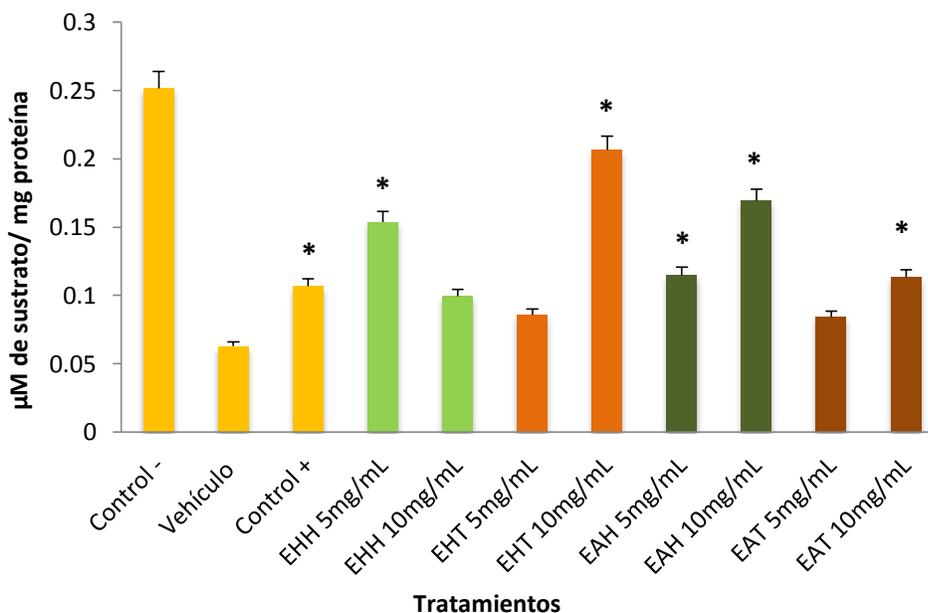
EHT: Extracto hidroalcohólico de tallo

EAH: Extracto acuoso de hoja

EAT: Extracto acuoso de tallo

8.5 Efecto de los extractos hidroalcohólico y acuoso de *Heliotropium angiospermum* en la actividad de la catalasa

Los resultados obtenidos muestran una disminución significativa de la actividad plasmática de catalasa en el grupo inducido a cáncer con óxido de níquel con respecto al control. Por el contrario, los grupos inducidos a cáncer y tratados con el extracto hidroalcohólico de hoja de 5 mg/mL y tallo de 10 mg/mL, y los extractos acuosos de hoja 5mg/mL y 10mg/mL aumentaron la actividad de esta enzima antioxidante (Grafica 4).



Grafica 4. Efecto de los extractos de *Heliotropium angiospermum* sobre la actividad de la catalasa en plasma de ratones hembra de la cepa CD-1.

Control negativo; Vehículo (aceite de oliva); Control positivo (inducción a cáncer con NiO); EHH 5 mg/mL; EHH 10 mg/mL; EHT 5 mg/mL; EHT 10 mg/mL; EAH 5 mg/mL; EAH 10 mg/mL; EAT 5 mg/mL; EAT10 mg/mL.

EHH: Extracto hidroalcohólico de hoja

EHT: Extracto hidroalcohólico de tallo

EAH: Extracto acuoso de hoja

EAT: Extracto acuoso de tallo



IX. Discusión

Registro etnofarmacológico de *Heliotropium angiospermum*

Desde tiempos milenarios ha existido un gran interés por el estudio de las plantas medicinales, que ha resurgido en las últimas dos décadas, ya que se han realizado diversos estudios donde se demuestra el efecto terapéutico que estas plantas presentan, las cuales son una fuente alternativa de compuestos altamente bioactivos, con uso potencial en la industria farmacológica y que sirven notablemente en el avance de nuevas terapias.

Una de las ramas encargadas de estudiar las propiedades que contienen estas plantas es la etnofarmacología la cual se define como “la exploración científica interdisciplinaria de los agentes biológicamente activos y tradicionalmente empleados o conocidos por el hombre”^{81,82}. Por tal motivo, se realizó un registro etnofarmacológico donde se destaca el uso que tiene *Heliotropium angiospermum* en la comunidad de Limón Chiquito.

Los resultados obtenidos en esta población mostraron que esta planta se utiliza para tratar diversas padecimientos, principalmente las infecciones de vías urinarias y próstata. La dosis empleada es de 25 g por litro de agua, su forma de preparación es cocimiento e infusiones y el tiempo de administración comprende entre los 15 días y 1 mes.

De acuerdo a los usos medicinales reportados bibliográficamente para este género y los encontrados en *Heliotropium angiospermum* se puede concluir que hay una similitud en propiedades antiinflamatorias, antivirales, bactericidas y dermatológicas. Es importante mencionar que la bibliografía consultada atribuye a este género propiedades antioxidantes, por lo que se sugiere que esta especie vegetal sea estudiada a detalle, para conocer las propiedades que pueda aportar en beneficio de la salud.



Análisis preliminar fitoquímico de los extractos hidroalcohólico y acuoso de *Heliotropium angiospermum*

Las plantas presentan un metabolismo secundario, el cual les confiere propiedades biológicas específicas, que pueden aportar beneficios a la salud⁸³, por tal motivo se realizó un estudio preliminar fitoquímico para sustentar la presencia de metabolitos secundarios, que tuvieran propiedades curativas y fueran relevantes para esta investigación. Es importante señalar que de acuerdo a las fuentes de información consultadas hasta el momento no hay un estudio fitoquímico preliminar completo para esta especie.

El análisis de los extractos hidroalcohólico y acuoso de *Heliotropium angiospermum* dio como resultado la presencia de alcaloides, glicósidos cardiotónicos y flavonoides en las estructuras de raíz, tallo, hoja, flor y semilla. Específicamente en el extracto hidroalcohólico además de los metabolitos mencionados anteriormente se identificaron saponinas en raíz, hoja y semilla además de esteroides y triterpenos libres en raíz y flor; mientras que en el extracto acuoso se encontró la presencia de cumarinas en las estructuras de raíz, hoja, flor y semilla.

Los metabolitos secundarios más relevantes para nuestro estudio son los flavonoides glicósidos cardiotónicos, saponinas y esteroides y triterpenos libres, ya que estos presentan propiedades medicinales de nuestro interés.

De acuerdo a los estudios reportados en especies pertenecientes a la familia de las Boraginaceas en específico al género de los Heliotropos, se puede comprobar la presencia de estos metabolitos en dicha especie⁸⁴, es importante mencionar que existen metabolitos no reportados para *Heliotropium angiospermum*, por lo que se sugiere profundizar en su estudio.

En términos generales, los resultados del estudio preliminar fitoquímico coinciden con lo reportado para la familia Boraginaceae^{85,86}, uno de los metabolitos que se encontraron en la especie vegetal *Heliotropium angiospermum*, son los flavonoides; dichos metabolitos también han sido encontrados en especies del género *Heliotropium* y en varias especies de la familia Boraginaceae.⁸⁷

Los flavonoides son metabolitos ampliamente reconocidos por su actividad antioxidante, ya que gracias a su estructura química, contienen grupos fenólicos que son capaces de captar hierro y otros metales de transición. Durante varios años se ha intentado dilucidar el efecto que estos presentan en diferentes modelos ya sea de forma *in vivo* o *in vitro* (figura 10). Algunos estudios *in vitro* han demostrado que los flavonoides interfieren por diversos mecanismos en el proceso carcinogénico, por esta razón estos metabolitos son

posibles agentes de utilidad en las primeras fases del cáncer o en la inhibición de las etapas posteriores de progresión o invasión.^{88,89}

Los procesos neoplásicos, en sus fases de promoción y progresión, se caracterizan por alteraciones la regulación de la proliferación y de la diferenciación celular. Algunos flavonoides tienen acción sobre estas etapas en diferentes tipos celulares, lo que puede conducir al uso de estos compuestos como agentes citostáticos en las últimas etapas de la carcinogénesis, más que como elementos preventivos de las primeras fases.⁸⁹

Es importante mencionar que estos metabolitos no sólo ayudan en los procesos antes mencionados, ya que también se ha encontrado su participación en la cadena de peroxidación lipídica, atacando los radicales hidroxilo y superóxido.⁹⁰⁻⁹²

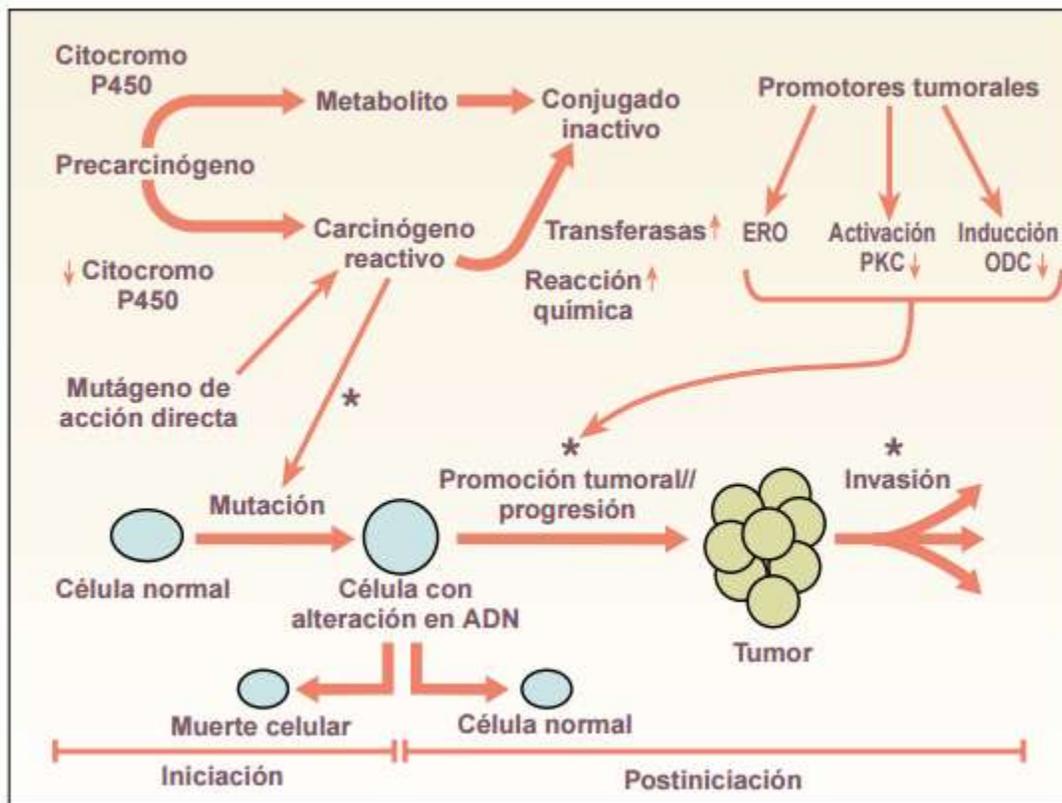


Figura 11. Posibles lugares de interacción de los flavonoides con el proceso carcinogénico (indicados con asteriscos). Las flechas cortas indican el efecto potenciador (flecha hacia arriba) o inhibitor (flecha hacia abajo) de la actividad. ERO: especies reactivas de oxígeno; ODC: ornitina descarboxilasa; PKC: proteína cinasa C. Tomada de Álvarez et al. 2003⁸⁹.

Uno de los flavonoides más importantes es la quercetina ya que numerosos estudios han comprobado en diferentes modelos, que es un poderoso removedor de RL, capaz de retirar oxígeno reactivo específicamente en forma de aniones superóxidos, radicales



hidróxidos, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos, bloqueando el efecto tóxico de estas sustancias y así ejerciendo un papel citoprotector en situaciones de peligro de daño celular.⁹³⁻⁹⁷

Otro metabolito presente en los extractos hidroalcohólico y acuoso de *Heliotropium angiospermum* son los glicósidos cardiotónicos; de acuerdo a algunos reportes realizados para la familia Boraginaceae las especies *Heliotropium indicum* y *Cordia dentata* presentan estos metabolitos^{87,98}.

Los glicósidos son ampliamente reconocidos por su uso en enfermedades cardíacas como arritmia auricular e insuficiencia cardíaca, pero en los últimos años ha surgido un gran interés por estudiar los mecanismos de acción de dichas moléculas en procesos celulares importantes y de esta forma dilucidar los posibles usos terapéuticos en diversas patologías. Dentro de los usos más importantes que se le atribuyen a los glicósidos cardiotónicos se encuentra el aumento de la susceptibilidad de las células cancerosas a estos compuestos. Actualmente existen diversos estudios realizados en líneas celulares que comprueban la eficacia de los glicósidos sobre células tumorales (tabla 12), lo que nos da constancia sobre su uso potencial como tratamientos contra el cáncer, sin embargo es importante mencionar que aún se encuentra en investigación cual es el mecanismo que hace posible dicho efecto.⁹⁹ La presencia de estos metabolitos secundarios en el género *Heliotropium* aún no se encuentra reportado por lo que se sugiere profundizar en su estudio.

Tabla 12. Estudios realizados con glicósidos en líneas celulares

Tipo de cáncer	Compuesto utilizado	Líneas celulares
Mama	Digitoxina, digoxina, proscillaridina A, ouabaina, digoxigenina, gitoxina, gitoxigenina	MCF-7, MDA-MD-435. ^{100,101}
Próstata	Oleandrina, ouabaina, digoxina, bufalina, cinobufagenina	PC-3, LNCaP, DU145. ^{102,103,104}
Melanoma	Digoxina, oleandrina, digitoxina, proscillaridin A, ouabaina, digitonina	UACC-62, BRO. ^{101,105}
Pulmón	Digitoxina, digoxina, ouabaina, UNBS1450, oleandrina	A549, NCI-H-358, Calu1, Sklu1, NCI-H6, H69AR. ¹⁰⁶⁻¹⁰⁹
Leucemia	Bufalin, oleandrina, digitoxina, proscillaridina A, ouabaina	HL60, U-937, CCRF-CEM, CEM-VM-1. ^{101,109-113}
Neuroblastoma	Digoxina, ouabaina	SH-SY5Y, Neuro-2 ^a . ¹¹⁴
Renal	Digitoxina, digoxina, digitoxigenina, proscillaridin A, ouabaina	TK-10, ACHN. ^{101,109}



Melanoma	Digitoxina, digoxina, proscillaridin A, digitoxigenina, ouabaina, digitonina, lanatocide C	8226-S, 8226-LR5, 8226-DOX-40. ^{109,115}
Pancreático	Oleandrina	PANC-1. ¹¹⁶

En el estudio preliminar fitoquímico también se identificó la presencia de saponinas, el reporte de estos metabolitos para la familia Boraginaceae son diversos ya que en algunas especies del genero *Heliotropium* se encuentran identificadas mientras que en otros generos pertenecientes a la misma familia aun no existen reportes de su presencia^{117,118}.

Las saponinas se encuentran en un gran número de plantas y son de gran importancia ya que se les atribuye diversas propiedades biológicas y farmacológicas como son: actividad antiparasitaria, antiviral, antiinflamatoria, antifúngica, citotóxica y antitumoral. Dentro de estas propiedades la de mayor relevancia para nuestro estudio es su propiedad antitumoral. Se han realizado diversos estudios *in vivo* sobre el efecto de las saponinas en líneas celulares, y se ha comprobado que éstas inhiben el crecimiento de células cancerígenas (tabla 13), mediante la detención del ciclo celular y la inducción a apoptosis, entre otros mecanismos que han no se han podido dilucidar por completo.¹¹⁹⁻¹²²

Tabla 13. Estudios *in vivo* realizados con saponinas en diferentes líneas celulares

Metabolito	Líneas celulares	Efecto
Saponinas triterpénicas	Carcinoma de próstata LNCaP	Inhibe el crecimiento y la proliferación celular, actividad antitumoral. ^{123,124}
Saponinas triterpénicas	J774, HeK-293 y WEHI-164	Inhibe la proliferación celular. ¹²⁵
Saponinas triterpénicas	Células humanas de leucemina T.	Actividad citotóxica. ¹²²⁶
Saponinas triterpénicas	Melanoma metastático humano, carcinoma epidermoide humano	Inhibe el crecimiento de células tumorales. ¹²⁷
Saponinas triterpénicas	Células tumorales de colon	Actividad citotóxica. ¹²⁸
Saponinas triterpénicas	Fibrosarcoma humano HT-1080	Actividad citotóxica. ¹²⁹
Saponinas triterpénicas	Cáncer ovario A2780	Actividad citotóxica. ¹³⁰

Por último, también se identificó la presencia de esteroides y triterpenos libres, la presencia de éstos metabolitos secundarios se encuentra reportado para la familia Boraginaceae^{87,98,118}. Los esteroides y triterpenos son reconocidos por poseer propiedades como: antihipertensivas, antiinflamatorias y anticancerígenas. De acuerdo a



diversos estudios realizados, se ha descubierto que este tipo de metabolito puede suprimir el factor NF- κ B, el cual es encargado de regular la patogénesis de las enfermedades inflamatorias y cáncer. Los terpenoides presentan actividades anticancerígenas, ya que son capaces de inhibir la proliferación celular e inducen a la apoptosis de diferentes tipos de cáncer.^{67, 131-135}

Es importante mencionar que en la familia Boraginaceae especialmente en el género *Heliotropium* se ha detectado la presencia de ácido rosmarínico, el cual tiene una gran cantidad de actividades biológicas entre las que destacan su efecto antiviral, bactericida, antiinflamatorio y antioxidante. Este compuesto es capaz de atraer RL, y eliminarlos con gran facilidad, por lo que se sugiere que se profundice su estudio en esta planta, ya que este podría ser uno de los componentes que le confieren el efecto antioxidante a dicha especie.^{136,137}

Efecto de los extractos hidroalcohólico y acuoso de *Heliotropium angiospermum* sobre los niveles de NO

La sobreproducción de RL se ha relacionado en la patogénesis de diversas enfermedades entre las que se encuentra el cáncer, el cual se caracteriza por un estrés oxidativo persistente que provoca un desbalance en los sistemas antioxidantes de nuestro cuerpo, por esta razón en los últimos años ha existido un creciente interés en realizar estudios con agentes antioxidantes extraídos de plantas con el fin de producir fármacos con actividad anticancerígena.

Dentro de las especies reactivas de nitrógeno más importantes se encuentra el óxido nítrico, el cual tiene participación en diversos procesos inflamatorios como artritis, colitis y carcinomas. El NO tiene como representante más importante y estable a los nitritos¹³⁸, en procesos normales las concentraciones de éste en los sistemas biológicos se encuentran estables, sin embargo cuando un sistema se encuentra bajo un proceso carcinogénico encontramos un incremento de estos metabolitos.

Para tener control de estas especies reactivas nuestro organismo cuenta con diversos mecanismos antioxidantes, éstos pueden ser de origen endógeno y exógeno; de forma interna contamos con sistemas antioxidantes como la superóxidodismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa, de forma externa se pueden obtener por medio de la dieta consumida.

Cuando estos mecanismos antioxidantes son rebasados por la alta concentración de RL, se genera un desequilibrio en donde el proceso de detoxificación celular es ineficiente. Para evaluar el impacto de estas moléculas reactivas presentes en el organismo, existen diversos marcadores específicos, tal es el caso de la concentración de nitritos en plasma



sanguíneo, ya que se ha demostrado que la actividad de estos metabolitos se ve afectada con la exposición de compuestos que alteren su producción; un ejemplo de lo antes mencionado es el aumento de los niveles de nitritos a través de un proceso carcinogénico inducido por la administración de óxido de níquel.^{139,140} Estos niveles pueden ser disminuidos con la aplicación de diversos extractos de plantas, tal es el caso de la especie vegetal *Heliotropium angiospermum*, que muestra una reducción significativa en los niveles de nitritos en plasma sanguíneo de ratones hembra de la cepa CD-1 con la aplicación de extractos hidroalcohólicos de hoja 10 mg/mL y tallo 5 mg/mL, y los extractos acuosos de hoja 5mg/mL y tallo de 5mg/mL y 10mg/mL (Gráfica 3). Esta reducción se debe a la acción de metabolitos secundarios como los flavonoides, que son excelentes antioxidantes, ya que presentan grupos fenólicos capaces de captar hierro y otros metales de transición, los glicósidos cardiotónicos que han demostrado su eficacia sobre células cancerosas, las saponinas que inhiben el crecimiento de células cancerígenas y los esteroides y triterpenos libres inducen apoptosis en diferentes tipos de cáncer, por lo que se puede concluir que esta especie vegetal presenta un efecto regulador contra la generación de especies reactivas de nitrógeno.

Efecto de los extractos hidroalcohólico y acuoso de *Heliotropium angiospermum* en la actividad de la catalasa

Durante los procesos biológicos y en el constante intercambio con el medio, se generan especies químicas conocidas como RL, a pequeñas concentraciones pueden regular diversos procesos de señalización celular y defensa inmune. Sin embargo, altas concentraciones de estas moléculas dan lugar a estrés oxidativo¹⁴¹.

Una de las consecuencias del estrés oxidativo es la peroxidación lipídica, cuya prevención es esencial en todos los organismos aerobios, ya que los productos derivados de este proceso pueden interactuar con el ADN y son potencialmente mutágenos. Para contrarrestar los efectos que pueden tener las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, en el organismo existe una gran variedad de sistemas de defensa antioxidante tanto enzimáticos como no enzimáticos, que funcionan sinérgicamente y protegen al organismo de los riesgos que conlleva el estrés oxidativo¹⁴².

Dentro de los sistemas enzimáticos se destaca la participación de la enzima catalasa, esta es una de las enzimas más abundantes en la naturaleza y se encuentra ampliamente distribuida en el organismo humano, gracias a sus propiedades ha sido estudiada ampliamente en numerosos procesos patológicos.

Tomando en cuenta lo anterior el presente estudio se enfocó en evaluar la actividad de la enzima catalasa en plasma sanguíneo de ratones hembras de la cepa CD-1, los resultados



obtenidos muestran una estimulación en el sistema antioxidante de catalasa (Gráfica 4). Esta actividad antioxidante se puede atribuir a la estimulación de la enzima catalasa por medio de los metabolitos secundarios como flavonoides, saponinas y esteroides y triterpenos libres presentes en esta especie vegetal, ocasionando un efecto sinérgico el cual les confieren un efecto protector frente a fenómenos de daño oxidativo.

Actualmente se busca nuevos tratamientos contra la lucha del cáncer, por lo que una excelente alternativa es la búsqueda de productos naturales que puedan atacar blancos específicos, sin ninguna reacción adversa, por ello es que la presente investigación de *Heliotropium angiospermum*, servirá para futuros ensayos como agente anticancerígeno.



X. Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio se puede concluir:

- Respecto al estudio etnofarmacológico las estructuras más utilizadas en la comunidad de Limón Chiquito son la hoja, el tallo y toda la planta.
- En relación al estudio fitoquímico se encontró que los metabolitos secundarios más abundantes en la especie vegetal *Heliotropium angiospermum*, son los glicósidos cardiotónicos, alcaloides, cumarinas, flavonoides y saponinas.
- La concentración de nitritos en plasma de ratones que tienen un proceso de carcinogénesis se vio disminuida con la aplicación de los extractos hidroalcohólico de hoja 10 mg/mL y tallo 5 mg/mL, y los extractos acuosos de hoja 5mg/mL y tallo de 5mg/mL y 10mg/mL.
- Por último, se observó incremento en la actividad de la enzima catalasa, por lo que se puede concluir que los extractos de tallo y hoja aplicados presentan un efecto antioxidante.



XI. Referencias

- 1.- Duno R., (Sin fecha), Radicales libres y antioxidantes. Programa de educación para la salud, Universidad de los Andes.
- 2.- Korc I., Bidegain M., Martell M., 1995, Radicales libre. Bioquímica y sistemas antioxidantes Implicancia en la patología neonatal. Rev Med Uruguay; (11): 121-135
- 3.- Maldonado O., Jiménez E., Bernabé R., Ceballos G., y Méndez E., 2010. Radicales libres y su papel en enfermedades crónico-degenerativas. Rev Med UV; (2): 33-39.
- 4.-Romero Alvira D., Bueno Gómez J., 1998. Radicales libres del oxígeno y antioxidantes en medicina. Rev Clin Española; (7):345-346.
- 5.- Valko M., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int. J. of Bio. Cell. Biol.; (1): 44-84.
- 6.- Venereo Justo R., 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Rev. Cubana Med Milit; (2):126-33.
- 7.- Kodjikian L., Roy P., Rouberol F., Garweg J., Chauvel P., Manon L., Jean B., Little E., Sasco A., Grange J., 2004. Survival after proton-beam irradiation of uveal melanomas. Am J Ophthalmol; (6): 1002-1010.
- 8.- Valko M., Rhodes C., Moncol J., Izakovic M., Mazur M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem Biol Interactions; (1): 1-40.
- 9.- Cavia M., López A., Hernando B., López AS., García C., Coma M., Muñiz P., 2007. Estado redox celular y cáncer. Influencia sobre el tratamiento con citostáticos. Electron J Biomed; 2: 51-45
- 10.- Barja G., 1997. Radicales libres y antioxidantes. En: Cascales M. Bioquímica y Fisiopatología del Estrés Oxidativo. Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia; 21-44
- 11.- Céspedes T., Sánchez D., 2000. Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación. Rev. Cubana Cardiol; (1): 55-60.
- 12.- Saéz G., (sin fecha). Biopatología de los radicales libres en Monografía XVIII. Mecanismos moleculares y neuroendocrinos del balance energético: Patologías; Real Academia Nacional de Farmacia, España.
13. Roca J., Paredes F., 2002. Influencia de los radicales libres en el envejecimiento celular OFFARM; (21): 96-100



14. Gutiérrez J., 2006. ¿Qué sabe usted acerca de... radicales libres? *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*; (4): 69-73.
- 15.- Martínez C., Rugerio C., Selva A., 2003. Estrés oxidativo y neurodegeneración *Rev. Fac. Med. UNAM*; (6): 230-235.
- 16.-Vicario IM., 1996. Peroxidación lipídica, antioxidantes de la dieta y enfermedad cardiovascular. *Nutr Clin*; (16): 19-28.
- 17.- Halliwell B., y Gutteridge J., 1990. *Antioxidants of human extracellular fluids*. *Arch Biochem Biophys*; (280): 18.
- 18.- Halliwell B., 1997. *Antioxidants and human disease: A general introduction*. *Nutr Rev.*; (Suppl. 1): 44-52.
- 19.- Vargas F., Rivas C., Nursamaa A., Zoltan T., 2007. Reacciones de radicales libres con relevancia biológica en la teoría del envejecimiento. *Avances en Química*; (2): 3-15.
- 20.- Rodríguez P., 2009. Formación de especies reactivas de oxígeno por interferencia en la expresión de la glutamato- cisteína ligasa [tesis de maestría], Universidad de Salamanca, España
21. Cárdenas N., Chaverri J., 2006. Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación Química*; (2):164-173.
- 22.- Marotte C., Zeni S., 2013. Bioquímica Clínica Actualización Especies reactivas de oxígeno y su efecto sobre la actividad de las células óseas. *Acta Bioquím. Clín. Latinoamérica*; (4): 661-74.
23. Bravo M., Ortega A., 1998. Radicales libres e inflamación *Gaceta de Ciencias Veterinarias*; (2): 31-40.
- 24.- Hernández B., 2003. Mecanismo de acción del óxido nítrico en el organismo y su acción como agente terapéutico *Revista mexicana de enfermería cardiológica*; (2): 72-76.
- 25.- Díaz R., Medrano S., Huerta de Mora O., Huerta A., 2000. Óxido nítrico: la diversidad de sus efectos sistémicos *Rev Cient Cienc Méd*; (1) Cochabamba.
- 26.- Benavides M., Pinzón A., 2008. Óxido nítrico: implicaciones fisiopatológicas *Rev. colomb. Anestesiol*; (1): 45-52.



- 27.- Jaruga P., Dizdaroglu M., 1996. Repair of products of oxidative ADN base damage in human cells. *Nucleic Acids Res*; (24): 1389-94.
- 28.- Zorilla A., Eirez-Izquierdo., Izquierdo M., 2004. Papel de los radicales libres sobre el ADN: carcinogénesis y terapia antioxidante *Rev Cubana Invest Bioméd*; (1): 51-57.
- 29.- Dreher D., Junod AF., 1996. Role of oxygen free radicals in cancer development. *Europ J Canc*; (324): 30-38.
- 30.- Ahmed MI., Fayed ST., Hossein H., Tash FM., 1999. Lipid peroxidation and antioxidant status in human cervical carcinoma. *Dis Markers*; (15): 283-291.
- 31.- Lelkes PI., Hahn KL., Sukovich DA., Karniol S., Schmidt DH., 1998. On the possible role of reactive oxygen species in angiogenesis. *Adv Exp Med Biol*; (454): 295-310.
- 32.- 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. 2006. *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.*; (1):R12.
33. Oliva M., Ripoll F., Muniz P., Iradi A., Trullenque R., Valls Y., 1997. Genetic alterations and oxidative metabolism in sporadic colorectal tumors from a Spanish community. *Molecular Carcinogen*; (1): 232-43.
- 34.- Feig D., Reid T., Loeb L., 1994. Reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Res.*; (54): 890-894.
- 35.- Lin J., Wang J., Jiann B., Yu C., Tsai J., Huang J., Wu T., 2005. Correlation of p53 protein accumulation and Bcl-2 overexpression with histopathological features in prostatic cancer. *J Formos Med Assoc.*; (11): 864-867.
- 36.- Kim M., Cho H., Jung M, Hong M., Lee S., Shin B., Ahn B., Jung Y., 2005. 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.*; (6): 1669-74.



- 37.- Sun Y., 1990. Free radicals, antioxidant enzymes and carcinogenesis. *Free Rad Biol Med.*; (8): 583-599.
- 38.- Sanchez M., Torres J., Tormos C., Iradi A., Oliva M., Muniz P., 2006. Impairment of antioxidant enzymes, lipid peroxidation and 8-oxo-2-deoxyguanosine in advanced epithelial ovarian carcinoma of a spanish community. *Cancer Lett.*; (1): 28-35.
- 39.- Paniagua M., Prieto B., Contreras R., 2004. El envejecimiento y los radicales libres *CIENCIAS*; (75): 36-43.
- 40.- Sugadev R., Ponnuswamy M., Sekar K., 2011. Structural analysis of NADPH depleted bovine liver catalase and its inhibitor complexes. *Int J Biochem Mol Biol.*; (1): 67-77.
- 41.- Díaz A., 2003. La estructura de las catalasas *REB*; (2): 76-84.
- 42.- López A., Carlos Fernando A., Zelmira Lazarova, Rómulo Bañuelos V., Sergio Hugo Sánchez R., (2012) Antioxidantes, un paradigma en el tratamiento de enfermedades *Rev. ANACEM*; (1): 48-53
43. Cortés R., Rodríguez O., 2011. Importance of oxidative damage on the electron transport chain for the rational use of mitochondria-targeted antioxidants. *Mini Rev Med*; (7): 625-32.
- 44.- Núñez A., 2011. Terapia antioxidante, estrés oxidativo y productos antioxidantes: retos y oportunidades. *Rev Cubana Salud Pública*; (5): 644-660.
- 45.- Castañeda C., Ramos E., Ibáñez V., 2008. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas *Revista Horizonte Médico* ; (1): 56-72.
- 46.- Judd, W., Campbell C., Kellogg A., Stevens F., Donoghue M., 2008. *Plant Systematics: A phylogenetic approach*. 3rd Edition. Sinauer, Sunderland, Mass.
- 47.- Rabaey D., Lens F., Smets E., Jansen S., 2010. The phylogenetic significance of vestured pits in Boraginaceae. *Taxon*; (2): 510-516.
- 48.- Smith N., Mori S.A., Henderson A., Stevenson D.W., Heald S.V., 2004. *Flowering Plants of the Neotropics*. The New York Botanical Garden, Princeton University Press, New Jersey, USA.
- 49.-Duno de Stefano R., 2010. *Heliotropium angiospermum*. Flora de la Península de Yucatán, en línea (consultado 10/03/2015).
- 50.- Martínez M., 1979. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica, México, D.F.



- 51.- Miller J., 2009. *Heliotropium*. En: Flora de Nicaragua, versión en línea (consultado 10/03/2015).
- 52.- Nash D. y Moreno N., 1981. Boraginaceae (II) En: Sosa, V. (ed.). Flora de Veracruz. Fascículo 18. Instituto de Ecología. Xalapa, Veracruz, México.
- 53.- BDMTM., 2014. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Biblioteca de la medicina tradicional mexicana. Cola de alacrán. Disponible en:<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7164>, Consultada el 22 de enero del 2015.
- 54.- CONABIO., 2009. Catálogo taxonómico de especies de México. 1. en Capital Nat. México. CONABIO, México.
- 55.- Birecka H., Birecki M., FrohlichSource M., 1987. Evidence for Arginine as the Endogenous Precursor of Necines in *Heliotropium*, Plant Physiology; (1): 42-46.
- 56.- Erosa G., Peña L., Sterner O., 2009 Secondary Metabolites from *Heliotropium angiospermum*, J. Mex. Chem. Soc.; (2): 44-47.
- 57.- Chataing B. 2004. Las actividades biológicas de compuestos naturales purificados de plantas venezolanas (tesis de posgrado). Universidad de los Andes. Venezuela.
- 58.-Almaraz N., Ávila J., Delgado E., Naranjo N., Herrera J., 2006. El metabolismo secundario de las plantas, un nuevo concepto, Repositorio digital institucional IPN.
- 59.- Ávalos A., Pérez E., 2009. Metabolismo secundario de plantas, Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal; (3): 119-145.
- 60.- Jiménez G., Porta H., Rocha M., 2003. La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas Revista Mexicana de Fitopatología; (3): 355-363.
- 61.- Arango G., 2008. Alcaloides y compuestos nitrogenados Universidad de Antioquia Medellín.
- 62.- Flórez S., González J., Culebras J., Tuñón J., 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes Nutr. Hosp.; (6): 271-278.
- 63.- Cartaya, O., Inés R., 2001. Flavonoides: Características químicas y aplicaciones Cultivos Tropicales, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas; (2): 5-14.



64. Escamilla C., Cuevas E., Guevara J., 2009. Flavonoides y sus acciones antioxidantes Rev Fac Med UNAM; (2): 73-75.
65. Quiñones M., Miguel M., Aleixandre A., 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. Rev. Nutr. Hosp.; (1): 76-89.
66. Luis D.A., Aller R., 2008. Papel de los flavonoides del té en la protección cardiovascular. An. Med. Interna (Madrid); (3): 105-107.
67. Martino V., 2000. Los flavonoides como promisorios agentes preventivos y terapéuticos Acta Farnz. Bonaerense; (4): 303-308.
- 68.- Pharma Editores, 2015. Guía de Prescripción Terapéutica 2015, Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios Fecha de última actualización: 18 de junio de 2008 consultado en línea el 15/marzo/ 2015 disponible en: <http://www.imedicinas.com/GPTage/Open.php?Y2EwMnNlMDFzYjAx>
- 69.- Martínez A., 2002 Esteroides cardiotónicos Universidad de Antioquia, Medellín.
- 70.- Luck de Ugaz O. 2001. Capitulo IV: Análisis fitoquímico y metabolitos secundarios en: Manual de fitoterapia. Organización Panamericana de la Salud, Lima Perú.
- 71.- Domínguez S. J. A., 1979. Métodos de investigación fitoquímica. Editorial Limusa. México.
- 72.- Kuklinski C. 2003. Farmacognosia, Ediciones Omega, Barcelona.
- 73.- Bruneton J. Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas medicinales. Editorial Acribia, S.A., 2001, p: 775-823.
- 74.- Prácticas de laboratorio de farmacia curso 2012-13, Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla.
- 75.- Toso R., Skliar M., 2002. Aislamiento, Identificación y Cuantificación de Compuestos con Actividad Gastroprotectora presentes en *Centaurea solstitialis*. Ciencia Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias. U.N.L. Pam.



- 76.- Lock O., Cabello I., Doroteo V., 2006. Práctica: análisis de flavonoides en plantas, Pontificia Universidad Católica del Perú; Departamento de Ciencias, Lima, Perú.
- 77.- Ortíz, A., Castillo R., y Beausoleil I. 1995. *Carcinogénesis por óxido de níquel en 2 líneas de ratones consanguíneas*. Revista Cubana de Oncología, Enero-junio.
- 78.- Adarmes H., Solís JP., Müller A., Galleguillos M., 2009. Determinación de nitrito como metabolito estable del óxido nítrico en el líquido sinovial de articulación metacarpofalángica equina, Arch Med Vet (3): 255-259.
- 79.- Chance B., Machley A., 1954. *Assay of catalases and peroxidases*. Methods in Enzymology; 2: 764-75.
- 80.- Ávila A., 2012. Optimización, escalamiento y diseño de una planta piloto de extracción sólido líquido [tesis de licenciatura], Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Químicas.
- 81.- Molina Y. (sin fecha). Estudio etnobotánico y etnofarmacológico de plantas medicinales de Tambopata, Madre de Dios, Perú. Revista Mundo Natural. Disponible en línea en: http://www.uap.edu.pe/Investigaciones/Esp/Revista_14_Esp_07.pdf. Consultada el 11 de marzo del 2015.
- 82.- Baca D., Ramírez H., 2008. Estudio etnobotánico y etnofarmacológico de especies vegetales de interés medicinal y análisis fitoquímico cualitativo de las especies más representativas de la comunidad nativa de Santa Rosa de Huacharí, distrito de Kósñipata, Cusco. [Tesis de pregrado.] Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, Perú.
- 83.- Schlaepfer L., Mendoza J., 2010. Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas; (4): 18-27.
- 84.- Rivas C., Verde J., Cruz D., Barrón P., Rivas M. C., Oranday A., 2013. Actividad biológica de extractos metanólicos de *Heliotropium amplexicaule* Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas; (3): 19-23.
- 85.- Li L., Li M., Xu L., Guo N., Wu-Lan T., Shi R., 2010. Distribution of seven polyphenols in several medicinal plants of Boraginaceae in China. Journal of Medicinal Plants Research; (12):1216-21.



- 86.- Oluwatoyin S., Illeogbulam N., Joseph A., 2011. Phytochemical and antimicrobial studies on the aerial parts of *Heliotropium indicum* Linn. *Annals of Biological Research.*; (2): 129-136.
- 87.- Espitia J., Robledo S., Cuadrado S., Duran H., Gómez H., 2014. Perfil fitoquímico, actividad anti-Leishmania, hemolítica y toxicológica de *Cordia dentata* Poir. y *Heliotropium indicum* L. *Rev Cubana Plant Med*; (3): 208-224.
- 88.- Puertas M., Zuleta J., Rivera F., 2012. Capacidad antioxidante *in vitro* de comfrey (*Symphytum officinale* L.) *Revista Cubana de Plantas Medicinales*; (1): 30-36.
- 89.- Álvarez E., Orallo F., 2003. Actividad biológica de los flavonoides (I). Acción frente al cáncer, *OFFARM*; (10): 130-140.
- 90.- Yang K., Lamprecht S., Liu Y., Shinozaki H., Fan K., Leung D., Newmark H., Steele V., Kelloff G., Lipkin M., Chemoprevention studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethane-treated mouse colon. *Carcinogenesis*; (9): 1655- 1660.
- 91.- Geleijnse J., Launer L., Van der Kuip D., Hofman A., y Witteman J., 2002. Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam study, *Am J Clin Nutr*; (5): 880-886.
- 92.- Pace C., Hahn S., Diamandis E., Soleas G., y Goldberg D., 1995. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation in eicosanoid synthesis: implication for protection against coronary heart disease. *Clin Chim Acta*; (2): 207- 219.
- 93.- Vicente L., Prieto M., Morales A., 2013. Eficacia y seguridad de la quercetina como complemento alimenticio, *Revista de Toxicología*; (2): 171-181.
- 94.- Barrio J., Marina R., Costilla S., Rodríguez J., Fernández C., Ferreras M., González P., 2013. Estudio experimental sobre los efectos de la quercetina en la disfunción orgánica y cognitiva originada por radiación ionizante, *Trauma Fund MAPFRE*; (1): 24-32.
- 95.- Gallego J., 2009. Efecto de la quercetina y la rutina frente al daño oxidativo inducido en eritrocitos con distintos contenidos de colesterol [tesis doctoral], Universidad de Salamanca, España.



- 96.- Sanchez P., Lopez F., Perez F., Morales A., Lopez J., 2011. Quercetin reduces cisplatin nephrotoxicity in rats without compromising its anti-tumour activity, *Nephrol Dial Transplant*; (11): 3484-3495.
- 97.- Filho AW., Filho VC., Olinger L., De Souza M., 2008. Quercetin: further investigation of its antinociceptive properties and mechanisms of action. *Arch Pharm Res*; (6): 713-721.
- 98.- Beltrán C., Díaz F., Gómez H., 2013. Tamizaje fitoquímico preliminar de especies de plantas promisorias de la costa atlántica colombiana, *Rev Cubana Plant Med*; (4): 619-631.
- 99.- Prassas I., Eleftherios P., 2008. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides, *Nature Reviews Drug Discovery*; (11): 926-935.
- 100.- Bielawski K., Winnicka K., Bielawska, A., 2006. Inhibition of DNA topoisomerases I and II, and growth inhibition of breast cancer MCF-7 cells by ouabain, digoxin and proscillaridin A. *Biol. Pharm. Bull.*; (7): 1493–1497.
- 101.- Lopez M., Pastor N., Azrak S., Ayuso M., Austin C., Cortés F., 2005. Digitoxin inhibits the growth of cancer cell lines at concentrations commonly found in cardiac patients. *J. Nat. Prod.*; (11): 1642–1645.
- 102- McConkey D., Lin Y., Nutt K., Ozel H., Newman, R., 2000. Cardiac glycosides stimulate Ca²⁺ increases and apoptosis in androgen-independent, metastatic human prostate adenocarcinoma cells. *Cancer Res.*; (14): 3807–3812.
- 103- Huang, Y., Chueh S., Teng C., Guh, J., 2004. Investigation of ouabain-induced anticancer effect in human androgen-independent prostate cancer PC-3 cells. *Biochem. Pharmacol.*; (4): 727–733.
- 104.- Yeh, J., Huang, W., Kan, S., Wang, P., 2003. Effects of bufalin and cinobufagin on the proliferation of androgen dependent and independent prostate cancer cells. *Prostate*; (2): 112–124.
- 105.- Newman R., Yang P., Hittelman W., Lu T., Ho D., Ni D., Chan D., Vijjeswarapu M., Cartwright C., Dixon S., Felix E., Addington C., 2006. Oleandrin-mediated oxidative stress in human melanoma cells. *J. Exp. Ther. Oncol.*; (3): 167–181.



- 106.- Mijatovic T., Mathieu V., Gaussin J., De Nève N., Ribaucour F., Van Quaquebeke F., Dumont P., Darro F., Kiss R., 2006. Cardenolide-induced lysosomal membrane permeabilization demonstrates therapeutic benefits in experimental human non-small cell lung cancers. *Neoplasia*; (5): 402–412.
- 107.- Mijatovic T., Op De Beeck A., Van Quaquebeke E., Dewelle J., Darro F., De Launoit Y., Kiss R., 2006. The cardenolide UNBS1450 is able to deactivate nuclear factor kappa B-mediated cytoprotective effects in human non-small cell lung cancer cells. *Mol. Cancer Ther.*; (2): 391–399 (2006).
- 108.- Frese S., Frese-Schaper M., Andres A., Miescher D., Zumkehr B., Schmid R., 2006. Cardiac glycosides initiate Apo2L/ TRAIL-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells by up-regulation of death receptors 4 and 5. *Cancer Res.*; (11): 5867–5874.
- 109.- Johansson S., Lindholm P., Gullbo J., Larsson R., Bohlin L., Claeson P., 2001. Cytotoxicity of digitoxin and related cardiac glycosides in human tumor cells. *Anticancer Drugs*; (5): 475–483.
- 110.- Masuda Y., Kawazoe N., Nakajo S., Yoshida T., Kuroiwa Y., Nakaya K., 1995. Bufalin induces apoptosis and influences the expression of apoptosis-related genes in human leukemia cells. *Leuk. Res.*; (8): 549–556.
- 111.- Jing Y., Ohizumi H., Kawazoe N., Hashimoto S., Masuda Y., Nakajo S., Yoshida T., Kuroiwa Y., Nakaya K., 1994. Selective inhibitory effect of bufalin on growth of human tumor cells in vitro: association with the induction of apoptosis in leukemia HL-60 cells. *Jpn. J. Cancer Res.*; (6): 645–651.
- 112.- Kawazoe N., Watabe M., Masuda Y., Nakajo S., Nakaya K., 1999. Tiam1 is involved in the regulation of bufalin-induced apoptosis in human leukemia cells. *Oncogene*; (15): 2413–2421.
113. Watabe M., Kawazoe N., Masuda Y., Nakajo S., Nakaya K., 1997. Bcl-2 protein inhibits bufalin-induced apoptosis through inhibition of mitogen-activated protein kinase activation in human leukemia U937 cells. *Cancer Res.*; (15): 3097–3100.
- 114.- Kulikov A., Eva A., Kirch U., Boldyrev A., ScheinerBobis, G., 2007, Ouabain activates signaling pathways associated with cell death in human neuroblastoma. *Biochim. Biophys. Acta* 1768; (7): 1691–1702.



- 115.- Raghavendra P., Sreenivasan Y., Ramesh G., Manna S., 2007. Cardiac glycoside induces cell death via FasL by activating calcineurin and NF-AT, but apoptosis initially proceeds through activation of caspases. *Apoptosis*; (2): 307–318.
- 116.- Newman RA., Kondo Y., Yokoyama T., Dixon S., Cartwright C., Chan D., Johansen M., Yang P., 2007. Autophagic cell death of human pancreatic tumor cells mediated by oleandrin, a lipid-soluble cardiac glycoside. *Integr. Cancer Ther.*; (4): 354–364.
- 117.- Villarroel L., Torres R., Urzúa A., Reina M., Cabrera R., González A., 2001. *Heliotropium Huascoense* resin exudate: chemical constituents and defensive properties. *Nat Prod.*; (9):1123-1126.
- 118.- Bolivar K., Sanabria M., Rodríguez D., Camacaro M., Ulacio D., Cumana L., Crescente O., 2009. Potencial efecto fungicida de extractos vegetales en el desarrollo in vitro del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. y de la antracnosis en frutos de mango *Revista UDO Agrícola*; (1): 175-181.
- 119.- Díaz S., 2006. Evaluación de la actividad citotóxica de extractos y fracciones de *Isertia laevis* empleando líneas celulares derivadas de tumores humanos, [tesis de licenciatura], Pontificia Universidad Javeriana, Bogota
- 120.- Cabrera J., 2005. Actividad biológica de extractos de plantas usadas para el tratamiento del cáncer e infecciones en Tepatepec, Hidalgo, [tesis de licenciatura] Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.
- 121.- Alonso S., 2009. Producción de saponinas triterpénicas en cultivos *in vitro* de *Centella asiatica* [tesis de licenciatura] Universidad de Barcelona, España.
- 122.- Francis G., Kerem Z., Harinder P., Becker K., 2002. The biological action of saponins in animal systems: a review *British Journal of Nutrition*; (6): 587–605.
- 123.- Liu W., Xu S., Che T., 2000. Anti-proliferative effect of ginseng saponins on human prostate cancer cell line, (11): 1297–1306.
- 124.- Hyun-Sook K., Eun-Hee L., Sung-Ryong K., Kang-Ju C., Jong-Hee P., Dong-Soon I., 2004. Effects of ginsenosides Rg₃ and Rh₂ on the proliferation of prostate cancer cells; (4): 429-435.



- 125.- De Tommasi N., Autore G., Bellino A., Pinto A., Pizza C., Sorrentino R., Venturella P., 2000. Antiproliferative triterpene saponins from *Trevesia palmata*, J Nat Prod.; (3): 308-14.
- 126.- Mujoo K., Haridas V., Hoffmann J., Wachter G., Hutter L., Lu Y., Blake M., Jayatilake G., Bailey D., Mills G., Gutterman J., 2001. Triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Benth) decrease tumor cell proliferation and induce apoptosis. Cancer Research; (14): 5486–5490.
- 127.- Dzhambazov B., Daskalova S., Monteveva A., Popov N., 2002. *In vitro* screening for antitumour activity of *Clinopodium vulgare* L. (Lamiaceae) extracts. Biol Pharm Bull; (4):499-504.
- 128.- Gaidi G., Correia M., Chauffert B., Beltramo J., Wagner H., Lacaille-Dubois M., 2002. Saponins-mediated potentiation of cisplatin accumulation and cytotoxicity in human colon cancer cells. Planta Med.; (1): 70-72.
- 129.- Tezuka Y., Honda K., Banskota A., Thet M., Kadota S., Kinmoonosides A., 2000. Three new cytotoxic saponins from the fruits of *Acacia concinna*, a medicinal plant collected in myanmar. J Nat Prod.; (12): 1658-1664.
- 130.- Seo Y., Berger J., Hoch J., Neddermann K., Bursucker I., Mamber S., Kingston D. 2002. A new triterpene saponin from *Pittosporum viridiflorum* from the Madagascar rainforest J Nat Prod.; (1): 65-68.
- 131.- Ríos J., 2008. *Ganoderma lucidum*, un hongo con propiedades inmunoestimulantes Revista de fitoterapia; (2): 135-146.
- 132.-Müller C., Kumagai T., O'Kelly J., Seeram N., Heber D., Koeffler H., 2006. *Ganoderma lucidum* causes apoptosis in leukemia, lymphoma and multiple myeloma cells. Leuk Res; (7): 841-848
- 133.- Silva D. 2006 *Ganoderma lucidum* in a cancer research. Leuk Res; (7): 767-768
- 134.- Salminen A., Lehtonen M., Suuronen T., Kaarniranta K., Huuskonen J., 2008. Terpenoids: natural inhibitors of NF-kappaB signaling with anti-inflammatory and anticancer potential, Cell Mol Life Sci.; (19): 2979-2999.



135.- Muñoz I., 2011 Evaluación de los contenidos metabólicos en cultivos de células de *Petiveria alliacea* L. (ANAMÚ) [Tesis de maestría], Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias, Medellín, Colombia.

136.- Meneses F., 2005. La familia Boraginaceae en el departamento de Santander-Colombia [tesis de licenciatura], Facultad de Ciencias Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga.

137.- Rivas C., 2010. Estudio de la actividad biológica de los extractos de tres plantas de la familia Boraginaceae [tesis doctoral], Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, México.

138.- Muñoz R., Vargas F., Bobadilla N., 2003. Valoración de un método para determinar nitritos y nitratos en muestras biológicas, *Rev Invest Clin*; (6): 670-676.

139.- Costa M., Davidson T., Chen H., Ke Q., Zhang P., Yan Y., Huang C. Kluz T., 2005. Nickel carcinogenesis: Epigenetics and hypoxia signaling. *Mutation Reserch*; (1-2): 78-88.

140.- Sun H., Shamy M., Costa M., 2013. Nickel and Epigenetic Gene Silencing. *Genes (Basel)*; (4): 583–595.

141.- Olalla L., Matés J., 1999. Radicales libres de oxígeno y enzimas antioxidantes. Universidad de Málaga. Encuentros en la Biología, disponible en línea <http://www.encuentros.uma.es/encuentros56/radicales.html>, consultada el 24 de marzo de 2015.

142.- Cespedes E., Hernandez I., Llópez N., 1997. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: II. Catalasa, *Rev Cubana Invest Biomed*; (1): 10-15.



XII. Anexo

12.1 Entrevista etnofarmacológica



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de estudios superiores Zaragoza

Unidad Multidisciplinaria de Investigación, L. 7 P.A Terapia Molecular

ENTREVISTA ETNOFARMACOLÓGICA



No. de entrevista: _____

Fecha: _____

Sexo: _____

Nombre del entrevistado: _____

1.- ¿Qué enfermedades ha padecido y cuales han presentado sus familiares más cercanos?

2.- ¿Qué alimentos consume regularmente?

3.- ¿Con que nombre (s) le 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.- ¿Le advirtieron sobre algún efecto adverso sobre el uso de esta planta?

8.- ¿Qué parte de la planta uso? ¿Tuvo una preparación? ¿Se usa sola o combinada?

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? ¿Con que frecuencia utilizaba la planta?

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: