



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos de *Crotalaria retusa* en un modelo murino de cáncer.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGA

PRESENTA:

Clarisa Estefania Marmolejo Gutiérrez

DIRECTORA DE TESIS

M. en C. Catalina Machuca Rodríguez

CDMX, 2017





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.

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

"ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.**

Comunico a usted que la alumna **MARMOLEJO GUTIÉRREZ CLARISA ESTEFANIA**, con número de cuenta **310151139**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **20 de junio de 2017** a las **17:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE M. en C. CARLOS BAUTISTA REYES

VOCAL M. en C. CATALINA MACHUCA RODRÍGUEZ

SECRETARIO M. en B.R.A. MARÍA JUDITH VILLAVICENCIO MACÍAS

SUPLENTE Q. MARTHA TRINIDAD JULIETA OLIVEROS GARCÍA

SUPLENTE Dr. HUGO LÓPEZ MUÑOZ

El título de la tesis que presenta es: **Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos de *Crotalaria retusa* en un modelo murino de cáncer.**

Opción de titulación: Tesis.

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Ciudad de México, a 17 de mayo de 2017

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR



V.O. BO.

M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

Dedicatorias

Este trabajo, que representa mi esfuerzo está dedicado a mis padres y a mis hermanos.

A mis padres Graciela y David que me han formado como persona, enseñándome los valores que me han traído hasta donde estoy. Son ustedes que con su amor me han guiado por un buen camino, les agradezco muchísimo todos los esfuerzos que hacen por mí y el apoyo que me dan para que yo continúe con este sueño de vida. Siempre recordándome que las cosas más importantes de la vida no se compran, y me siento muy afortunada por formar parte de la familia que ustedes han creado.

A mi hermano David al cual veo como un ejemplo, tú me has enseñado más cosas de las que crees, porque también veo cómo te has esforzado en cada etapa de tu vida para obtener lo que quieres. Muchas gracias por apoyarme y ayudarme a seguir adelante.

A mi hermana Karina, esto también es dedicado para tí, porque tú me enseñas a ser una persona feliz contagiándome con tu alegría. Espero que tomes esto como inspiración, no quiero que te conviertas en alguien como yo, quiero que tomes tu propio camino y que lo tomes con fuerza, no dejes ir tus sueños, yo siempre voy a estar contigo. Gracias hermanita.

A ustedes porque son los pilares de mi vida, gracias a los cuales pude recorrer este camino, que aunque difícil, nunca me han dejado sola. Espero ser una fuente de confianza y apoyo tan grande como la que ustedes son para mí. Los amo.

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México por aceptarme como alumna en aquel momento de la hermosa prepa 3, abriéndome las puertas a nuevas oportunidades y experiencias que he sabido aprovechar para formarme como profesionalista de calidad.

A mi asesora, la M. en C. Catalina Machuca Rodríguez, por abrirme las puertas de su laboratorio y de su proyecto para poder formar parte de él. Con sus enseñanzas, sabiduría, paciencia, tiempo y palabras de aliento me brindó las herramientas necesarias para poder culminar este trabajo.

Al M. en C. Ernesto Mendoza que siempre me apoyó y echó porras, gracias porque no nos dejó rendir en esos momentos de mucho trabajo.

A la comunidad del Ejido de Limón Chiquito, por brindarme su atención para el desarrollo de esta investigación, especialmente a la señora Verónica Ramírez y a Pedro Hernández Ramírez por su disponibilidad y apoyo.

Agradezco a los miembros de mi jurado:

M. en C. Carlos Bautista Reyes, M. en B.R.A. María Judith Villavicencio Macías, Q. Martha Trinidad Julieta Oliveros García, Dr. Hugo López Muñoz, por el tiempo invertido en la revisión de este proyecto, por sus valiosos comentarios y críticas constructivas para hacer de este un mejor trabajo.

A Rossy, Adrián y Axel, amigos con los que compartí experiencias desde que ingresé a la facultad, les agradezco su amistad y compañía cuando se presentaron obstáculos en la carrera y malos momentos entre nosotros que pudimos superar. Les deseo el mejor de los éxitos en su carrera profesional y vida personal.

A Poncho, que nos mostró a todos que no importa que tan adversa sea la situación, seguir adelante depende de ti mismo.

A mí inseparable equipo de laboratorio, Francisco y Eyra, gracias por ayudarme en cada momento del proyecto, por hacer amenos los días de trabajo y por mostrarme que tan nobles pueden llegar a ser las personas.

Al mejor equipo que pude tener durante mis experimentos con ratones: Yaz, Mon, Uri y a los que ya nombre, muchísimas gracias porque a pesar de ser mucho trabajo se dieron tiempo para ayudarme, sin ustedes hubiera tardado años. Gracias.

A Enrique, que fue la persona más receptiva a mis enojos y estrés durante todo el proyecto, pero también a mi alegría y optimismo cuando las cosas salían bien. Te agradezco cada palabra de ánimo, eres una gran fuente de inspiración, éste es un buen día para decirte que te quiero.

Índice

I.	ABREVIATURAS.....	1
II.	RESUMEN	2
III.	MARCO TEÓRICO.....	3
3.1	Cáncer.....	3
3.1.1	Definición	3
3.1.2	Características	3
3.1.3	Epidemiología.....	5
3.2	Cáncer de mama	6
3.2.1	Definición	6
3.2.2	Características	6
3.2.3	Anatomía y fisiología de la glándula mamaria	7
3.2.4	Anatomía patológica	8
3.2.5	Epidemiología y factores de riesgo	9
3.2.6	Terapias aplicadas	10
3.3	Inducción experimental de cáncer	10
3.4	Estrés oxidativo	11
3.4.1	Mecanismos de producción de los radicales libres.....	12
3.4.2	Especies reactivas.....	12
3.4.3	Especies reactivas de Oxígeno	13
3.4.4	Especies reactivas de Nitrógeno	14
3.4.5	Daños por estrés oxidativo.....	15
3.4.6	Radicales libres, sistema inmune y cáncer	17
3.4.7	Papel de los radicales libres en el proceso carcinogénico	18
3.5	Mecanismos antioxidantes	19
3.5.1	Clasificación del sistema de defensa antioxidante.....	20
3.5.2	Catalasa	20
3.5.3	Terapia antioxidante	21
3.6	Etnobotánica	22
3.7	Metabolitos secundarios.....	23

3.7.1	Alcaloides	24
3.7.2	Flavonoides	26
3.7.3	Glicósidos cardiotónicos.....	27
3.7.4	Esteroides.....	28
3.7.5	Polifenoles.....	29
3.7.6	Taninos	30
3.7.7	Saponinas	31
3.7.8	Cumarinas.....	32
3.8	Familia Fabaceae	33
3.8.1	Género <i>Crotalaria</i>	33
3.8.2	Clasificación de <i>Crotalaria retusa</i>	35
3.8.3	Descripción morfológica.....	35
3.8.4	Distribución geográfica y hábitad.....	36
3.8.5	Usos	36
3.9	Estudios de <i>Crotalaria retusa</i>	37
IV.	JUSTIFICACIÓN.....	38
V.	HIPÓTESIS.....	39
VI.	OBJETIVOS	39
6.1	General.....	39
6.2	Particulares.....	39
VII.	MÉTODO.....	40
7.1	Localidad de la colecta	40
7.2	Registro de información etnobotánica	40
7.3	Colecta de la planta.....	40
7.4	Procesamiento del material vegetal	41
7.5	Obtención de extractos.....	41
7.6	Obtención del extracto sólido	41
7.7	Cuantificación de azúcares totales presentes en <i>Crotalaria retusa</i>	41
7.8	Análisis fitoquímico preliminar	42
7.8.1	Alcaloides	42
7.8.2	Flavonoides	43
7.8.3	Glicósidos Cardiotónicos	43

7.8.4	Esteroides	43
7.8.5	Polifenoles	44
7.8.6	Taninos	44
7.8.7	Saponinas	44
7.8.8	Cumarinas.....	44
7.9	Cuantificación de metabolitos secundarios	45
7.10	Inducción del carcinoma y tratamiento a modelos experimentales.....	50
7.11	Obtención de plasma sanguíneo y homogenado de hígado.....	52
7.12	Cuantificación de proteína total por el método de Biuret.....	52
7.13	Cuantificación de nitritos en plasma y homogenado de hígado.....	53
7.14	Actividad enzimática de catalasa por el método de Chance y Machely	53
7.15	Cuantificación de peroxidación lipídica en plasma y homogenado de hígado	54
7.16	Análisis estadístico	54
VIII.	RESULTADOS	55
8.1	Registro de información etnobotánica	55
8.2	Rendimiento de los extractos acuosos e hidroalcohólicos de <i>Crotalaria retusa</i>	55
8.3	Cuantificación de azúcares totales presentes en <i>Crotalaria retusa</i>	56
8.4	Análisis fitoquímico preliminar de los extractos de <i>Crotalaria retusa</i>	57
8.5	Cuantificación de metabolitos secundarios	63
8.6	Seguimiento de la inducción del carcinoma	66
8.7	Actividad enzimática de la catalasa en plasma y homogenado de hígado	68
8.8	Concentración de nitritos en plasma y homogenado de hígado	70
8.9	Cuantificación de peroxidación lipídica en plasma y homogenado de hígado	72
IX.	DISCUSIÓN.....	74
X.	CONCLUSIÓN	83
XI.	REFERENCIAS	84
	ANEXOS	93
1.	Fotografías de formación de tumores.....	93
2.	Revisión a bazo.....	94



I. ABREVIATURAS

- 8-oxo-dG:** 8-oxo-desoxi-guanosina
- AP:** Alcaloide de pirrolizidina
- DHPA:** Deshidropirrolizidina
- DMBA:** 7,12-dimetilbenzo[a]antraceno
- EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético
- ERC:** Especies reactivas de cobre
- ERN:** Especies reactivas de nitrógeno
- ERO:** Especies reactivas de oxígeno
- HAP:** Hidrocarburo aromático policíclico
- MCT:** Monocrotalina
- MDA:** Malondialdehído
- OMS:** Organización Mundial de la Salud
- PVPP:** Polivinilpolipirrolidona
- RIS:** Especies reactivas de hierro
- RL:** Radicales libres
- SOD:** Superóxido dismutasa



II. RESUMEN

El cáncer es un problema de salud pública y es la principal causa de muerte debida a enfermedades no transmisibles en todo el mundo. El cáncer de mama es la primera causa de muerte por neoplasia maligna en la mujer, existen distintos factores de riesgo como los reproductivos, genéticos, nutricionales, el consumo de alcohol, exposición a radiación, fumar, edad, etc., varios de estos factores se encuentran asociados al estrés oxidativo de las células y pueden ser tratados con terapias antioxidantes.

Debido a la necesidad de seguir encontrando alternativas para el tratamiento del cáncer, se han buscado a través de los datos etnobotánicos, plantas medicinales que puedan tener alguna actividad antitumoral, para identificar posteriormente sus sustancias activas.

Crotalaria retusa es una herbácea originaria de África oriental distribuida en las zonas tropicales de todo el mundo, es comúnmente usada como fertilizante orgánico por su fuerte acción contra nematodos, forraje, ornamental y en la medicina popular se usa para tratar infecciones de la piel, infecciones en garganta, analgésico para picaduras de escorpión, etc.

Además de ser utilizada como planta medicinal *Crotalaria retusa* es conocida por su alta toxicidad, lo que ha causado la muerte de distintas especies del ganado, este hecho ha llevado a múltiples investigaciones mediante las cuales ahora se sabe, que el alcaloide monocrotalina es el responsable de la toxicidad de la planta; sin embargo también se ha indicado la producción de otros compuestos fitoquímicos como flavonoides, saponinas y esteroides. Dentro de los ensayos con *Crotalaria retusa* se han considerado técnicas de extracción de la monocrotalina para poder construir extractos no tóxicos que lleven a la formulación de nuevos fármacos.

Con base a esto, el objetivo principal de esta investigación fue evaluar la actividad antioxidante de los extractos de *Crotalaria retusa* en un modelo *in vivo* de cáncer de mama para valorar su potencial como agente antioxidante administrando a diferentes concentraciones el extracto durante 20 días, evaluando la concentración de nitritos, la actividad enzimática de la catalasa y la concentración de Malondialdehído (MDA) en plasma e hígado de ratón.

Los resultados obtenidos demuestran que en condiciones experimentales los extractos acuosos e hidroalcohólicos de *Crotalaria retusa* ejercen un efecto antioxidante disminuyendo la actividad de la catalasa, la concentración de MDA y nitritos en plasma sanguíneo de ratones en los que se indujo cáncer de mama con el reactivo 7,12-dimetilbenzo[a]antraceno (DMBA).

III. MARCO TEÓRICO

3.1 Cáncer

3.1.1 Definición

El cáncer es un conjunto de enfermedades de origen multifactorial (Maldonado, Jiménez, Guapillo, Ceballos y Méndez, 2010) durante el cual una célula normal experimenta una serie progresiva de alteraciones que dan como resultado la adquisición de una capacidad proliferativa excesiva, que no se compensa con la pérdida celular adecuada (Rundhaug y Fischer, 2010), adquiere también la capacidad de elaborar sustancias con actividad biológica nociva, expansión local, potencial metastásico, formación de tumores y destrucción de tejidos adyacentes o a distancia (González et al., 2007).

Estas alteraciones se suceden en etapas:

Iniciación, producida por daño al ADN que conduce a mutaciones genéticas; promoción, etapa en la que se presenta mayor proliferación y alteración del comportamiento celular, y progresión que resulta en cambios genéticos como la pérdida de heterocigosidad y amplificación de genes (Fig. 1) (Rundhaug y Fischer, 2010), lo que finalmente llevara al proceso de metástasis.

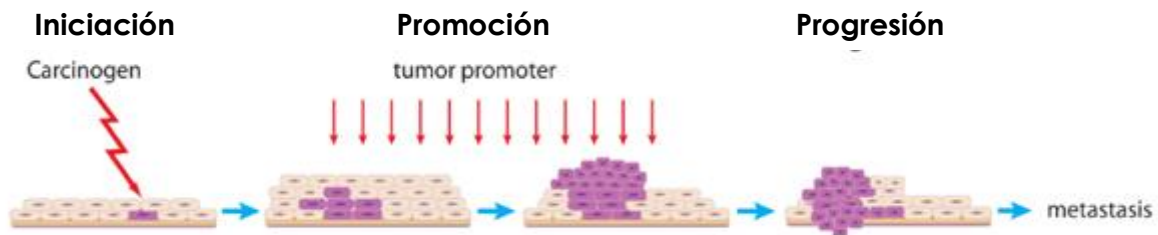


Fig. 1 Modelo de las etapas del proceso de carcinogénesis. Modificado de Rundhaug y Fischer, 2010

Cada etapa transcurre durante un largo periodo, es por esto que existe la posibilidad de intervención o modulación de cada uno de estos pasos con agentes quimiopreventivos (Serrano y Suárez, 2014).

3.1.2 Características

A medida que las células normales evolucionan progresivamente a un estado neoplásico, adquieren una serie de características específicas:

Alteraciones en las señales de crecimiento. Las células tumorales tienen la capacidad de crecer sin estímulo externo, con señales propias de moléculas que facilitan o promueven la proliferación y disminuyen la muerte o apoptosis. Los protooncogenes mutan, se convierten en oncogenes y codifican oncoproteínas que facilitan y estimulan el crecimiento celular.



Pérdida de sensibilidad a las señales inhibitoras del crecimiento. El crecimiento y desarrollo normal dependen de una adecuada regulación entre estímulo y freno de la proliferación celular. En la célula existen programas que regulan negativamente la proliferación celular que dependen de las acciones de los genes supresores de tumores (Monzón, Mora, Torres, Gutiérrez y Rubi, 2011).

Evasión de la apoptosis. La muerte celular, al igual que cualquier proceso metabólico, es un gran programa regulado por vía genética que influye tanto en la supervivencia de la célula como en el control de la proliferación y la diferenciación. La alteración de estímulos pro y antiapoptóticos llevan a la progresión tumoral. El concepto de que la muerte celular programada por apoptosis sirve como una barrera natural para el desarrollo del cáncer ha sido establecido por estudios funcionales convincentes llevados a cabo durante las dos últimas décadas.

Potencial replicativo ilimitado. Tras un número fijo de divisiones, las células normales se detienen en un estado terminal o de quiescencia conocido como senescencia replicativa. Esta fase celular es determinada por el acortamiento de los telómeros en cada división celular que se lleva a cabo hasta el punto en donde no se involucre material genético que codifique para genes relacionados con el funcionamiento celular. Cuando esto sucede se activa la apoptosis celular, lo que se denomina reloj biológico. En el 90% de los tumores estudiados se ha detectado reactivación y aumento en la expresión de la telomerasa, lo que hace que la célula cancerígena pueda replicarse de forma indefinida, éste es posiblemente el rasgo más distintivo de las células cancerosas, pues es necesario para generar tumores macroscópicos.

Angiogénesis. Similar al tejido normal, los tumores necesitan obtener nutrientes y oxígeno, así como eliminar desechos metabólicos y dióxido de carbono. La neovasculatura asociada con el tumor da respuesta a estas necesidades. Por lo tanto, durante la progresión de la neoplasia hay un aumento en la formación de nuevos vasos mediante la producción de factores de crecimiento vasoendotelial que estimulan el crecimiento de los vasos sanguíneos.

Los tumores no pueden aumentar su tamaño más de 1 ó 2 mm de diámetro a menos que estén vascularizados, por esto la angiogénesis es una condición para el crecimiento del tumor y la metástasis.

Invasión y metástasis. La última capacidad que adquieren las células tumorales es la de salir del sitio de origen, migrar y establecerse en otros sitios para generar un nuevo tumor.

El neo primario tiene una población de células heterogéneas con distintas alteraciones genéticas, estas células escapan de una masa primaria, entran en los vasos sanguíneos o linfáticos cercanos y producen un crecimiento secundario en un sitio distante (Hanahan y Weinberg, 2011).

Se han definido las características del cáncer como capacidades funcionales adquiridas que permiten a las células cancerosas sobrevivir, proliferar y diseminarse. Estas funciones se adquieren en diferentes tipos de tumores a través de distintos mecanismos y en diversos momentos durante el curso de la tumorigénesis en sus múltiples etapas, sin embargo, se ha propuesto que otros atributos distintos de las

células cancerosas son funcionalmente importantes para el desarrollo del cáncer y, por lo tanto, podrían agregarse a la lista de características principales (Fig. 2).

Estos atributos son particularmente convincentes. El primero implica una reprogramación del metabolismo de la energía celular con el fin de apoyar el crecimiento y proliferación continuos, reemplazando el programa metabólico que opera en la mayoría de los tejidos normales. El segundo implica la evasión activa por las células cancerosas de ataque y eliminación por las células inmunes, esta capacidad pone en evidencia el papel dicotómico del sistema inmunológico que tanto antagoniza y mejora el desarrollo del tumor y su progresión (Hanahan y Weinberg, 2011).



Fig. 2 Características del cáncer, incluyendo las dos características emergentes (nombradas así debido a que no han sido validadas completamente). Modificado de Hanahan y Weinberg, 2011

3.1.3 Epidemiología

El cáncer es un problema de salud pública y es la principal causa de muerte debida a enfermedades no transmisibles en todo el mundo, tanto en los países desarrollados como en los países en vías de desarrollo (Dornelles, Santos, Oliveira, Goldim y Ashton, 2015).

En 2012 se registraron alrededor de 14 millones de nuevos casos. En 2015, ocasionó 8,8 millones de defunciones. Casi una de cada seis defunciones en el mundo se debe a esta enfermedad.

Cerca del 70% de las muertes por cáncer se registran en países de ingresos medios y bajos. En 2015, sólo el 35% de los países de ingresos bajos informaron que la sanidad



pública contaba con servicios de patología para atender a la población en general.

Más del 90% de los países de ingresos altos ofrecen tratamiento a los enfermos oncológicos, mientras que en los países de ingresos bajos este porcentaje es inferior al 30%.

Se prevé que el número de nuevos casos aumente aproximadamente en un 70% en los próximos 20 años.

En 2013, la Organización Mundial de la Salud (OMS) puso en marcha el “*Plan de acción mundial para la prevención y el control de las enfermedades no transmisibles 2013-2020*”, cuyo objetivo es reducir en un 25% la mortalidad prematura causada por el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, la diabetes y las enfermedades respiratorias crónicas, de aquí a 2025 (OMS, 2017).

3.2 Cáncer de mama

3.2.1 Definición

El término genérico cáncer de mama se refiere a la proliferación neoplásica maligna originada en el compartimiento epitelial ya sea de estructuras ductales o lobulares de la glándula mamaria, siendo más común, el carcinoma ductal (Lanari y Molinolo, 2003). El cáncer de mama afecta principalmente a mujeres, pero los hombres también pueden padecerlo (ACS, 2014). Es el tipo más frecuente de cáncer en las mujeres y la segunda causa de muerte en este grupo de población en todo el mundo (Dornelles et al., 2015).

3.2.2 Características

El cáncer de mama es una enfermedad clínicamente heterogénea en la que los factores genéticos y ambientales contribuyen a su aparición. En un pequeño porcentaje de los casos existe una mutación germinal en un gen de predisposición al cáncer de alta penetrancia, el cual es considerado un factor determinante para la aparición de la enfermedad. El cáncer de mama esporádico, que no es causado por una mutación heredada de alta penetrancia representa más del 90% de los casos de cáncer de mama en todo el mundo (Dornelles et al., 2015).

Se caracteriza por un crecimiento incontrolado de las células que forman el tejido mamario y la mayoría pertenecen al revestimiento interior de los ductos mamarios (Serrano y Suárez, 2014). Aproximadamente 10-15% de los pacientes con cáncer de mama tienen una enfermedad agresiva y desarrollan metástasis a distancia dentro de los 3 años después de la detección inicial del tumor primario. Sin embargo, la manifestación de metástasis en sitios distantes 10 años o más después del diagnóstico inicial tampoco es inusual. En estos pacientes no es el tumor primario, si no su metástasis en sitios distantes lo que causa la muerte (Weigelt, Peterse y Veer, 2005).

Este tipo de cáncer exhibe un amplio rango de fenotipos morfológicos y tipos histológicos específicos que tienen características clínicas y pronósticos particulares (González et al., 2007). La mayoría de los cánceres de mama comienzan en células que revisten a los conductos o ductos y otros pocos se originan en las células que revisten a los lobulillos (ACS, 2014).

3.2.3 Anatomía y fisiología de la glándula mamaria

La glándula mamaria es una glándula sudorípara apocrina modificada, encontrada sólo en mamíferos. El desarrollo de esta glándula es único, ya que las últimas etapas de desarrollo ocurren en la mujer adulta sólo durante el embarazo. Con cada embarazo hay proliferación del tejido ductal, diferenciación a ácinos productores de leche, secreción de leche por las células acinares y, al final de la lactancia, involución del componente secretor de la glándula con preservación de las estructuras ductales (Sorenmo, Rasotto, Zappulli y Goldschmidt, 2011).

La mama está formada por 10 ó 20 secciones llamadas lóbulos. Cada lóbulo está dividido en secciones más pequeñas llamadas lobulillos, que contienen a las glándulas productoras de leche, la leche fluye de los lobulillos al pezón por pequeños tubos llamados ductos (Santaballa, 2015). El espacio entre los lobulillos y los ductos contiene tejido adiposo y conectivo, vasos sanguíneos y vasos linfáticos que van hacia los ganglios linfáticos, que tienen como función la protección, atrapando bacterias, células tumorales y otras sustancias nocivas (Fig. 3) (ACS, 2014).

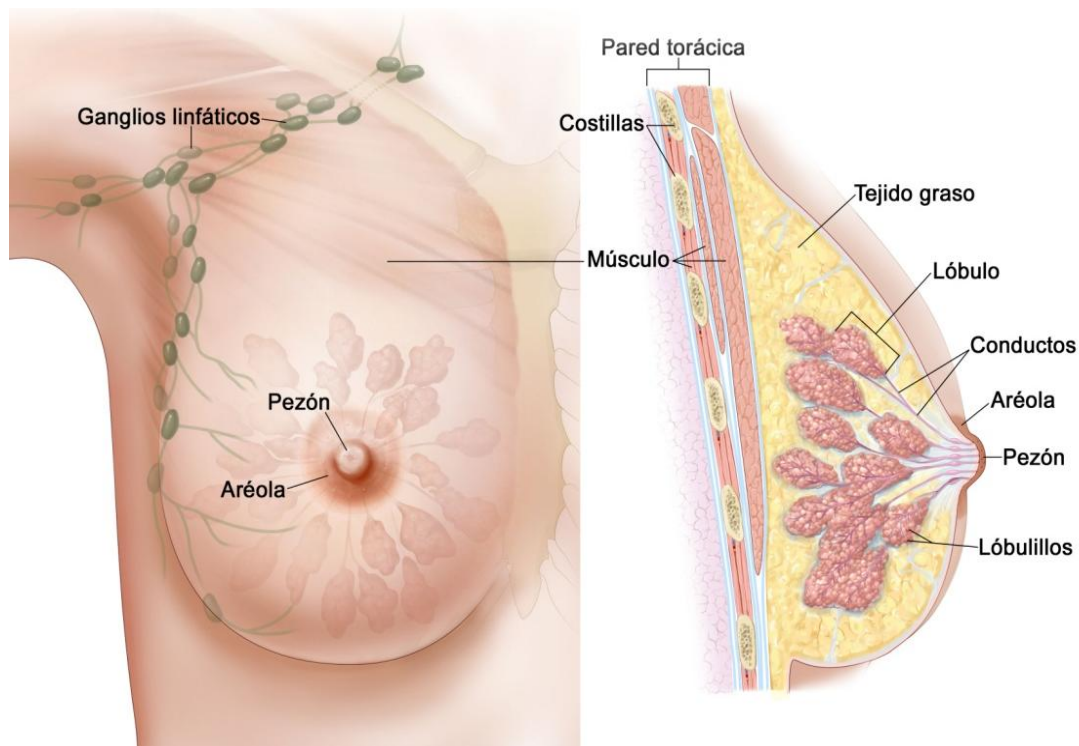


Fig. 3 Anatomía de la mama femenina normal. Modificado de Santaballa, 2015.

Sistema linfático del seno

Los ganglios linfáticos son pequeños grupos de tejido que contienen cierta clase de células del sistema inmunológico. Se encuentran conectados por vasos que transportan un líquido llamado linfa; estos drenan hacia los ganglios linfáticos localizados debajo del brazo (ganglios axilares), los ganglios linfáticos alrededor de la clavícula (ganglios linfáticos infraclaviculares y ganglios linfáticos supraclaviculares) y los ganglios linfáticos que se encuentran en el interior del tórax y cerca del esternón (ganglios linfáticos mamaros internos) (Fig. 4) (ACS, 2014).

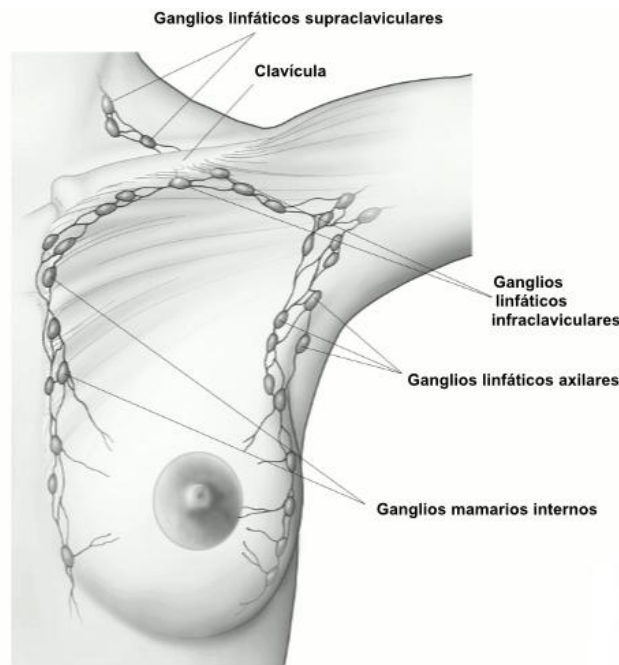


Fig. 4 Ganglios linfáticos en relación con la mama femenina. Modificado de ACS, 2014.

Una de las principales maneras de propagación del cáncer de mama es a través del sistema linfático, pues las células se trasladan a los vasos linfáticos y comienzan a crecer en los ganglios linfáticos (ACS, 2014).

3.2.4 Anatomía patológica

El diagnóstico del cáncer de mama inicia con un estudio para confirmar o descartar la enfermedad. Iniciando con las pruebas de imagen, la mamografía, ecografía y resonancia magnética nuclear, que al no ser pruebas 100% confiables se debe hacer la confirmación con una biopsia. La mamografía se ha acreditado como la prueba de cribado más efectiva. Los programas de cribado mediante mamografía consiguen una disminución en la mortalidad por cáncer de mama.

El diagnóstico definitivo de cáncer de mama se realiza al observar las células malignas bajo el microscopio a partir de la muestra de la biopsia. Los factores a determinar son:



- Tamaño tumoral
- Tipo histológico: depende de las células de las que derive el tumor.
- Grado histológico: describe el grado de diferenciación (maduración) de las células del tumor. Las que son más diferenciadas (grado I), son más maduras y menos agresivas en oposición a las menos diferenciadas (grado III).
- Afectación ganglionar: el número de ganglios afectados es el factor pronóstico más importante, de forma que cuanto mayor es el número de ganglios afectados, mayor es el riesgo de recaída.
- Receptores hormonales: el patólogo analiza si las células del tumor presentan receptores para dos tipos de hormonas, los estrógenos y la progesterona. Esto tiene su interés por que su expresión confiere mejor pronóstico y porque indican que las pacientes que los tienen pueden responder a la terapia hormonal.
- HER-2 (receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano): es una proteína que participa en el crecimiento de las células. Está presente en células normales y en la mayoría de los tumores, pero en un 15-20% de los tumores de mama se encuentra en concentraciones elevadas y esto confiere al tumor mayor agresividad (Santaballa, 2015).

3.2.5 Epidemiología y factores de riesgo

El cáncer de mama es la primera causa de muerte por neoplasia maligna en la mujer. El riesgo de cáncer de mama invasor se incrementa con la edad, como lo reporta la Sociedad Americana del Cáncer, que el riesgo es de un caso por cada 206 mujeres (del nacimiento a los 39 años de edad), de 1 en 27 (de los 40 a 59 años), de 1 en 29 (de los 60 a 69 años) y de 1 en 15 (de los 70 años en adelante) con un riesgo global de 12.08% durante toda la vida (Robles, Ruvalcaba, Maffuz, Rodríguez, 2011).

La neoplasia mamaria se ha incrementado en incidencia y mortalidad en las mujeres de la región de Latinoamérica. La OMS elabora una Estrategia Mundial de Control del Cáncer, cuyo objetivo es reducir el número de casos y sus factores de riesgo, así como mejorar la calidad de vida tanto de los pacientes como de sus familiares, gracias a la planificación y aplicación de estrategias de prevención y control (Cuenca, Despaigne y Beltrán, 2013).

En México el cáncer de mama es ahora causante, de un mayor número de muertes, comparado con el cáncer cervicouterino, afectando a mujeres adultas de todas las edades y niveles de ingreso siendo la segunda causa de muerte entre las mujeres mexicanas adultas de 30 a 54 años de edad (Knaul et al., 2009). En el año 2010 se registraron 5,113 defunciones, con una tasa de mortalidad de 10.1 fallecimientos por 100 mil mujeres, lo que hace un total de 13,648 nuevos casos (Robles et al., 2011).

En la población mexicana se identificó que el cáncer de mama aparece diez años antes en comparación con lo reportado para mujeres europeas y anglosajonas, pues la edad promedio a la aparición del cáncer de mama en Estados Unidos es de 60 años, mientras que en México es a los 50 años (Robles et al., 2011).

Factores de riesgo

Los factores de riesgo establecidos para el cáncer de mama incluyen factores reproductivos (menarquía temprana, nuliparidad, edad mayor de 30 años en el primer embarazo, uso de anticonceptivos hormonales de alta dosis, menopausia tardía y terapia de reemplazo hormonal), aumento de la edad, alta densidad del tejido mamario y una historia familiar de cáncer, especialmente cáncer de mama. Factores nutricionales, actividad física, la historia y duración de la lactancia materna, la obesidad en la post-menopausia, fumar, consumo de alcohol, exposición a radiación ionizante, etc. (Dornelles et al., 2015).

3.2.6 Terapias aplicadas

El diagnóstico correcto del cáncer es esencial para poder prescribir un tratamiento adecuado y eficaz, porque cada tipo de cáncer requiere un protocolo específico que puede abarcar una o más modalidades, tales como la cirugía, la radioterapia o la quimioterapia (OMS, 2017).

Clásicamente en los estadios iniciales el tratamiento del cáncer de mama se iniciaba con la cirugía y posteriormente se administraba el tratamiento sistémico y la radioterapia (tratamiento adyuvante). En la actualidad, se ofrece iniciar con el tratamiento sistémico y posteriormente la cirugía y la radioterapia (tratamiento neoadyuvante). En los estadios avanzados el tratamiento principal es sistémico, aunque puede emplearse la cirugía o la radioterapia en situaciones concretas (Santaballa, 2015).

En las mujeres con cáncer de mama que son menores de 50 años de edad, la quimioterapia aumenta su tasa de supervivencia a 15 años en un 10%; En las mujeres mayores el incremento es del 3%. Sin embargo, la quimioterapia tiene una amplia gama de efectos secundarios agudos y a largo plazo que afectan sustancialmente la calidad de vida del paciente (Weigelt et al., 2005).

Las investigaciones han producido nuevas opciones terapéuticas, muchas de las cuales tienen un costo elevado, por lo que la epidemia del cáncer de mama representa un desafío para el financiamiento y la protección financiera del sistema de salud, en particular para los países en desarrollo (Knaul et al., 2009).

Actualmente se dispone de una gama de drogas quimioterapéuticas que debido a la necesidad de seguir encontrando alternativas para el tratamiento del cáncer, se han buscado a través de los datos etnobotánicos, plantas medicinales que puedan tener alguna actividad antitumoral, para identificar posteriormente sus sustancias activas (Arroyo, Prashad, Vásquez, Li y Tomás, 2005).

3.3 Inducción experimental de cáncer

El uso de modelos animales para el estudio de la carcinogénesis está justificado desde que los agentes químicos se identificaron como los principales factores desencadenantes del cáncer (Baldasquín, 2012).



Los modelos de inducción del cáncer de mama mediante carcinógenos químicos en roedores es una de las formas más utilizadas para estudiar la patogénesis del cáncer de mama (Ruíz-Sanjuán, 2005).

Uno de los sistemas experimentales más utilizados de carcinogénesis mamaria es la inducción de tumores mamarios por administración de 7,12-dimetilbenzo[a]antraceno (DMBA). Este modelo experimental tiene fiabilidad en la inducción tumoral, la especificidad de órgano y la aparición de tumores de origen ductal (Ruíz-Sanjuán, 2005).

El DMBA es un hidrocarburo aromático policíclico (HAP), relacionado con una clase importante de los carcinógenos ambientales, lipofílico que requiere activación metabólica en epóxidos, y forma uniones con residuos de deoxiguanosina y deoxiadenosina que conducen a la reparación por escisión, lo cual genera puntos de mutación de especificidad indefinida. Sin embargo, algunos autores afirman que los tumores de mama inducidos por DMBA probablemente se originan por una mutación en el codón 61 del oncogén Ha-ras (Serrano y Suárez, 2014). El DMBA es un compuesto procarcinógeno que se convertirá en metabolito activo después de ser metabolizado por el citocromo P-450 y se unirá covalentemente con el ADN formando un aducto de ADN que a su vez puede desencadenar en la formación de tumores malignos (Wibowo, Sriningsih, Wuyung y Ranasasmita, 2010).

La susceptibilidad de la glándula mamaria a la carcinogénesis inducida por DMBA es fuertemente dependiente de la edad, esta es máxima cuando el carcinógeno es administrado a roedores hembra vírgenes entre los 40 y 60 días de edad, justo después de la apertura vaginal y en los inicios de la maduración sexual (Ruíz-Sanjuán, 2005).

Dependiendo del modelo de administración, el DMBA puede inducir diferentes tipos de tumores, por ejemplo induce papilomas y carcinomas de células escamosas cuando el DMBA se aplica directamente a la piel del ratón; en ratas, la leucemia se desarrolla cuando el DMBA es administrado vía intravenosa; la administración oral dará lugar a tumores de cáncer de mama y cuando el DMBA se inyecte por vía subcutánea en las extremidades, desarrollara fibrosarcomas con diversos grados de diferenciación (Samuelson, 2008).

3.4 Estrés oxidativo

El cuerpo humano mantiene un balance oxido-reducción constante preservando el equilibrio entre la producción de pro-oxidantes y los sistemas de defensa antioxidantes (Dorado, Rugerio y Rivas, 2003). Cuando este equilibrio se pierde con el aumento de especies oxidantes y una capacidad antioxidante disminuida, se genera un estado de estrés oxidativo (Mayor, 2010).

Desde el punto de vista químico los radicales libres (RL) son todas aquellas especies químicas que en su estructura atómica presentan uno o más electrones desapareados en el orbital externo (Venereo, 2002) esta configuración espacial los hace sumamente reactivos, inestables y capaces de dañar a otras moléculas (Dorado et al., 2003) ya que tienden a captar un electrón de otros átomos con el fin



de alcanzar su estabilidad electroquímica (Maldonado et al., 2010), siendo capaces de reaccionar con múltiples biomoléculas celulares (carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos) a través de su oxidación provocando un gran daño en ellas y en las membranas celulares (Criado y Moya, 2009).

Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita (reducción), la molécula estable que lo pierde (oxidación) se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciando así una reacción en cadena que causa daño oxidativo, desde las células hasta los tejidos (Maldonado et. al., 2010).

3.4.1 Mecanismos de producción de los radicales libres

A nivel celular los mecanismos de transformación de los radicales libres son tres: por transferencia electrónica, en la que se produce la cesión de un electrón a una molécula, por pérdida de un protón de una molécula o por ruptura homolítica de un enlace covalente de cualquier molécula, de manera que cada fragmento obtenido conserva uno de los electrones apareados del enlace (Maldonado et. al., 2010).

Existen varias fuentes capaces de producir radicales libres a partir de sustancias endógenas y sustancias exógenas (Valko, Rhodes, Moncol, Izakovic y Mazur, 2006).

Endógenas

Las fuentes endógenas potenciales incluyen la producción de radicales libres principalmente durante el metabolismo celular, que se lleva a cabo en la mitocondria por las diversas reacciones redox realizadas por enzimas como la NADHP oxidasa, lipoxigenasas, ciclooxigenasas y peroxidases, (Delgado, Betanzos y Sumaya, 2010), existen otras fuentes endógenas de producción de radicales libres en menor grado como el retículo endoplasmático, los microsomas, los peroxisomas, los lisosomas, la membrana nuclear y citoplasmática, las oxidaciones microsmales, los fagosomas, la autooxidación, los neutrofilos, metabolismo del citocromo P-450, los leucocitos polimorfonucleares (cuando se activan por diversas proteínas que actúan sobre ellos por ejemplo las interleucinas, particularmente durante los procesos inflamatorios) y la enzima xantina deshidrogenasa, que se encuentran en los endotelios, etc. (Mayor, 2010).

Exógenas

Dentro de las fuentes exógenas se encuentran factores como la contaminación ambiental, la exposición a radiaciones ionizantes, el tabaco, los medicamentos, los aditivos químicos en alimentos procesados y algunos xenobióticos como pesticidas, herbicidas y fungicidas (Maldonado et. al., 2010).

3.4.2 Especies reactivas

Las especies reactivas se forman como productos del metabolismo de los radicales libres, y aunque no todas son radicales libres, son moléculas oxidantes que se

transforman fácilmente en radicales libres lo que les confiere la característica de ser compuestos muy dañinos para las células.

Estas especies incluyen a las especies reactivas de oxígeno (ERO), las especies reactivas de hierro (RIS), las especies reactivas de cobre (ERC), así como a las especies reactivas de nitrógeno (ERN). Estas especies reactivas dañan tanto al ADN como a las proteínas transportadoras (Dorado et al., 2003).

3.4.3 Especies reactivas de Oxígeno

De entre las especies reactivas, las especies reactivas de oxígeno (ERO) representan la clase más importante generadas en sistemas vivos (Valko et al., 2006).

Durante el proceso evolutivo, con la aparición de los organismos fotosintéticos, se dio un aumento en los niveles de oxígeno, permitiendo a los organismos desarrollar los mecanismos necesarios para utilizar esta molécula como aceptor final de electrones, lo que permitió a las células tener sistemas de producción de energía altamente eficientes a través de la oxidación de la glucosa (Dorado et al., 2003). Mediante la cadena transportadora de electrones para la producción de energía el O_2 es reducido a agua tras aceptar cuatro electrones por el complejo citocromo-oxidasa de la mitocondria. Normalmente, 2% del oxígeno es reducido de forma incompleta, al aceptar un menor número de electrones llevando así a la formación de ERO (Fig. 5) (Sánchez y Méndez, 2013).

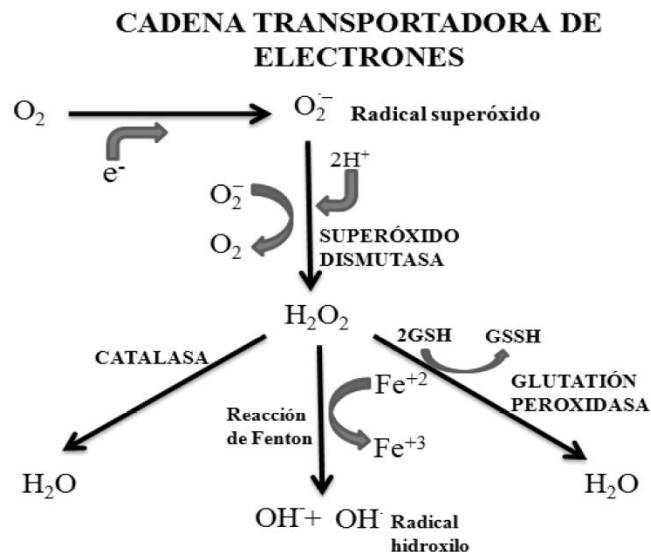


Fig. 5 La cadena transportadora de electrones mitocondrial es considerada la mayor fuente de formación de ERO. Modificado de Maldonado et al., 2010.

Las ERO engloban radicales libres como el anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$), el anión peróxido (O_2^{2-}), el radical perhidroxilo (HO_2^{\cdot}) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$) y compuestos no radicales, tales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el oxígeno singulete (1O_2), el ozono (O_3) y el ácido hipocloroso ($HClO$).



El primer radical libre que se forma por reducción del oxígeno molecular es el anión superóxido (O_2^-), cuya toxicidad es moderada, éste por medio de una reacción de dismutación catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD), se convierte en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Viñas, Puig y Porta, 2012), que en presencia de metales de transición como el hierro (Fe), cobre (Cu), cobalto (Co) y níquel (Ni) produce el radical hidroxilo ($\bullet OH$), mediante la reacción de Fenton y es considerado la especie oxidante más dañina en los sistemas biológicos y el principal responsable del daño oxidativo (Delgado et al., 2010).

La capacidad prooxidante de cada especie está determinada por factores como: reactividad, especificidad, selectividad y difusibilidad. Por ejemplo, el radical hidroxilo ($\bullet OH$) reaccionará con cualquier molécula cercana, dada su elevada reactividad y baja especificidad y especies menos reactivas como el anión superóxido (O_2^-) reaccionan con menor eficacia pero de forma mucho más específica y selectiva, afectando a enzimas como la xantino oxidasa y la aldehído oxidasa (Maldonado et. al., 2010). El radical perhidroxilo ($HO_2\bullet$), es mucho más reactivo frente a biomoléculas y es capaz de iniciar la peroxidación lipídica (Sánchez y Méndez, 2013).

3.4.4 Especies reactivas de Nitrógeno

Por otra parte, el daño oxidativo puede agravarse o inhibirse por las especies reactivas de nitrógeno (ERN) (Sánchez y Méndez, 2013); Bajo condiciones hipóxicas, la cadena respiratoria mitocondrial entra en estrés nitrosante produciendo óxido nítrico ($\bullet NO$), que es el representante más sobresaliente de las ERN ya que actúa como una importante molécula oxidante de señalización biológica en una gran variedad de procesos fisiológicos, incluyendo neurotransmisión, regulación de la presión sanguínea, mecanismos de defensa, relajación del músculo liso y regulación inmune pues los macrófagos producen óxido nítrico como parte de sus mecanismos citotóxicos (Valko et al., 2005).

El estrés nitrosante conduce a reacciones de nitrosilación que pueden alterar la estructura de las proteínas y así inhibir su función normal. Dado que el óxido nítrico es soluble tanto en medios acuosos como en lípidos se difunde fácilmente a través del citoplasma y de las membranas plasmáticas y en el medio extracelular reacciona con oxígeno y agua para formar los aniones nitrato y nitrito (Valko et al., 2005).

El óxido nítrico puede generar otras especies reactivas de nitrógeno como: el catión nitrosonium (NO^+), anión nitroxilo (NO^-), peroxinitrito ($ONOO^-$) y el dióxido de nitrógeno (NO_2) (Maldonado et. al., 2010), que son capaces de inducir daño por sí solas o combinarse con las ERO, aumentando el daño oxidativo. Además estas ERN pueden generar otras especies reactivas como algunos aldehídos reactivos, el Malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonal (4-HNE), que inducen una excesiva peroxidación lipídica (Valko et al., 2005).



3.4.5 Daños por estrés oxidativo

En la última década ha habido un interés explosivo en el papel de los radicales libres y las especies reactivas en la medicina experimental y clínica, pues se sabe que desempeñan un papel dual en los sistemas biológicos y en el desarrollo de enfermedades, ya que pueden ser perjudiciales o beneficiosas para los sistemas vivos (Valko et al., 2006).

Dentro de los efectos benéficos, los radicales libres se encuentran a bajas concentraciones participando en numerosas funciones fisiológicas que se controlan por vías de señalización que obedecen a reacciones tipo redox (Criado y Moya, 2009), por ejemplo la defensa contra agentes infecciosos, regulación del tono vascular, participación en la fagocitosis, regulación de funciones que son controladas por la concentración de oxígeno, síntesis de colágeno, síntesis de prostaglandinas, activación de enzimas de la membrana celular, disminución de síntesis de catecolaminas por las glándulas suprarrenales, modifican la biomembrana y favorecimiento de la quimiotaxis (Venereo, 2002).

En contra parte, a concentraciones elevadas los radicales libres tienen un efecto dañino causado por el estrés oxidativo en el que se afecta a una amplia variedad de funciones fisiológicas y participan en el desarrollo de enfermedades humanas de tipo crónico degenerativas con impacto epidemiológico (Sánchez y Méndez, 2013).

La alteración del balance entre pro-oxidantes y antioxidantes, puede tener diversos grados de magnitud. En el estrés oxidativo leve, las defensas antioxidantes bastan para restablecer dicho balance, pero en el estrés oxidativo grave se llega a graves alteraciones en el metabolismo celular, como aumento en la concentración de calcio intracelular, descompartimentalización de iones de Fe^{+2} y Cu^{+2} catalíticos, daño a los transportadores membranales de iones y constituyen un riesgo (Dorado et al., 2003) especialmente para las biomoléculas, como ácidos nucleicos, proteínas y lípidos, pues los radicales y las especies reactivas pueden reaccionar químicamente con ellas produciendo en milisegundos un daño celular que lleva al daño del tejidos y eventualmente a la muerte celular (Delgado et al., 2010).

Efecto dañino de los radicales libres sobre las macromoléculas:

Proteínas. Todos los aminoácidos presentes en las proteínas tienen residuos susceptibles de ser atacados por los radicales libres, sobre todo por el radical hidroxilo. Esta oxidación puede generar un cambio conformacional de la proteína y como consecuencia la pérdida o modificación de su función biológica y la desnaturalización de la proteína (Maldonado et. al., 2010). Al oxidarse aminoácidos como fenilalanina, tirosina, histidina y metionina se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas, fragmentación de la proteína y formación de grupos carbonilos que impiden el desarrollo normal de sus funciones (transportadores iónicos de membranas, receptores y mensajeros celulares, enzimas que regulan el metabolismo celular, etc.).

En las enzimas, puede impedir su actividad catalizadora y en los polisacáridos, cuya función es estructural, ocasiona su despolimerización, lo que da lugar a procesos degenerativo (Criado y Moya, 2009).

Ácido desoxirribonucleico (ADN). En esta molécula, el daño oxidativo producido específicamente por el ($\bullet\text{OH}$), conduce a modificaciones en la desoxirribosa, provocando una liberación de las bases nitrogenadas que se encuentran unidas a este azúcar. Lo que produce el rompimiento de una o ambas cadenas ocasionando deleciones que dan como resultado mutaciones, reordenamientos cromosómicos, activación o inactivación de genes, que afectan incluso la biosíntesis de cadenas de ADN. Lo que tiene serias consecuencias en el desarrollo de carcinogénesis por una parte o la pérdida de expresión por daño al gen específico (Delgado et al., 2010).

Lípidos. Es aquí donde se produce el mayor daño en un proceso que se conoce como peroxidación lipídica, pues los lípidos son especialmente susceptibles a desarrollar procesos de oxidación no controlados. La peroxidación de lípidos (ácidos grasos poliinsaturados), inicia un deterioro acumulativo de las funciones membranales y provoca disminución en la fluidez, reducción en el potencial electroquímico y el aumento de la permeabilidad de la membrana (Fig. 6) (Dorado et al., 2003). Además se pierde la flexibilidad y las funciones secretoras, así como la pérdida de los gradientes iónicos a ambos lados de la membrana.

La peroxidación lipídica, genera numerosos subproductos, entre ellos el MDA, cuya determinación en tejidos, plasma u orina es uno de los métodos para evaluar el estrés oxidativo (Criado y Moya, 2009).

El MDA es capaz de perpetuar el daño oxidativo, ya que puede interactuar con otras macromoléculas, como las proteínas y el ADN, alterando tanto su estructura como su funcionalidad. Por tanto, el MDA se forma como consecuencia del daño a lípidos originado por el estrés oxidativo y a la vez es precursor de este tipo de daño a otras macromoléculas de la célula, por lo que la elevación de sus concentraciones es a la vez consecuencia y causa del deterioro celular (Alvarado et al., 2005).

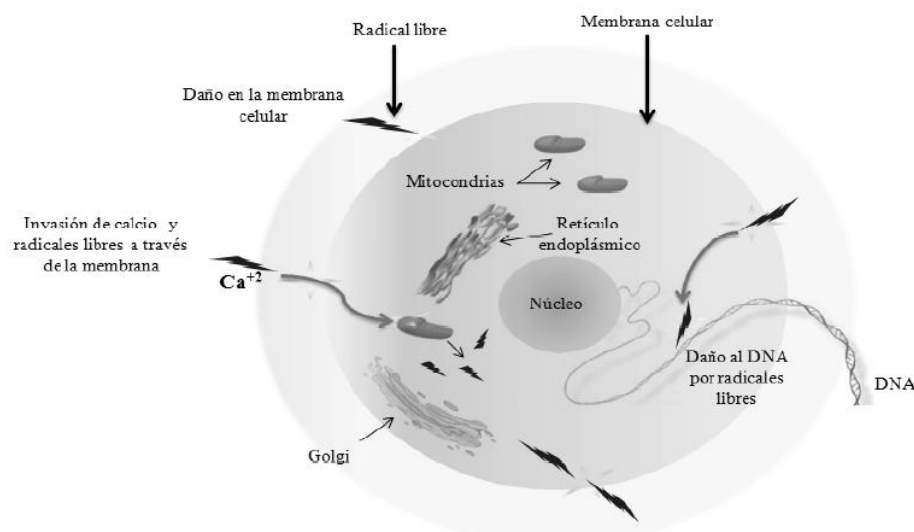


Fig. 6 El daño celular es provocado principalmente por la peroxidación lipídica de la membrana, permitiendo el paso de radicales libres y calcio, el cual provoca daño mitocondrial, liberando más radicales libres, lo cual provoca una reacción en cadena. Modificado de Maldonado et al., 2010.



Este daño por estrés oxidativo puede ser reversible o irreversible dependiendo de factores como el tiempo que dure el estrés, la efectividad de las defensas antioxidantes, la edad del organismo, el estado nutricional y factores genéticos que codifican sistemas antioxidantes (Dorado et al., 2003), aunque generalmente es irreversible.

3.4.6 Radicales libres, sistema inmune y cáncer

En respuesta al cáncer, el sistema inmune posee diversos mecanismos que le permiten reconocer y eliminar las células transformadas.

El sistema inmune de los mamíferos es una red intrincada y perfectamente regulada, en la que participan varias poblaciones celulares (linfocitos T y B, macrófagos y otras células) así como moléculas solubles (citocinas). La interacción de todos estos elementos permite que se desarrolle una respuesta inmune eficaz contra tumores.

A pesar de que el sistema inmune es altamente eficiente en su respuesta contra el cáncer, existen mecanismos generados por los propios tumores que les permiten evadir dicha respuesta y desarrollarse en el organismo, además debe tomarse en cuenta que las células inmunitarias tienen una gran tendencia a presentar un elevado grado de estrés oxidativo (Barrera, Peralta y Madrid, 1995).

En el sistema inmune los radicales libres funcionan como mediadores fisiológicos en contra de infecciones bacterianas. El O_2 es el mediador del inicio del proceso fagocítico, los fagocitos captan el oxígeno en forma acelerada, aproximadamente cien veces más rápido que en su estado no activado, a este fenómeno se le conoce como estallido respiratorio que es empleado para eliminar patógenos, y al mismo tiempo produce algunos radicales libres, con enorme poder destructor, tales como O_2^- , H_2O_2 , $\bullet OH$ y $HClO$ (Maldonado et al., 2010). Los leucocitos necesitan producir radicales libres y, consecuentemente, requieren valores óptimos de antioxidantes que neutralicen el exceso de compuestos oxidantes, para mantener un ambiente de carácter reductor que les proteja frente al daño oxidativo (Alvarado et al., 2005).

Otra especie reactiva que produce el sistema inmune junto con el anión superóxido es el óxido nítrico durante el estallido respiratorio desencadenado durante los procesos inflamatorios. En estas condiciones, el óxido nítrico y el anión superóxido pueden reaccionar juntos para producir cantidades significativas de una molécula mucho más oxidativamente activa, el anión peroxinitrito ($ONOO^-$), que es un radical libre oxidante que puede causar la fragmentación del ADN y la oxidación de los lípidos (Valko et al., 2006).

Es por eso que las funciones de las células inmunitarias depende en gran medida del equilibrio entre oxidantes y antioxidantes debido a la gran cantidad de oxidantes que producen para llevar a cabo muchas de sus funciones y al hecho de gastar rápidamente las defensas antioxidantes que poseen, en el desarrollo de sus actividades.

Además, las células inmunitarias son más susceptibles al daño por el estrés oxidativo que otros tipos celulares, ya que contienen en sus membranas un elevado



porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados, hecho que favorece el proceso de peroxidación lipídica (Alvarado et al., 2005).

Actualmente se ha demostrado que las células inflamatorias que se infiltran en el tejido tumoral producen grandes cantidades de ERO, incrementando el estrés oxidativo en el microambiente tumoral (Viñas et al., 2012).

Por lo que el vínculo entre la inflamación y cáncer sugerido por datos epidemiológicos y experimentales ha sido confirmado por terapias antiinflamatorias que muestran eficacia en la prevención y el tratamiento del cáncer (Reuter, Gupta, Chaturvedi y Aggarwal, 2011).

En la última década, la manipulación de genes implicados en la determinación o funciones efectoras de diversos tipos de células inmunitarias, junto con inhibidores farmacológicos de dichas células o sus funciones, ha mostrado que desempeñan papeles diversos y críticos en el fomento de la tumorigénesis. Tales estudios están produciendo una lista creciente de moléculas de señalización liberadas por células inflamatorias que sirven como promotoras de tumores.

Con esto se ha demostrado que las células inflamatorias infiltrantes de tumores inducen y ayudan a mantener la angiogénesis tumoral, estimulan la proliferación de células cancerosas, facilitan, a través de su presencia en los márgenes de tumores, la invasión de tejidos y la diseminación metastásica y la siembra de células cancerosas (Hanahan y Weinberg, 2011).

3.4.7 Papel de los radicales libres en el proceso carcinogénico

Conforme se ha ido profundizando en el conocimiento de los radicales libres, se ha descubierto que el deterioro celular producido por el estrés oxidativo se encuentra asociado a graves patologías crónico degenerativas en el ser humano (Delgado, Betanzos y Sumaya, 2010).

Entre las más destacadas están las cardiopatías, la diabetes y el cáncer.

Actualmente se acepta que la señalización celular redox está implicada en la regulación de los procesos normales, en la progresión de enfermedades, la angiogénesis, el estrés oxidativo, el envejecimiento y el cáncer (Ralph, Rodríguez, Neuzil, Saavedra y Moreno, 2010).

Distintos estudios experimentales han reportado mecanismos implicados en la transformación maligna celular inducida por radicales libres, se ha observado que la deficiencia de enzimas antioxidantes desencadena alteraciones características de la transformación celular (Sánchez y Méndez, 2013), de igual forma se ha puesto de manifiesto la interacción entre la producción de ERO y el papel de las oncoproteínas y supresores de tumores para promover la transformación de células malignas (Ralph et al., 2010), así como la estimulación por parte de los radiales libres del crecimiento de células musculares lisas (angiogénesis) (Elejalde, 2001).

La iniciación y progresión del cáncer se han relacionado con el estrés oxidativo mediante el aumento de las mutaciones del ADN o inducción de daños en el ADN,



la inestabilidad por oxidación del genoma y la proliferación celular (Reuter et al., 2011).

La oxidación de la guanina a 8-oxo-desoxi-guanosina (8-oxo-dG) induce errores en la replicación del ADN por parte de la polimerasa dependiente de ADN. Los cambios conformacionales inducidos por la guanina oxidada parecen ser los responsables del apareamiento de bases nucleotídicas no complementarias, al permitir el establecimiento de puentes de hidrógeno con adenina (A) y timina (T). Posiblemente, la transición mutagénica G-C a A-T sea la lesión más frecuente en términos oxidantes.

Entre los cambios metabólicos observados en las células tumorales, destaca el aumento de la producción de peróxido de hidrógeno, radical que juega un papel crucial como segundo mensajero en la transducción de señales para la activación, diferenciación y proliferación celular, además de que las células presentan una disminución significativa de sistemas antioxidantes, lo que las hace susceptibles a presentar una o más alteraciones moleculares en genes supresores de tumores, lo cual conlleva a la proliferación y diseminación de células malignas durante el proceso carcinogénico (Maldonado et al., 2010).

En los carcinomas de mama, se ha informado que el 8-oxo-dG aumenta de 8 a 17 veces en los tumores primarios de mama en comparación con el tejido mamario sano (Reuter et al., 2011).

3.5 Mecanismos antioxidantes

Para contrarrestar el efecto nocivo de los radicales libres y las especies reactivas, la célula cuenta con mecanismos de defensa capaces de neutralizar los productos tóxicos de estas moléculas (Sánchez y Méndez, 2013). Estos mecanismos son denominados antioxidantes, que son moléculas que poseen una afinidad mayor que cualquier otra molécula para reaccionar con un RL cediéndoles un electrón, oxidándose y transformándose en un radical libre débil no tóxico (Criado y Moya, 2009), estabilizando y neutralizando los efectos dañinos de los radicales (Delgado et al., 2010).

Los antioxidantes pueden reaccionar de diferentes formas: disminuyen la concentración de oxidantes, evitan la iniciación de la reacción en cadena al “barrer” (cubrir o detener una reactividad química muy alta), a los primeros radicales libres que se forman, unen los iones metálicos para evitar la formación de especies reactivas, transforman los peróxidos en productos menos reactivos, detienen la propagación y el aumento de radicales libres (Dorado et al., 2003).

La acción del antioxidante es de sacrificio de su propia integridad molecular para evitar alteraciones de moléculas como lípidos, proteínas y ADN funcionalmente vitales o más importantes, reaccionando tanto en medios hidrofílicos como hidrofóbicos (Venereo, 2002).

Estos sistemas antioxidantes disminuyen con la edad, en ciertos procesos patológicos y bajo condiciones ambientales como la contaminación atmosférica (Dorado et al., 2003).

3.5.1 Clasificación del sistema de defensa antioxidante

Esencialmente los antioxidantes se dividen en dos grandes grupos: enzimáticos y no enzimáticos.

Entre los enzimáticos se encuentran las catalasas, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, NADPH-quinona oxidoreductasa, epóxido hidrolasa, entre otras y constituyen la primera línea de defensa celular frente al daño oxidante proporcionando una función protectora frente a los oxidantes biológicos, disminuyendo la concentración intracelular de radicales libres (Maldonado et. al., 2010).

Entre los no enzimáticos se encuentran carotenoides como las vitaminas A, C, E, ácido úrico, flavonoides, transferrina, lactoferrina, glicina, taurina, ubiquinol, bilirrubina y el tripéptido glutatión, fenoles etc., constituyendo la segunda línea de defensa, actuando como secuestradores o rastrillos (radical scavengers) de radicales libres residuales que no hayan podido ser neutralizados por las enzimas antioxidantes (Elejalde, 2001).

Otra clasificación que se les suele dar a los antioxidantes es en endógenos y exógenos, siendo endógenos los fabricados por la propia célula y exógenos los que ingresan al organismo a través de la dieta o suplementos con formulaciones antioxidantes (Mayor, 2010).

3.5.2 Catalasa

La catalasa es un antioxidante enzimático que presenta dos funciones fundamentales, catalítica y peroxidativa. Actúa en presencia de altas concentraciones de peróxido de hidrógeno catalizando la conversión de éste en oxígeno y agua evitando que se forme el radical hidroxilo y el oxígeno singlete (ERO muy reactivas). Tiene una amplia distribución en el organismo humano, alta concentración en hígado y riñón, baja concentración en tejido conectivo y epitelios y prácticamente nula en tejido nervioso; se localiza a nivel celular en mitocondrias, peroxisomas y citosol (eritrocitos) (Venereo, 2002).

Se han identificado tres grupos de catalasas: i) las catalasas monofuncionales, que contienen hemo, están presentes tanto en los organismos procariontes como en los eucariotes y en la mayoría de los organismos aerobios, ii) las Mn-catalasas, que son enzimas hexaméricas que no tienen hemo, tienen Mn en el sitio activo y sólo están presentes en algunos organismos procariontes anaerobios y iii) las catalasas-peroxidasas, que tienen actividad de catalasa y de peroxidasa, contienen hemo y sólo están presentes en las bacterias y los hongos.

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, en la prevención de mutaciones, evita el envejecimiento y cierto tipo de cáncer.

Mecanismo de reacción

En la reacción de la catalasa ocurre la transferencia de dos electrones entre dos moléculas de peróxido de hidrógeno en la cual una funciona como donador y otra



como aceptor de electrones. El mecanismo de reacción se lleva a cabo en dos pasos. En el primero la catalasa se oxida por una molécula de peróxido formando un intermediario llamado compuesto I. El compuesto I se caracteriza por tener un grupo ferroxilo con Fe-IV y un radical catiónico de porfirina. En esta reacción se produce una molécula de agua (Reacción 1). En el segundo paso de la reacción, el compuesto I es reducido por otra molécula de peróxido regresando la catalasa a su estado inicial y produciendo agua y O₂ (Reacción 2) (Díaz, 2003).



3.5.3 Terapia antioxidante

Los avances en el estudio de los radicales libres, estrés oxidativo y su participación en el desarrollo de enfermedades, han permitido identificar sus mecanismos de acción; así como el de moléculas con capacidad de inhibir o modular sus efectos en la célula. Se ha propuesto que una dieta rica en antioxidantes puede prevenir o disminuir el deterioro celular y funcional del organismo, generado por el exceso de estrés oxidativo (Sánchez y Méndez, 2013).

En la actualidad, existe un marcado interés a nivel mundial por la identificación de compuestos antioxidantes en las plantas, las cuales constituyen fármacos potenciales de uso en la medicina preventiva.

Entre las enfermedades con potencialidades para ser tratadas con plantas medicinales se encuentra un grupo numeroso de patologías asociadas al estrés oxidativo, tales como: trastornos cardiovasculares y gastrointestinales, procesos inflamatorios, enfermedades neurodegenerativas, desórdenes de la fertilidad, diabetes y cáncer, entre otras (Díaz et al., 2010).

Existen múltiples evidencias epidemiológicas que demuestran la correlación inversa entre la ingesta de antioxidantes y el riesgo de adquirir diversos tipos de cáncer e incidencia tumoral.

La alimentación es de vital importancia para proveer de antioxidantes a nuestro organismo, especialmente cuando las condiciones de vida del individuo han disminuido el potencial de sus sistemas de defensas. Se ha podido establecer que la dieta humana contiene, además de los macro y micro nutrientes, una serie de compuestos no nutrientes bioactivos, de origen vegetal, que pueden ser importantes para la salud, conocidos como fitoquímicos o metabolitos secundarios (Mayor, 2010).

Los polifenoles son un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos fenólicos y de tener potente actividad antioxidante (Criado y Moya, 2009).

Las flavonas y flavonoles, son flavonoides que contienen en su estructura química grupos OH en los carbonos 3 y 5 de los anillos fenólicos A y C necesarios para ejercer el máximo potencial antioxidante (Ojito, Herrera, Vega y Portal, 2012).



Estudios preclínicos han demostrado que algunos antioxidantes pueden proteger a las células de los efectos nocivos de la quimioterapia y la radioterapia, y por lo tanto disminuir la toxicidad secundaria de estos tratamientos, estimando que el 50% de los pacientes con cáncer ingieren algún suplemento nutricional o vitaminas (Viñas et al., 2012).

3.6 Etnobotánica

Se sabe que la alimentación a base de plantas contiene cantidades significativas de compuestos bioactivos que proporcionan beneficios de salud más que deseables y nutrición a gran escala (Gandhi, Mahajan y Bedi, 2015).

Desde la antigüedad las plantas medicinales son bien conocidas como fuentes naturales para el tratamiento de diversas enfermedades (Maregesi et al., 2008). La OMS informó que el 80% de las poblaciones del mundo creen principalmente en la medicina tradicional y que la mayoría de las terapias implican el uso de plantas o de sus componentes activos y más del 25% de los medicamentos modernos que se usan en todo el mundo, contiene compuestos extraídos de plantas medicinales (Gandhi, Mahajan y Bedi, 2015). Son aproximadamente 20,000 las especies de plantas que se utilizan con fines medicinales según la OMS. Además, los productos naturales, ya sean compuestos puros o como extractos estandarizados de plantas, proporcionan oportunidades ilimitadas para nuevas derivaciones de fármacos debido a la inigualable disponibilidad de compuestos químicos (Maregesi et al., 2008).

A pesar de esto, y de que muchas drogas sintéticas son potencialmente tóxicas y no están exentas de efectos secundarios, son pocas las plantas documentadas a través de estudios etnofarmacológicos, pues se ha hecho poco trabajo en el cribado de estas plantas para probar los usos medicinales descritos por los curanderos tradicionales.

Durante las entrevistas con los curanderos o informantes tradicionales, es relativamente fácil correlacionar las plantas con algún efecto medicinal, siendo principalmente infecciones bacterianas, fúngicas o virales (Maregesi et al., 2008). Por lo que las plantas no dejan de ser importantes en el descubrimiento de nuevos fármacos, proveedoras de fármacos semisintéticos o sintéticos que se usan para diversas dolencias (Guerra et al., 2009).

El valor medicinal de las plantas radica en los sitios químicos que producen una acción fisiológica definida sobre el cuerpo humano. Los más importantes de estos compuestos bioactivos de plantas son alcaloides, flavonoides y compuestos fenólicos (Nagaraju, Srinivas y Sandeep, 2012). El componente activo es diferente de una planta a otra, debido a su biodiversidad, y producen una acción farmacológica definida sobre el cuerpo humano que desarrolla interés por su importancia medicinal (Gandhi, Mahajan y Bedi, 2015).

La investigación fitoquímica basada en la información etnobotánica se considera generalmente con un enfoque eficaz para el descubrimiento de nuevos agentes antiinfecciosos (Nagaraju et al., 2012). Esta restauración del uso de hierbas medicinales tradicionales ha renovado el interés de las compañías farmacéuticas



dispuestas a invertir en el desarrollo de productos a base de plantas o extraídas de las plantas (Gandhi, Mahajan y Bedi, 2015).

3.7 Metabolitos secundarios

Para poder vivir, crecer y reproducirse los organismos necesitan transformar una gran variedad de compuestos orgánicos. El conjunto de reacciones específicas mediante el cual un organismo fabrica sus propias sustancias y mantiene la vida se conoce como metabolismo (Gutiérrez y Estévez, 2009). Las células realizan procesos metabólicos comunes que conducen a la formación de compuestos como azúcares simples, aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos, así como de polímeros derivados de estos compuestos (polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, entre otros), que son esenciales para la vida celular y en general para el desarrollo del organismo. El conjunto de estos procesos forman el metabolismo primario, y a sus derivados se les denomina metabolitos primarios (Méndez, Zañudo, Castruita, Meza y Gómez, 2014).

Pero a diferencia de algunos organismos, las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de su energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos, síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, denominado metabolismo secundario (Ávalos y Pérez, 2009).

Los metabolitos secundarios, sin ser esenciales para la supervivencia de células individuales, tienen un papel importante en la vida y supervivencia del organismo en su entorno ecológico (Palacios, Burtin y Leech, 2004), pues participan en todo tipo de interacciones bióticas y abióticas con el medio ambiente, predominando la defensa contra herbívoros y patógenos (Reimann, Nurhayati, Backenköhler y Ober, 2004), y algunos otros están relacionados probablemente con la fuente de reserva para la biosíntesis de compuestos endógenos (García, 2004)².

Presentan una distribución restringida en el reino vegetal, pues se encuentran típicamente en sólo una especie o un grupo de plantas taxonómicamente relacionadas, por lo que muchos de ellos se consideran marcadores taxonómicos de familias y géneros (García, 2004)¹, además de esto se acumulan en órganos específicos de la planta, en distintas etapas del desarrollo, en una exposición a un estrés específico, o en una zona agro-geo-climática particular y produciéndose en pequeñas cantidades (Gandhi et al., 2015)

Las principales rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios derivan del metabolismo primario del carbono tales como la glicolisis, ruta del ácido shiquímico, ruta del ácido malónico, ruta del ácido mevalónico y ruta del metileritritol fosfato (Méndez et al., 2014), además de reacciones enzimáticas como hidroxilaciones, metilaciones, acetilaciones y glicosilaciones (Palacios et al., 2004).

Pueden agruparse en cuatro clases principales, Terpenos (entre los que se encuentran hormonas esteroideas, pigmentos o aceites esenciales), Compuestos fenólicos (cumarinas, flavonoides, lignina y taninos), Glicósidos (saponinas, glicósidos

cardiacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos) y Alcaloides (Ávalos y Pérez, 2009).

Debido a la presencia de estos compuestos en las células vegetales, las plantas son usadas como fuente de productos de importancia comercial, usándolos en la industria alimenticia, cosmética, agroquímica y farmacéutica (Naivy y Jiménez, 2011), donde pueden ser útiles por su acción directa como agentes terapéuticos, pueden servir como modelos para la preparación de sustancias bioactivas y como materia prima para la síntesis de nuevos fármacos, debido a que son capaces de interactuar con diversas moléculas dentro de la célula y realizar acciones útiles para la salud en procesos patológicos (Gutiérrez y Estévez, 2009).

3.7.1 Alcaloides

Los alcaloides son un amplio grupo de compuestos orgánicos (Granados, Ruíz y Barrera, 2008) con alrededor de 15,000 metabolitos secundarios (Méndez et al., 2014) de origen natural, (mayoritariamente vegetal) con propiedades alcalinas, siendo casi siempre incoloros y normalmente sólidos a temperatura ambiente (Arango, 2008). En su estructura contienen un anillo heterocíclico con un átomo de nitrógeno (Jin, Jiao, Xiu, Min y Yi, 2012), aunque existen algunos compuestos nitrogenados alifáticos (no cíclicos) como por ejemplo la mezcalina o colchicina (Méndez et al., 2014).

En general, los alcaloides son moléculas relativamente pequeñas (Granados et al., 2008) que se sintetizan a partir de aminoácidos, tales como triptófano, tirosina, fenilalanina, lisina, arginina y ornitina, solos o combinados con terpenoides; también se pueden derivar de purinas y del acetato de los policétidos (Sepúlveda, Porta y Rocha, 2003).

En cuanto a su estado natural los alcaloides son esencialmente sustancias presentes en todos los órganos de la planta, pueden encontrarse mayoritariamente en hojas, flores, frutos, semilla, corteza, y raíz (Arango, 2008). Tienen una amplia distribución en el reino vegetal y existen principalmente en plantas superiores (Jin et al., 2012), encontrándolos aproximadamente en el 20% de las plantas vasculares (Méndez et al., 2014), pero son altamente específicos para las especies de plantas o grupo de especies en las que se encuentran (Granados et al., 2008).

La diversidad estructural y la variedad en la actividad biológica, de los alcaloides, hacen que sea uno de los grupos, más importantes entre las sustancias naturales de interés terapéutico (Arango, 2008).

En humanos, los alcaloides generan respuestas fisiológicas y psicológicas (Méndez et al., 2014) debido a sus importantes actividades biológicas, como la acción de alivio de efedrina para el asma, la acción analgésica de la morfina (Jin et al., 2012), la actividad antioxidante de las betacianinas (Sepúlveda et al., 2003), y los efectos anticancerígenos de la vinblastina. De hecho, los alcaloides están entre los componentes activos más importantes en las plantas y algunos de estos compuestos ya se han desarrollado con éxito en fármacos quimioterapéuticos (Jin et al., 2012).



Alcaloide Monocrotalina

Entre el género *Crotalaria*, la *Crotalaria retusa* muestra altos niveles de un metabolito tóxico, el alcaloide de pirrolizidina monocrotalina (MCT) (Pitanga et al., 2011) que causa efectos hepatotóxicos en animales y en el hombre (Ribeiro et al., 2012). Dado que presentan efectos antinutritivos sobre insectos herbívoros, se considera que este alcaloide es parte de las estrategias defensivas de las especies vegetales que los producen (ELIKA, 2013).

Se postula que para realizar su efecto tóxico, los alcaloides de pirrolizidina necesitan ser bioactivados por el sistema enzimático del citocromo P-450 presentes principalmente en el hígado, los pulmones y el cerebro produciendo la generación de intermediarios pirrolicos electrofílicos como la deshidropirrolizidina (DHPA).

Aunque el MCT se reconoce principalmente por sus efectos hepatotóxicos y neumotóxicos in vivo algunas pruebas sugieren que también puede tener efectos neurotóxicos. Estudios más recientes demuestran que este alcaloide posee una extensa propiedad genotóxica en células gliales. El citocromo P-450 ha sido identificado en el cerebro de muchas especies como roedores, ganado vacuno, cerdos, caballos y en el cerebro de humanos (Pitanga et al., 2011).

La molécula del alcaloide de pirrolizidina (AP) comprende un heterociclo pirrolizidínico, con un grupo metilo y un sustituyente hidroxilo (necina). Existen 4 bases necinas básicas: platinecina, retronecina, heliotridina y otonecina (Fig. 7). Los alcaloides básicos parece ser que se acumulan más en las semillas mientras que los N-óxidos se concentrarían en las partes verdes de las plantas (ELIKA, 2013). Pero en general son las semillas las que contienen concentraciones más altas de monocrotalina que otras partes de la planta (Riet, Carvalho, Dantas y Medeiros, 2011).

Efectos en el ser humano

Tras la ingesta, los AP se absorben rápidamente en el tracto gastrointestinal. Después de la absorción, los AP se transforman, en un primer paso, en el hígado y, probablemente, después en los enterocitos del intestino delgado.

El principal efecto de la exposición a los AP en humanos se ha observado que es la denominada enfermedad veno-oclusiva hepática primaria.

La información epidemiológica disponible no indica un aumento del riesgo de cáncer en las poblaciones expuestas a los AP (ELIKA, 2013).

Los alcaloides de pirrolizidina especialmente, además de causar toxicidad, tienen propiedades medicinales.

Estos alcaloides tienen una actividad antitumoral. En algunos países se utilizan ampliamente especies del género *Crotalaria* para la preparación de muchos remedios de herbolario, infusiones o cocimientos (Beyra, Herrera y Junco, 1995).

La deshidromonocrotalina parece estar destoxificada por conjugación con glutatión (GSH). La deshidromonocrotalina inhibe la actividad del complejo I de la cadena respiratoria NADH oxidasa. El mecanismo probable es un cambio en la

conformación del complejo I resultante de la modificación de los grupos tiol cisteína por el metabolito (Ribeiro et al., 2012).

En el futuro, la investigación toxicológica basada en la estructura, proporcionará información para diseñar fármacos potentes con menos toxicidad. La elucidación estructural de los alcaloides de pirrolizidina tóxicos proporciona la base para la estructura basada en estudios toxicológicos y su modelado en el diseño de fármacos contra diversas enfermedades potentes además de la estimación de formulaciones farmacéuticas (Nakka, Veerendra y Nagaraju, 2013).

La técnica de extracción por ultrasonido de la monocrotalina ha demostrado ser altamente eficaz en la preparación de extractos de *Crotalaria retusa* con fines terapéuticos (Guerra et al., 2009).

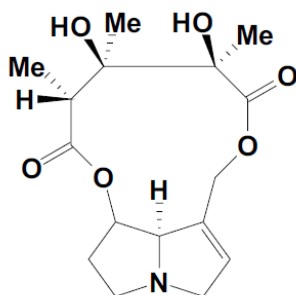


Fig. 7 Estructura química de monocrotalina.

3.7.2 Flavonoides

Los flavonoides, nombre que deriva del latín “flavus”, cuyo significado es “amarillo”, constituyen la subclase de polifenoles más abundante dentro del reino vegetal (Quiñones et al., 2012), forman un grupo de alrededor de 3,000 compuestos fenólicos que tienen una estructura química similar (Méndez et al., 2014) son responsables del buen funcionamiento de las plantas, protegiéndolas de radiaciones ultravioletas y de microorganismos fitopatógenos (Soto, 2015), son pigmentos vegetales (Bonilla, Varón y Garzón, 2014). Se oxidan fácilmente, por lo que constituyen potentes antioxidantes (Ojito et al., 2012) y sus beneficios para la salud humana han sido bien reconocidos en varios estudios (Soto, 2015).

Son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico) (Fig. 8) (Martínez, González, Culebras y Tuñón, 2002). Dependiendo del grado de oxidación y de sustitución del anillo pirano central pueden subdividirse en flavonas, flavonoles, flavanonas, isoflavonas, flavanos y antocianinas. El anillo pirano puede ser abierto (chalconas) y reciclado en un anillo furano (auronas) (Bonilla et al., 2014). Suelen encontrarse bajo la forma de glicósidos con una o tres unidades de azúcar, generalmente en los carbonos 3 y/o 7, siendo los azúcares más comunes la glucosa, galactosa, ramnosa, xilosa y arabinosa, es frecuente que diferentes azúcares se hallen unidos a una misma aglicona y en diferentes posiciones lo que hace mayor el número de glicósidos conocidos (Ruíz-

Reyes, Venegas, Chávez y Eustaquio, 2010). La parte sin azúcares de la molécula flavonoide se llama aglicona (Martínez et al., 2002).

Estos compuestos se encuentran en todas las plantas superiores, tanto en angiospermas como gimnospermas, acumulándose normalmente en las hojas (Bonilla et al., 2014).

Los efectos biológicos documentados de los flavonoides incluyen efectos antiinflamatorios, antialérgicos, antimicrobianos, inmunomoduladores, hepatoprotectores, antivirales, antitrombóticos, cardioprotectores, reforzadores capilares, antidiabéticos, anticancerígenos, y antineoplásicos, entre otros (Chithan et al., 2005).

La actividad antioxidante se asocia con sus características estructurales. Las estructuras que poseen grupos hidroxilos en las posiciones 3' y 4' del anillo B y OH en C-3 e insaturación del anillo C, permiten estructuras mesoméricas estables con capacidad eficiente de captura de radicales libres, requisito para una máxima capacidad antioxidante (Barrón, García, Soto, Colinas y Kite, 2011).

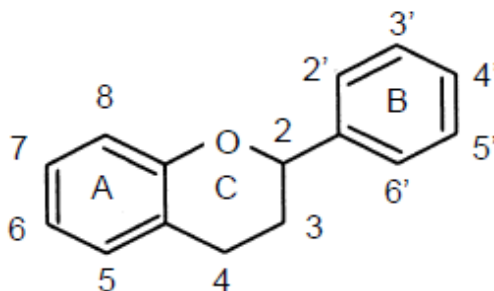


Fig. 8 Estructura general de un Flavonoide.

3.7.3 Glicósidos cardiotónicos

Los glicósidos cardiotónicos son sustancias constituidas de una porción esteroide, una porción glicosídica y un anillo de γ -lactona- α,β -insaturada o δ -lactona- α,β -insaturada, que actúan sobre el músculo cardíaco y por tanto se utilizan como medicamentos contra la insuficiencia cardíaca. Se conocen entonces según el anillo lactónico dos grandes clases de cardiotónicos: Los cardenolidos, con anillo de γ -lactona, y los bufanolidos o escilanolidos, con anillo de δ -lactona.

Los cardiotónicos naturales en su gran mayoría, poseen: un anillo lactónico α,β -insaturado en posición 17, un grupo hidroxilo en posición 14, configuración cis entre los anillos A/B y C/D, el grupo metilo 19 algunas veces oxidado hasta alcohol o aldehído, 1 a 4 unidades de carbohidrato ligadas al oxígeno del carbono 3 (Martínez, 2002), los carbohidratos ligados son principalmente glucosa y desoxiazúcares como ramnosa, digitalosa, etc. (Fig. 9) (Amaringo, Hormaza y Arias, 2011). Los desoxiazúcares son una característica importante de los glicósidos cardiotónicos, ya que esta clase de carbohidratos se encuentra prácticamente

restringida a estas sustancias naturales. Además, se ha observado que la presencia de azúcares ligados y el número de hidroxilos tienen capacidad en aumentar la actividad farmacológica. Su distribución natural es principalmente en las hojas de las especies vegetales (Martínez, 2002).

El uso con fines medicinales de los glicósidos cardíacos se informó por primera vez en los textos antiguos hace más de 1500 años. Se han utilizado tradicionalmente como venenos de flechas, abortivos, eméticos, diuréticos y tónicos cardíacos, siendo esta última la actividad farmacológica a la que se asocian más comúnmente, y después de 200 años, los compuestos tales como digitalis y digoxina son todavía prescritos por los doctores occidentales para el control de la insuficiencia cardíaca congestiva.

Actualmente se está dando a conocer el papel emergente de estos compuestos en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades proliferativas tales como el cáncer, representando una forma prometedora de quimioterapia de cáncer dirigida (Newman, Yang, Pawlus y Block, 2008).

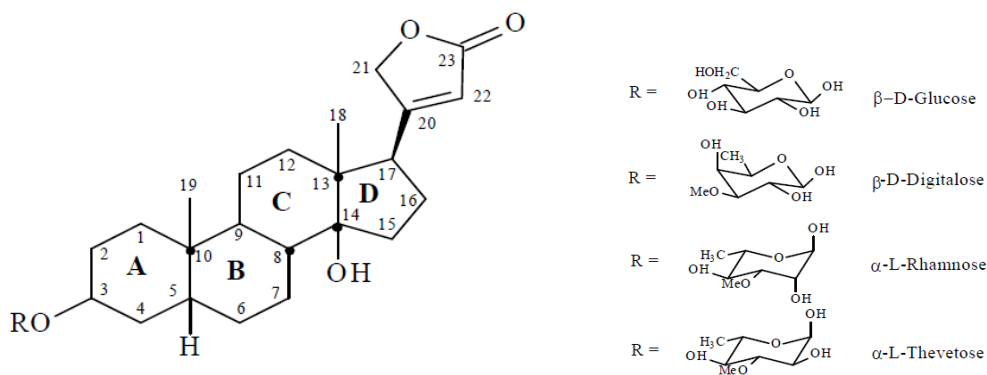


Fig. 9 Estructura general de un Glucósido cardiotónico y carbohidratos principalmente ligados al carbono 3.

3.7.4 Esteroides

Los Esteroides son metabolitos secundarios que poseen una estructura básica de cuatro anillos, con 17 átomos de carbono, tres anillos hexano y un anillo pentano (Cheirif, Sáez y Lammoglia, 2015), denominado ciclopentano perhidro fenantreno (Fig. 10) (Ruíz-Reyes et al., 2010).

En la naturaleza, ningún esteroide posee el núcleo simple del ciclopentanoperhidrofenantreno, el esteroide más simple que se conoce, presenta 18 átomos de carbono, que corresponde al núcleo de estrano (Ruíz-Reyes et al., 2010). Se conoce dentro de sus actividades farmacológicas que algunos esteroides bloquean la acción del estrógeno en la promoción de cáncer de seno (Hinojosa et al., 2013).

El ciclopentanoperhidrofenantreno, se puede modificar con múltiples procesos, como halogenización, metilación, acetilación o esterificación, para mejorar su efectividad y disminuir sus efectos secundarios. La halogenización consiste en añadir un átomo

de cloro o flúor en la posición C6 ó C9 del anillo básico, produciendo así efectos antiinflamatorios en la piel (Cheirif, et al., 2015),

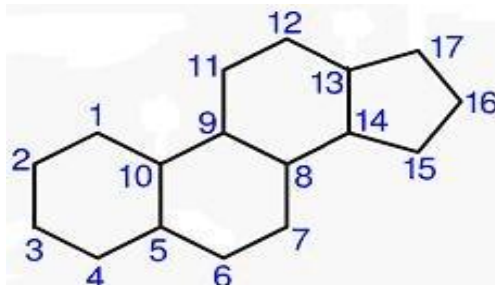


Fig. 10 Estructura general de un Esteroide

3.7.5 Polifenoles

Los compuestos fenólicos son compuestos derivados de complejas rutas metabólicas de origen mixto (shikimico-acetato y acetato-mevalonato), de reacciones enzimáticas como hidroxilaciones, metilaciones, acetilaciones y glicosilaciones (Sotelo, Casas y Camelo, 2010). La biosíntesis de los polifenoles mediante la ruta del ácido shikimico proporciona la síntesis de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina o tirosina), y la síntesis de los ácidos cinámicos y sus derivados (fenoles sencillos, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropano). La ruta de los poliacetatos proporciona las quinonas y las xantonas (Quiñones et al., 2012).

Los polifenoles se encuentran presentes en todas las plantas vasculares (Munin y Edwards, 2011). Su contenido varía de acuerdo con la especie, la variedad, el tipo de cultivo, el estado de maduración, la estacionalidad y la región geográfica, entre otros factores (Sotelo et al., 2010). Algunos son indispensables para las funciones fisiológicas vegetales. Otros participan en funciones de defensa ante situaciones de estrés y estímulos diversos (hídrico, luminoso, etc.) (Quiñones et al., 2012).

Presentan una estructura molecular caracterizada por la presencia de uno o varios anillos fenólicos (Quiñones et al., 2012) que llevan uno o varios grupos hidroxilo (Fig. 11) (Munin y Edwards, 2011). Se definen en función del número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que presentan estos anillos (Quiñones et al., 2012) por lo que se han agrupado en varias clases, dentro de cada una de estas clases, las variaciones alrededor del esqueleto químico básico se refieren esencialmente a los grados de oxidación, hidroxilación, metilación, glicosilación y posibles conexiones a otras moléculas (metabolitos primarios tales como carbohidratos, lípidos o proteínas) (Munin y Edwards, 2011). Los principales grupos de polifenoles son: ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides (Quiñones et al., 2012).

Se les atribuye una variada actividad farmacológica, en general asociada a la capacidad de actuar como agentes antioxidantes, secuestradores de radicales libres, antimicrobianos y antivirales (Sotelo et al., 2010), pueden presentar diferentes

mecanismos que se complementen o sean sinérgicos en la neutralización de los agentes oxidantes, estimulación del sistema inmune, regulación de la expresión de genes implicados en la proliferación y apoptosis celular, regulación del metabolismo de hormonas, efecto antiviral y antibacteriano (García et al., 2011).

Además de las propiedades específicas de algunas clases, todas comparten dos propiedades fundamentales que participan en sus capacidades antioxidantes: la interacción con proteínas o con iones, y la actividad de barrido radical. Los polifenoles pueden actuar utilizando diferentes modos de acción: por complejación molecular con proteínas prooxidantes, por quelación de iones metálicos potencialmente prooxidantes (Fe^{3+} , Al^{3+} , Cu^{2+}) o por atrapamiento directo de ERO. Entre sus propiedades, el fuerte poder antioxidante de los polifenoles es probablemente el más documentado (Munin y Edwards, 2011).

Por ello, en los últimos años el interés en los polifenoles se ha incrementado especialmente en nutriólogos, epidemiólogos y en la industria de los alimentos (García et al., 2011), pues con el potencial uso como agentes antioxidantes de origen natural pueden ayudar a prevenir y retardar el daño oxidativo en lípidos o proteínas y contribuir al estilo de vida saludable, porque el consumo de alimentos ricos en polifenoles está asociado a un menor riesgo de daño cardiovascular, formación de cáncer y envejecimiento prematuro (Sotelo et al., 2010).

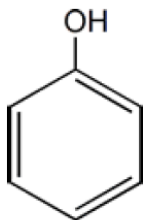


Fig. 11 Estructura general de un fenol.

3.7.6 Taninos

Los taninos son compuestos fenólicos de alto peso molecular (500-3,000 Daltons) que contienen suficientes hidroxilos y otros grupos (como los carboxilos) que les permiten formar complejos fuertes con proteínas, ácidos nucleicos, esteroides (Velásquez, s.a.), y otras macromoléculas (almidones, celulosas y minerales) (Dardon y Duran 2011), lo que les confiere una característica gustativa interesante, asociada al término globalmente conocido como astringencia o gusto tánico (Álvarez, 2007), se presentan como mezclas de polifenoles muy difíciles de separar; con el agua forman soluciones coloidales de reacción ácida (Venegas, 2012).

Están ampliamente distribuidos en muchos vegetales incluyendo árboles, frutas y pastos (Dardon y Duran, 2011) actuando como mecanismos de defensa de estas, contra organismos parásitos (Mora et al., 2012).

Su estructura es resultado de la combinación de una molécula de azúcar, generalmente glucosa, con un número variable de moléculas de ácidos fenólicos (Velásquez, s.a.).

De acuerdo a su comportamiento frente a los agentes hidrolíticos (principalmente ácidos minerales diluidos), los podemos dividir en: taninos hidrolizables y taninos condensados (Fig. 12) (Venegas, 2012). Los taninos hidrosolubles o pirogálicos son ésteres fácilmente hidrolizables formados por una molécula de azúcar (glucosa) unida a un número variable de moléculas de ácidos fenólicos (ácido gálico o su dímero, el ácido elágico). Los taninos no hidrosolubles ó condensados tienen una estructura química similar a la de los flavonoides (Mora et al., 2012), pues resultan de la condensación (polimerización) de unidades de flavanoles, tales como la catequina y la leucocianidina, quienes cumplirían el papel de precursores (Venegas, 2012). Por hidrólisis generan azúcar y ácido elágico, algunos taninos condensados son conocidos como pro-antocianidinas porque por hidrólisis ácida producen antocianidinas y leucoantocinidinas (Mora et al., 2012).

Cuentan con efectos benéficos para la salud debido a que poseen propiedades astringentes, antiinflamatorias, cicatrizantes, antioxidantes y antibacterianas, entre otros (Velásquez, s.a.). Se les considera compuestos con alto poder antirradicalario y capacidad para consumir oxígeno disuelto, atribuyéndole su propiedad antioxidante, muy utilizada en la industria agroalimentaria y farmacéutica, siendo más eficaces los taninos hidrolizables. Tienen además la capacidad de quelatar metales gracias a los grupos hidroxilo de sus núcleos fenólicos (Álvarez, 2007).

Sin embargo, en altas concentraciones, puede limitar la absorción y digestibilidad de algunos nutrientes, como es el caso del hierro y las proteínas (Velásquez, s.a.).

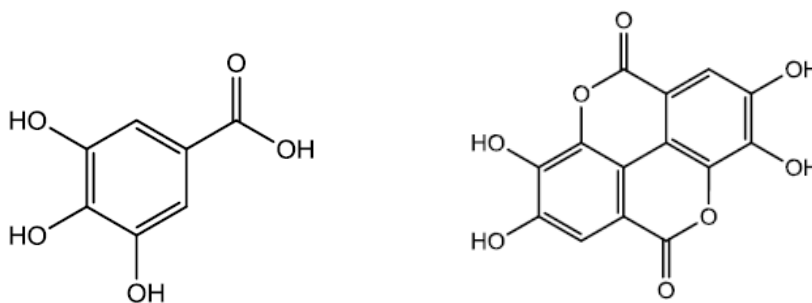


Fig. 12 Estructura de tanino hidrolizable, ácido gálico (izquierda) y tanino condensado ácido elágico (derecha).

3.7.7 Saponinas

El nombre de saponina viene del latín, *sapon* que significa jabón, y se refiere a la propiedad que tienen de disminuir la tensión superficial y formar espuma en soluciones acuosas (Mora et al., 2012).

Se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal habiéndose registrado su presencia en más de 500 especies pertenecientes a 80 familias diferentes (Rossi,

De León, González y Pereyra, 2007). Se han encontrado de forma natural en muchos tubérculos (Díaz, Ibarra y Jiménez, s.a.)

Estos glicósidos hidrosolubles, poseen propiedades hemolíticas, atribuido a su naturaleza anfílica (Mena et al., 2015), debido a esta característica de romper la pared celular de los glóbulos rojos de la sangre eran consideradas como nocivas para la salud pero en la actualidad se ha descubierto su efecto en la disminución del nivel de colesterol en sangre (Hinojosa et al., 2013). Se caracterizan también por un sabor amargo e inhibición de fauna microbiana (García, 2004)².

Estructuralmente son compuestos glicosídicos que contiene dos partes, una glicona y una aglicona. La parte glicona está compuesta por azúcares sencillos de 1 a 5 unidades; mientras que la parte aglicona, conocida como sapogenina, consta de un esqueleto del tipo esterooidal C27 o triterpenoide C30 (Guzmán, Cruz, Alvarado y Mollinedo, 2013). El enlace glicosídico siempre se forma con el oxígeno del carbono 3 (Fig. 13) (Mora et al., 2012).

Estos metabolitos también pueden ejercer una amplia actividad biológica y farmacológica, destacándose su efecto insecticida, anti-protozoos, antiinflamatorio, leishmanicida, anti-trichomonas, anti-agregante plaquetario, broncolítico, hipocolesterolémico, así como su actividad citotóxica frente a varias neoplasias (Mena et al., 2015).

Se emplean también como fuente de esteroides, para la elaboración de cortisona (antiinflamatorio), e incluso estrógeno y progesterona, o bien como suplemento alimenticio (Hernández, Lugo, Díaz y Villanueva, 2005).

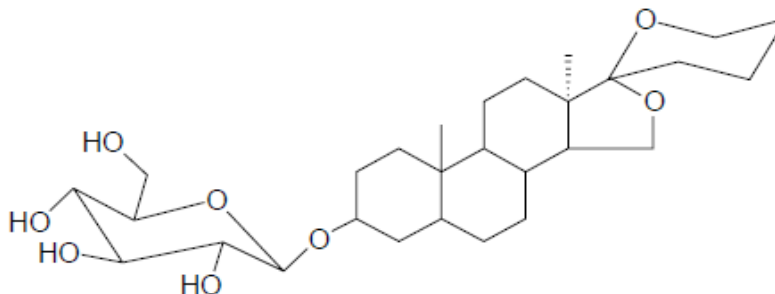


Fig. 13 Estructura general de una saponina.

3.7.8 Cumarinas

Las cumarinas son un grupo muy amplio de la familia de las lactonas, identificadas aproximadamente 1,500 en diferentes especies de plantas (Ávalos y Pérez, 2009), se caracterizan por presentar fluorescencia bajo la luz ultravioleta a 365nm (Mora et al., 2012). Estructuralmente pertenecen al grupo de compuestos conocidos como benzopironas, consistentes de un anillo benceno unido a una pirona (Fig. 14) (López et al., 2000). Se clasifican en cumarinas simples, furanocumarinas y pironacumarinas (Mora et al., 2012).

Estos compuestos se encuentran distribuidos en una gran variedad de plantas, su amplia distribución parece correlacionarse con la capacidad que poseen de inhibir el crecimiento de diversos patógenos en las plantas (López et al., 2000).

Se ha demostrado su uso como anticoagulante, antibacterial, antibiótica, entre otros (Hinojosa et al., 2013).

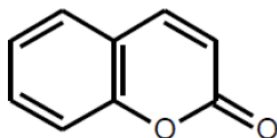


Fig. 14 Estructura general de una cumarina.

3.8 Familia Fabaceae

Fabaceae es la tercera familia más grande de plantas con flores después de Orchidaceae y Asteraceae, con aproximadamente 483 géneros y alrededor de 12,000 especies distribuidas principalmente en la región tropical y subtropical del mundo. La familia es importante en una gran diversidad de ecosistemas, algunas especies se encuentran dominantes en casi todos los tipos de vegetación en la tierra, desde bosques tropicales lluviosos hasta desiertos y tundra alpina (Gore y Gaikwad, 2015).

Algunos géneros de la familia Fabaceae son ricos en alcaloides de pirrolizidina que presentan propiedades antileucémicas, anti neoplásicas, antidiabéticas y anti-cardíacas (Nakka et al., 2013).

3.8.1 Género *Crotalaria*

El género *Crotalaria* L. (1753) ocupa el lugar 34 en una lista de los mayores géneros de angiospermas del mundo con aproximadamente 700 especies. De las 700 especies, alrededor de 500 son nativas de África y Madagascar, 80 de la India, 20 de Australia y 80 de América (Rockinger, Silva y Renner, 2017).

En América el espacio natural de género, va desde el sur de Estados Unidos hasta Uruguay, se citan 80 especies con 59 endémicas siendo 34 de América del sur; pues es un género con distribución en regiones tropicales y subtropicales, sobre todo hacia el hemisferio sur de todo el planeta (Magon, Kawakita, Sfoggia y Souza, 2013).

Todas las especies parecen tener un alto requerimiento de luz por lo cual están ausentes en los estratos inferiores del bosque, y son comunes en los claros, márgenes de ríos, pastizales, sabanas, colinas, quebradas y pantanos, pero crecen mucho mejor en lugares en los cuales el terreno ha sido perturbado, tales como áreas desmontadas, márgenes de bosques, orillas de carreteras y campos baldíos (Beyra et al., 1995).

Las *Crotalaria*s son herbáceas o arbustivas de baja estatura. Tienen flores y frutos llamativos (Rockinger et al., 2017), con corola predominantemente de color amarillo.



Sus frutos se inflan cuando está cerca de la dehiscencia, las semillas se encuentran libres en el interior, por lo que cuando se agitan produce un sonido similar a un sonajero o el traqueteo de la serpiente de cascabel. De esta característica se derivan los nombres populares de la mayor parte de sus especies, como sonajero, serpiente de cascabel, cascabelillo, cacahuatillo, Xique-Xique, etc. (Magon et al., 2013).

Las especies del género *Crotalaria* tienen considerable valor como forraje, ensilaje, abono verde, cobertura del suelo en el control de la erosión, ornamental y algunas especies constituyen importantes plantas productoras de fibras para la industria de la celulosa (Beyra et al., 1995). A nivel mundial, las especies más importantes para la agricultura como cultivos de cobertura o estiércol verde son: *Crotalaria grantiana* Harv., *Crotalaria juncea* L., *Crotalaria mucronata* Desv., *Crotalaria retusa* L., *Crotalaria spectabilis* Roth (Brunner, Martínez, Flores y Morales, 2009), por su acción como antagonistas de los nematodos (Nagaraju et al., 2012).

Sin embargo, las *Crotalarias* producen alcaloides de pirrolizidina tóxicos (AP), que son responsables de la intoxicación ocasional de ganado de pastoreo (Irmer et al., 2015).

Además de producir alcaloides de pirrolizidina también se informan que las *crotalarias* contienen algunos flavonoides, saponinas y esteroides (Talaviya, Vyas, Sharma, Indoria y Suman, 2014), que tienen propiedades antileucémicas, antitumorales, antiespasmódicas, antineoplásicas, cardiodepresoras e hipotensoras. Probándose el efecto de hojas contra la diarrea, la sarna y el impétigo, y de las semillas en enfermedades de la piel, lepra, flatulencia y fiebre (Nagaraju et al., 2012).

Efectos medicinales de algunas crotalarias:

Crotalaria aegyptiaca es una planta cultivada en Egipto que exhibe un efecto hipoglucémico.

Crotalaria verrucosa L. es una medicina herbal usada en la farmacopea tradicional de países asiáticos y africanos.

Estudios farmacológicos previos demostraron que el extracto de acetato de etilo de la parte aérea de *Crotalaria sessiliflora* exhibía actividades anti-peroxidantes, efectos protectores contra la acción bactericida del radical ter-butilperoxilo y actividad antimutagénica.

La actividad antiinflamatoria se demostró a partir de compuestos aislados de la corteza de *Crotalaria pallida*.

Se observaron efectos anticonceptivos significativos después de la administración de *Crotalaria juncea* (Ali, Elgindi, Abd, Mahmoud y Atia, 2004).

Tabla 1. Estudios farmacológicos de distintas especies del género *Crotalaria*

Especie	Efecto	Parte de la planta	Referencia
<i>Crotalaria aegyptica</i>	Actividad antioxidante, antiinflamatoria y analgésica	Hojas	Ali et al., 2004
<i>Crotalaria verrucosa</i>	Actividad cicatrizante	Hoja	Kumari, Eesha, Amberkar, Rajshekar, & Kumar, 2010.
<i>Crotalaria juncea</i> Linn.	Actividad antioxidante, antiinflamatoria, antibacteriana	Aceite de semilla	Chouhan, Sahu y Singh, 2011
<i>Crotalaria burhia</i>	Actividad antiinflamatoria	Raíz	Talaviya et al., 2014
<i>Crotalaria albida</i>	Actividad antagonista de PPAR- γ (receptores activados por proliferadores de peroxisomas) de los isoflavonoides	Planta completa	Qinhu y Guixin, 2015
<i>Crotalaria retusa</i> , <i>Crotalaria alata</i> , <i>Crotalaria prostrata</i> , <i>Crotalaria verrucosa</i>	Propiedades anticoagulantes	Hojas	Sumi et al., 2015

3.8.2 Clasificación de *Crotalaria retusa*

Dominio: Eukaryota
Reino: Plantae
Filo: Spermatophyta
Subphylum: Angiospermas
Clase: Dicotiledóneas
Orden: Fabales
Familia: Fabaceae
Subfamilia: Faboideae
Género: *Crotalaria*
Especie: *retusa*

Nombres comunes: Tronador, Zapatitos, Cacahuatillo

3.8.3 Descripción morfológica

Crotalaria retusa es una hierba de 0.30 a 1.60 m de altura; sus tallos son sólidos y las ramas jóvenes son escasamente a densamente peludas; las hojas son alternas, simples, pecioladas, con pecíolos de 0.2-0.4 cm de longitud; inflorescencia terminal,

multifloral, axilar, opuesta a la hoja y más larga que esta (Pinto y Ruíz, 1986); brácteas muy pequeñas o ausentes; flores zigomorfas, pétalos separados, amarillos con manchas moradas, vinosas o rojo violáceo, estambres de 9 a 10, anteras dimorfas, estilo terete y peludo; fruto legumbre, unilocular, libremente dehiscente, alargado, recto, oblongo, peludo; semillas ovoides lisas, de color marrón o negro (<http://botany.si.edu/bdg/medicinal/index.html>).

Floración y fructificación: septiembre-enero

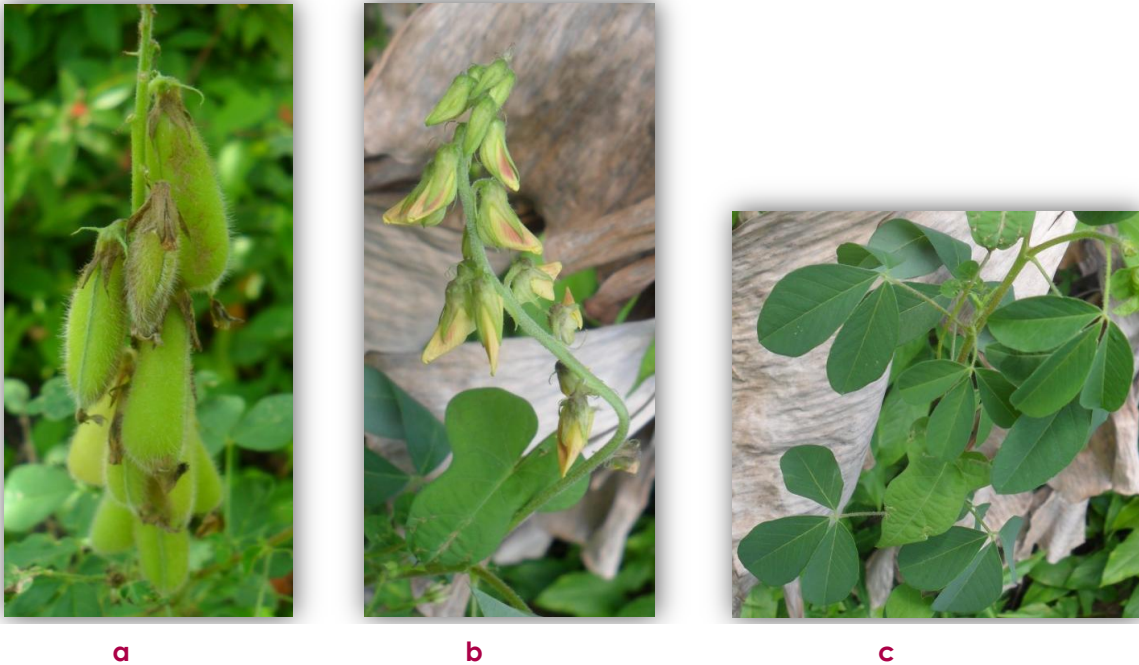


Fig. 15 *Crotalaria retusa*. a Fruto oblongo; b Inflorescencia amarilla con manchas rojas; c Hojas simples. Fotografías tomadas en Limón Chiquito, Veracruz, septiembre 2015.

3.8.4 Distribución geográfica y habitat

Es nativa de Asia o de África oriental costera y se encuentra en las zonas cálidas en todo el mundo (Riet et al., 2011).

Esta especie es ahora pantropical en su distribución debido a su uso como cultivos de fibras y estiércol verde (Rockinger et al., 2017).

3.8.5 Usos

Existen diversos usos citados para la especie, como: fertilizante orgánico, ornamental, forrajes, en la lucha contra nematodos, en los programas de revegetación de áreas contaminadas con sustancias tóxicas como el arsénico, en la industria textil, en la producción de fibras para fabricación de papel, en la medicina popular y actividades farmacológicas (Magon et al., 2013).

La planta entera es usada como infusión para bañar a los niños y prevenir infecciones de la piel. La hoja y la flor en una decocción se usan para calmar el resfriado. Las semillas crudas se usan como un analgésico para picaduras de escorpión. Las raíces se utilizan contra la tos con sangre.

(<http://tropical.theferns.info/viewtropical.php?id=Crotalaria+retusa>,
<http://botany.si.edu/bdg/medicinal/index.html>)

3.9 Estudios de *Crotalaria retusa*

Tabla 2. Estudios farmacológicos de *Crotalaria retusa*.

Parte de la planta	Efecto	Referencia
Semillas	Intoxicación aguda	(Nobre et al., 2005)
Planta completa/hojas	Propiedades antibacterianas, antifúngicas y antivirales	(Maregesi et al., 2008)
Hojas	Actividad Leishmanicida	(Guerra et al., 2009)
Hojas secas y en polvo	Actividad antipolimerizante de antocianinas. Drepanocitosis (anemia de células falciformes)	(Mpiana et al., 2009)
Semillas	Citotoxicidad, cambios morfológicos en célula, peroxidación de macromoléculas, inducción de daño a ADN y nivel de expresión de proteínas asociadas a microtúbulos.	(Silva et al., 2010)
Semillas	Intoxicación	(Leite et al., 2010)
Semillas	Citotoxicidad, cambios en la estructura de la neurona y la corteza glial, viabilidad de células.	(Pitanga et al., 2011)
Semillas	Envenenamiento	(Riet et al., 2011)
Plantas propagadas in vitro e in vivo (hoja)	Actividad antimicrobiana y antioxidante	(Nagaraju, Srinivas y Sandeep, 2012)
Semillas	Daño histológico y actividad oxidante en áreas cerebrales de ratones	(Ribeiro et al, 2012)
Semillas	Necrosis centrilobular hepática	(Maia et al., 2013)
Hoja seca	Anticoagulante	(Sumi et al., 2015)



IV. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad se sabe que existen muchos factores que afectan a las células ocasionando cáncer; el estrés oxidativo ha cobrado importancia debido a su capacidad para reaccionar con distintas biomoléculas generando daños permanentes al ADN implicados en la carcinogénesis. Para el tratamiento de esta enfermedad, han sido empleados diferentes agentes citotóxicos y radioterapias, tratamientos que no son selectivos y afectan tanto a células cancerígenas como a las normales, además de generar una mayor cantidad de radicales libres, ocasionando efectos adversos.

Es por esto, que se ha incrementado la búsqueda de nuevas moléculas, que puedan demostrar eficacia y disminución de los contra efectos que presenta el manejo de esta enfermedad.

Por lo que el presente estudio se enfoca en el potencial antioxidante de los extractos de *Crotalaria retusa* sobre la regulación del estrés oxidativo.



V. HIPÓTESIS

Los extractos de *Crotalaria retusa* estimularán una respuesta antioxidante debido a la presencia de moléculas capaces de modificar el potencial redox en el sistema.

VI. OBJETIVOS

6.1 General

- Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos de *Crotalaria retusa* en un modelo murino de cáncer por medio de marcadores de estrés oxidativo.

6.2 Particulares

- Realizar un registro etnobotánico de *Crotalaria retusa* en el Ejido de Limón Chiquito en Cazones de Herrera Veracruz.
- Elaborar los extractos acuosos e hidroalcohólicos (75:25) de hoja, tallo, raíz y planta completa de *Crotalaria retusa*.
- Cuantificar los azúcares totales presentes en *Crotalaria retusa* por el método de Dubois.
- Realizar un análisis fitoquímico preliminar de los extractos acuosos e hidroalcohólicos de hoja, tallo, raíz y planta completa de *Crotalaria retusa*.
- Cuantificar los metabolitos identificados en los extractos acuosos e hidroalcohólicos.
- Cuantificar la actividad enzimática de la catalasa en plasma y homogenado de hígado de ratones
- Determinar la concentración de nitritos en plasma y homogenado de hígado de ratones
- Analizar el daño en membrana celular cuantificando la peroxidación lipídica en plasma y homogenado de hígado de ratones

VII. MÉTODO

7.1 Localidad de la colecta

Crotalaria retusa fue colectada en el mes de septiembre del 2015 en la localidad de Limón Chiquito, Cazonos de Herrera Veracruz ($20^{\circ}40'58''$ N, $97^{\circ}16'30''$ O, a 15msnm).

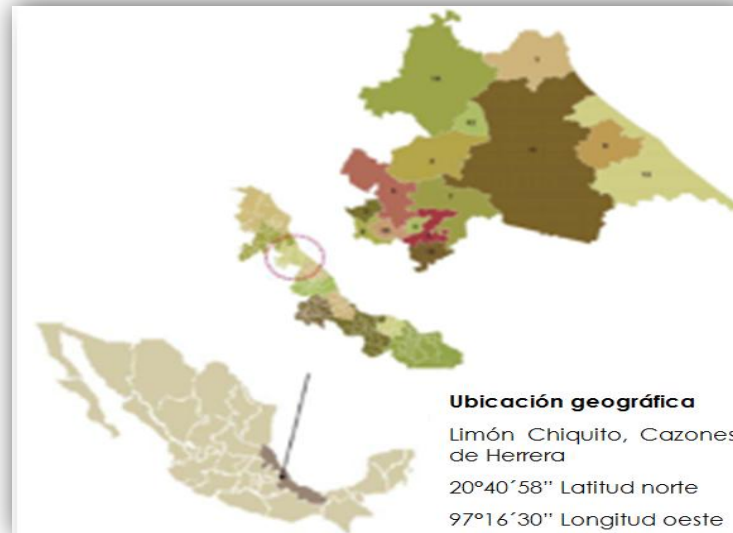


Fig. 16 Mapa de Limón Chiquito, Cazonos de Herrera Veracruz.

7.2 Registro de información etnobotánica

La información etnobotánica de esta especie se recabó mediante una entrevista dirigida al curandero de la localidad que tiene el conocimiento de todas aquellas especies que son usadas como medicinales por los habitantes de Limón Chiquito, Cazonos de Herrera Veracruz.

7.3 Colecta de la planta

Se colectaron ejemplares de *Crotalaria retusa* que incluían flor, fruto y las partes vegetativas de la planta; de igual manera se colectaron ejemplares completos para prensarlos y herborizarlos, siendo estos representativos, saludables y con las hojas completamente expandidas. Las plantas fueron colectadas en su hábitad típico. Las flores y las semillas se colocaron separadas en bolsas pequeñas de papeles.



Fig. 17 Colecta de *Crotalaria retusa* en hábitad natural.

7.4 Procesamiento del material vegetal

Una vez colectada la especie, se procedió a separar y pesar las hojas, el tallo y la raíz, para posteriormente enjuagarlas con agua destilada y obtener el extracto líquido.

7.5 Obtención de extractos

● Extracto acuoso

Se realizó un cocimiento de 100g de material vegetal fresco y triturado de cada estructura (hoja, tallo, raíz y planta completa) en 1L de agua destilada. Pasados 5 minutos de ebullición se retiró el material vegetal y se preservó en frascos ámbar dentro de un cuarto frío.

● Extracto hidroalcohólico

Cada 100g de material vegetal fresco y triturado de cada estructura (hoja, tallo, raíz y planta completa) fue colocada en 1L de una solución etanol-agua (75:25) y se preservaron en frascos ámbar.



Fig. 18 Procesamiento vegetal. **a** Enjuague del material vegetal; **b** Cocción de raíz para extracto acuoso; **c** Cocción de hojas para extracto acuoso; **d** Macerado del material vegetal.

7.6 Obtención del extracto sólido

Cada 50mL de los extractos acuosos e hidroalcohólicos fueron colocados en cristalizadores a temperatura ambiente en una campana de extracción para la obtención del extracto sólido.

7.7 Cuantificación de azúcares totales presentes en *Crotalaria retusa*

El método propuesto por Dubois se fundamenta en que los carbohidratos son particularmente sensibles a ácidos fuertes y a altas temperaturas. Bajo estas condiciones una serie de reacciones complejas toman lugar empezando con la deshidratación simple, si se continúa el calentamiento y la catálisis ácida, se



producen varios derivados del furano que condensan consigo mismos y otros subproductos para producir compuestos coloridos producto de la condensación de compuestos fenólicos. La condensación más común es con fenol (Ávila, Rivas, Hernández y Chirinos, 2012).

Todos los azúcares como oligosacáridos y polisacáridos pueden ser determinados, recordando que éstos bajo hidrólisis ácida producen monosacáridos. La concentración de azúcares totales se determina a través de una curva de calibración de la absorbancia en función de la concentración para la cual se preparan soluciones de 10-100µg/L utilizando Glucosa como estándar (Ávila et al., 2012).

Como blanco para las lecturas se utilizó agua destilada aplicándole el mismo tratamiento. Para la aplicación del método Dubois (Método Fenol-Sulfúrico), a la curva de calibración y a los extractos se les agregó 1.8mL de ácido sulfúrico, y 0.3mL de Fenol (Ávila et al., 2012).

7.8 Análisis fitoquímico preliminar

Identificación de metabolitos secundarios

Se tomaron muestras de 500µL de cada extracto y posteriormente se les agregó el reactivo correspondiente para la identificación de cada metabolito.

A partir de los extractos se desarrollaron las pruebas coloridas para la identificación de los compuestos presentes.

7.8.1 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 (Arango, 2008).

- Reactivo de Dragendorff

Se disuelven 2g de nitrato de bismuto pentahidratado en 5mL de ácido nítrico al 30%, esta se mezcla con una solución de 6.8g de yoduro de potasio (KI) en 12.5mL de agua; posteriormente se deja en reposo por 24 horas, se decanta y afora a 25mL. La prueba es positiva para alcaloides al dar precipitado naranja o rojizo (Arango, 2008).

- Reactivo de Wagner

Se disuelven 0.31g de yodo sublimado en 25mL de agua y 0.5g de yoduro de potasio. La prueba es positiva para alcaloides al dar precipitado naranja o rojizo (Arango, 2008).

- Reactivo de Mayer



Se disuelven 0.65g de bicloruro de mercurio en 30mL de agua y 2.5g de yoduro de potasio y se afora a 50mL. La prueba es positiva para alcaloides si se presenta un precipitado blanco o de color crema (Arango, 2008).

7.8.2 Flavonoides

Los flavonoides son estructuras tipo C₆-C₃-C₆ con dos anillos aromáticos (bencénicos) unidos entre sí por una cadena de 3 carbonos cicladas a través de un oxígeno, solubles en mezclas hidroalcohólicas. Estos pueden formar complejos con metales como Mg²⁺ y Fe³⁺, que al acidularlas viran a reacciones coloridas (Nagaraju et al, 2012).

- Reactivo de Shinoda

Las muestras de los extractos serán tratadas con limadura de magnesio (tres) y posteriormente se agrega gota a gota ácido clorhídrico hasta una coloración rojiza, naranja o violeta que significa positivo para flavonoides (Nagaraju et al., 2012).

7.8.3 Glicósidos Cardiotónicos

Para la identificación de glicósidos cardiotónicos se analiza el núcleo esteroide, la lactona α -insaturada y la posible presencia de desoxiazúcares en el caso de Glicósidos.

- Prueba de Baljet

Se disuelven 0.125g de ácido pícrico (C₆H₃N₃O₇) en 12.5mL de etanol y 1.25g de hidróxido de sodio (NaOH) en 12.5mL de agua. Ambas soluciones se mezclan y se agregan a la muestra. La prueba es positiva cuando se presenta un precipitado o coloración rojiza (Domínguez, 1979).

- Prueba de Keller-Killiani

Se disuelve 1g de cloruro de hierro hexahidratado al 2% en ácido acético, posteriormente se aplica 1mL a la muestra e inmediatamente se adiciona gota a gota ácido sulfúrico. La reacción se considera positiva al existir la formación de una coloración verde o parda (Domínguez, 1979).

7.8.4 Esteroides

- Prueba de Lieberman-Burchard

Se mezcla 1mL de cloroformo y 1mL de anhídrido acético. Se agrega este reactivo a la muestra y posteriormente se agregan gotas de ácido sulfúrico. La muestra vira a coloración roja-naranja en presencia de núcleo triterpenico; en cambio si la coloración es azul-verde, indica la presencia de núcleo esteroide (Hinojosa et al., 2013).

7.8.5 Polifenoles

El método de Folin-Ciocalteu se basa en la oxidación de los fenoles, en medio básico, mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu (mezcla de complejos de los ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico), produciéndose, por reducción del reactivo, una mezcla de complejos de wolframio y molibdeno que presenta una coloración azul característica que es detectada espectrofotométricamente (García, 2004)¹.

- Método de Folin Ciocalteu

Las muestras son tratadas con 0.5mL del reactivo de Folin-Ciocalteu y 2mL de carbonato de sodio. La coloración azul indica la presencia de polifenoles (García, 2004)¹.

7.8.6 Taninos

- Prueba de gelatina sal

Se disuelven 0.25g de grenetina en 25mL de agua, en una solución al 10% de cloruro de sodio, la prueba se considera positiva si existe la formación de un precipitado blanco (García, 2004)¹.

- Prueba de cloruro férrico

Se añaden 2-5 gotas de cloruro férrico hexahidratado al 10%. La aparición de una coloración verde, azul o negra es positiva.

7.8.7 Saponinas

Las saponinas se caracterizan por un sabor amargo, las propiedades espumantes, su efecto hemolítico sobre los glóbulos rojos y la inhibición de la fauna microbiana (García, 2004)¹.

- Prueba de la espuma

Se añade 1mL de agua caliente a la muestra e inmediatamente se agita vigorosamente hasta la formación de espuma. La prueba es positiva si transcurrido un tiempo de dejarlo de agitar se mantiene la espuma (García, 2004)¹.

7.8.8 Cumarinas

- Prueba de hidroxamato férrico

Se prepara una solución de clorhidrato de hidroxilamina 2% etanol e hidróxido de sodio, se calienta de 2-5 minutos a 100°C hasta la aparición de una espuma de color rojizo, posteriormente se enfría y acidula con ácido clorhídrico y se añade cloruro de hierro. La prueba es positiva si se observa una coloración rojiza (Hinojosa et al., 2013).

7.9 Cuantificación de metabolitos secundarios

La cuantificación de los metabolitos se realizó a partir de los resultados obtenidos de la identificación de dichos metabolitos, cuantificando únicamente aquellos que fueron encontrados en los extractos de *Crotalaria retusa*.

7.9.1 Alcaloides

La cuantificación de alcaloides se realizó utilizando cafeína como patrón. El método se fundamenta con la formación de un complejo de transferencia de carga alcaloide-verde de bromocresol a un pH 4.7, que absorbe a 420nm. El complejo obtenido es muy estable y es nula o escasa la interferencia por otros compuestos (Oropeza, 2012).

REACTIVOS

Cafeína 10PPM, ácido cítrico 0.2 M, buffer de fosfato (p/v) pH 4.7, NaOH 1N, verde de bromocresol (p/v/v).

CURVA DE CALIBRACIÓN

Estándares de cafeína PPM:

Se preparó un stock de cafeína a 10PPM. A partir de ella se prepararon los estándares de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1PPM.

Se siguió el siguiente tratamiento para la curva de calibración y los extractos:

1. Se adicionan 2mL de buffer de fosfato, 2mL de disolución de verde de bromocresol y 1mL de CHCl_3 y se mezclan.
2. La fase clorofórmica se separa.
3. A la fase acuosa se le adiciona 1mL de CHCl_3 , se agita y se realiza la segunda extracción. Se repite el procedimiento hasta haber utilizado un volumen de 5mL de CHCl_3 .
4. La absorbancia del extracto y del estándar se leyó a 420nm en un espectrofotómetro.

Como blanco para las lecturas se utilizó CHCl_3 aplicándole el mismo tratamiento.

La cuantificación de alcaloides se expresa como equivalentes a cafeína/100g de muestra seca (Oropeza, 2012).

7.9.2 Flavonoides

La cuantificación de flavonoides se realizó utilizando quercetina 0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ como patrón.

REACTIVOS

Quercetina 0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, etanol 95%, cloruro de aluminio (AlCl_3) 10%, acetato de potasio ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$) 1M.

CURVA DE CALIBRACIÓN

Estándares de quercetina µg/mL:

Se preparó un stock de quercetina a 0.8µg/mL. A partir de este se prepararon estándares de 0.016, 0.032, 0.048, 0.064 y 0.08 µg/mL.

Se siguió el siguiente tratamiento para la curva de calibración y los extractos (Chia, Ming, Hwei y Jiing, 2002):

1. Se adiciona el stock a las concentraciones establecidas y se completa el volumen a 1mL con agua (de los extractos se tomó 100 µL).
2. A cada tubo se agrega 1.5mL de etanol, 100µL de AlCl₃, 100µL de CH₃CO₂K y 800µL de agua.
3. Se incuban en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos e inmediatamente se mide la absorbancia a 415nm en el espectrofotómetro.

Como blanco para las lecturas se utilizó agua aplicándole el mismo tratamiento.

La cuantificación de flavonoides se expresa como equivalentes de quercetina (Barrón et al., 2011).

7.9.3 Glicósidos cardiotónicos

La cuantificación de Glicósidos cardiotónicos se realizó con un estándar de digoxina

REACTIVOS

Digoxina 0.04mg/mL, ácido pícrico 1%, hidróxido de sodio 10%, etanol.

STOCK DE DIGOXINA

Estándar de digoxina mg/mL:

Se preparó una disolución patrón de digoxina a 0.04mg/mL. De esta disolución tomar 5mL y agregar 3mL de solución alcalina de picrato de sodio, protegerlo de la luz durante 30 minutos y determinar la absorbancia a 495nm.

Como blanco se utilizó una mezcla de 5mL de alcohol y 3mL de solución alcalina de picrato de sodio (Abrego y Honles, 2012).

Para los extractos, se tomaron 50µL del extracto, 2.45mL de etanol y 1.5mL de la solución alcalina de picrato de sodio, pasados los 30 minutos se leyó la absorbancia a 495nm.

El cálculo de la cantidad en mg de glicósidos cardiotónicos presentes en cada muestra se realizó utilizando la siguiente fórmula (Abrego y Honles, 2012):

$$C_{Mx} = \frac{(C_{St})(A_{Mx})}{A_{St}} \times FD$$

Donde:

C_{mx} = Cantidad de glicósidos cardiótonicos en la muestra.

C_{st} = Concentración del estándar de digoxina.



A_{mx} = Absorbancia de la muestra.
 A_{st} = Absorbancia del estándar.
FD= Factor de dilución de la muestra (100).

La cuantificación de glicósidos cardiotónicos se expresa como equivalentes a digoxina.

7.9.4 Esteroides

La cuantificación de esteroides se realizó utilizando Colesterol a 10mM como patrón. Se utilizó la técnica de Lieberman Buchard (Lobato et al., 2008).

REACTIVOS

Colesterol 10mM, cloroformo, reactivo de Liebermann.

CURVA DE CALIBRACIÓN

Estándares de colesterol mM:

Se preparó un stock de colesterol a 10mM. A partir de ella se prepararon los estándares de 0, 2, 4, 6 y 8 mM

Para la aplicación del método de Liebermann Buchard, a la curva de calibración y a los extractos se les aplicó el siguiente tratamiento (Lobato et al., 2008):

1. Se tomaron los estándares de colesterol y se completó el volumen a 5mL con cloroformo
2. Se adicionan 5mL del reactivo de Liebermann Buchard.
3. Se incubó en baño maría durante 10 minutos a 35°C durante. Se dejó enfriar y se leyó la absorbancia a 550nm.

Como blanco para las lecturas se utiliza $CHCl_3$ aplicándole el mismo tratamiento.

La cuantificación de esteroides se expresa como equivalentes a colesterol.

7.9.5 Polifenoles

La cuantificación de polifenoles se realizó utilizando ácido gálico 0.2mM como patrón. El método se fundamenta en la oxidación de los fenoles en medio básico, mediante el reactivo de Folin Ciocalteu (Dardon y Duran, 2011).

REACTIVOS

Ácido gálico 0.2mM, reactivo de Folin-Ciocalteu, carbonato de sodio 7%.

CURVA DE CALIBRACIÓN

Estándares de ácido gálico mM:

Se preparó un stock de ácido gálico a 0.2mM. A partir de ella se prepararon los estándares de 0.02, 0.04, 0.08, 0.1, 0.15, 0.2mM.

Se siguió el siguiente tratamiento para la curva de calibración y para los extractos (Sotelo, et al., 2010):



1. Se adicionan 0.5mL del reactivo de Folin-Ciocalteu y 1.5mL de Carbonato de sodio
2. Las muestras se ponen en baño maria a 50°C durante 15 minutos.
3. La absorbancia del extracto y de la curva se lee a 750nm.

Como blanco para las lecturas se utilizó agua aplicándole el mismo tratamiento.

La cuantificación de polifenoles se expresa como equivalentes a ácido gálico (Sotelo et al., 2010).

7.9.6 Taninos

La cuantificación de taninos se realizó utilizando ácido tánico 0.1mg/mL como patrón.

Se utilizó en método de Folin-Ciocalteu, basado en la oxidación de los fenoles en medio básico, mediante el reactivo de Folin Ciocalteu (mezcla de complejos de los ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico), produciéndose por reducción del reactivo una mezcla de complejos de wolframio y molibdeno que presentan una coloración azul característica que es detectada espectrofotométricamente (Dardon y Duran, 2011).

El reactivo de Folin Ciocalteu es una solución ácida de polímeros complejos en los ácidos fosfomolibdico y fosfowolfrámico. Este reactivo, de color amarillo, oxida los fenolatos, reduciéndose los ácidos del reactivo, para dar lugar a un complejo azul de molibdeno-wolframio (Dardon y Duran, 2011).

En este proceso se produce una reducción parcial del estado de valencia de molibdeno y wolframio de +6 a +5 por los fenoles en un álcali acuoso. Este método determina la totalidad de grupos fenólicos libres y por consiguiente determina la totalidad de fenoles solubles como taninos hidrolizados y taninos condensados (Dardon y Duran, 2011).

REACTIVOS

Ácido tánico 0.1mg/mL, reactivo de Folin-Ciocalteu 1N, Carbonato de sodio 20%, Polivinilpirrolidona insoluble (PVPP).

CURVA DE CALIBRACIÓN

Estándares de ácido Tánico mg/mL:

Se preparó el stock de ácido tánico (0.1mg/mL), preparando a partir de ella estándares de 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 y 0.10 mg/mL.

Se siguió el siguiente tratamiento para la curva de calibración y los extractos (Dardon y Duran, 2011):

1. Tomar una alícuota de 500µL del extracto en los tubos de ensayo, llevar a un volumen de 2.5mL con agua destilada, adicionar 0.25mL del reactivo de Folin-Ciocalteu y 1.25mL de solución de carbonato de sodio.



2. Agitar los tubos y leer la absorbancia a una longitud de onda de 725nm después de 40 minutos en reposo.
3. Calcular la cantidad de polifenoles como equivalente de ácido tánico comparándolos con los valores obtenidos en la curva de calibración estándar de Acido tánico

Separación de taninos del extracto

1. Pesar 100 mg de PVPP (Polivinilpirrolidona).
2. Adicionar 1mL de agua destilada y luego 1mL de extracto.
3. Agitar cuidadosamente en forma circular los tubos de ensayo.
4. Mantener los tubos a temperatura de 4°C por 15 minutos y agitarlos nuevamente en forma circular, luego centrifugar los tubos a 3000 RPM por 10 minutos.
5. Recolectar el sobrenadante. (Este sobrenadante sólo tiene fenoles que no son taninos).
6. Agregar los reactivos utilizados para la cuantificación de polifenoles
7. Medir el contenido de fenoles simples a una longitud de onda de 725 nm después de 40 minutos en reposo.

Muchas investigaciones emplean polivinilpirrolidona (PVPP) para absorber estos tipos de metabolitos. Este polímero (insoluble en medio acuoso) enlaza a todos los taninos, dejando en solución los fenoles que no son taninos; la concentración de los taninos se obtiene por diferencia a partir de la determinación directa de los fenoles simples y los polifenoles, a la concentración de polifenoles se le resta la concentración de fenoles simples y el resultado será expresado como taninos totales equivalentes de ácido tánico (Dardon y Duran, 2011).

Como blanco para las lecturas se utilizó agua aplicándole el mismo tratamiento.

La cuantificación de taninos se expresa como equivalentes a ácido tánico.

7.9.7 Saponinas

La cuantificación de saponinas se realizó utilizando sapogenina a 20mg/mL como patrón. Se utilizó la técnica de Lieberman Buchard (Ramos, Paz y Ortiz, 2014).

REACTIVOS

Sapogenina 20mg/mL, anhídrido acético, ácido sulfúrico al 16%.

CURVA DE CALIBRACIÓN

Estándares de sapogenina mg/mL:

Se preparó un stock de sapogenina a 20mg/mL. A partir de ella se preparan los estándares de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 Y 20mg/mL.

Para la aplicación del método de anhídrido acético, a la curva de calibración y a los extractos se les aplicara el siguiente tratamiento (Ramos et al., 2014):

1. Se tomaron los estándares de sapogenina y se completó el volumen a 1mL con agua.
2. Se adicionan 2mL del reactivo de anhídrido acético y ácido sulfúrico 16%.

3. Se dejó reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 485nm.

Como blanco para las lecturas se utiliza agua aplicándole el mismo tratamiento.

La cuantificación de saponinas se expresa como equivalentes a sapogenina.

7.10 Inducción del carcinoma y tratamiento a modelos experimentales

Para cumplir con el objetivo de esta investigación se utilizaron 60 ratones hembra de la cepa CD-1 con los que se formaron 10 grupos experimentales.

Al momento de la inducción de cáncer los ratones tenían dos meses de edad; se les administró oralmente una única dosis de DMBA diluido en aceite de oliva a una concentración de 2.72mg de DMBA por 30g de peso de ratón manteniéndolos en observación durante tres meses, registrando semanalmente el peso de cada uno.

Al concluir los tres meses del periodo de inducción de cáncer con DMBA se aplicó a los ratones los diferentes extractos acuosos e hidroalcohólicos de *Crotalaria retusa* eligiendo a aquellos que tuvieron mayor presencia de los diferentes metabolitos secundarios, las dosis se eligieron a partir de la IC₅₀ (57.6µg/mL) y de la dosis usada en la localidad de Limón Chiquito (40µg/mL). La duración del tratamiento se eligió a partir de la información recabada en la encuesta dirigida al curandero de la localidad de Limón Chiquito.

El tratamiento fue administrado diariamente durante 20 días, después de los cuales se sacrificó a los ratones por decapitación. Características individuales de cada grupo tabla 3.



Fig. 19 Administración oral de DMBA para la inducción de cáncer de mama.

Tabla 3. Diseño experimental

Grupo		Característica
Control		Ratones con desarrollo normal.
Vehículo		Se les administró vía oral vehículo en el momento de la inducción de cáncer (50µl de aceite de oliva).
DMBA		Se les administró una única vez 50µl DMBA diluido en aceite de oliva vía oral.
Extracto hoja acuoso		Se les administró diariamente vía oral 25µl del extracto de hoja acuoso a una concentración de 0.0432g/mL durante los 20 días de tratamiento.
Extracto planta completa acuoso		Se les administró diariamente vía oral 25µl del extracto de planta completa acuoso a una concentración de 0.032g/mL durante los 20 días de tratamiento.
Extracto tallo acuoso		Se les administró diariamente vía oral 25µl del extracto de tallo acuoso a una concentración de 0.0124g/mL durante los 20 días de tratamiento.
Extracto hoja hidroalcohólico		Se les administró diariamente vía oral 25µl del extracto de hoja hidroalcohólico a una concentración de 0.432g/mL durante los 20 días de tratamiento.
DMBA+Extracto hoja acuoso		Se les administró una única vez 50µl DMBA diluido en aceite de oliva vía oral, se mantuvieron en observación por tres meses y durante 20 días se les aplicó vía oral 25µl del extracto de hoja acuoso a una concentración de 0.0432g/mL.
DMBA+Extracto planta completa acuoso		Se les administró una única vez 50µl DMBA diluido en aceite de oliva vía oral, se mantuvieron en observación por tres meses y durante 20 días se les aplicó vía oral 25µl del extracto de planta completa acuoso a una concentración de 0.032g/mL.
DMBA+Extracto tallo acuoso		Se les administró una única vez 50µl DMBA diluido en aceite de oliva vía oral, se mantuvieron en observación por tres meses y durante 20 días se les aplicó vía oral 25µl del extracto de tallo acuoso a una concentración de 0.0124g/mL.

Durante el desarrollo experimental se siguieron las normas establecidas por la Ley Mexicana de Protección animal para el Uso de Animales de Experimentación (NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones Técnicas para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio).

7.11 Obtención de plasma sanguíneo y homogenado de hígado

Se sacrificó a los ratones por el método de decapitación y se colectó la sangre en tubos vacutainer con EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético) y fueron colocados inmediatamente en hielo para centrifugarlos a 3000rpm durante 15 minutos.

Se extrajo cuidadosamente el hígado de cada ratón colocándolos en solución fisiológica y en hielo. Se perfundió cada hígado con solución fisiológica hasta que quedara completamente libre de sangre. Los hígados se sumergieron en amortiguador PBS para la maceración en morteros de porcelana con una proporción de 5mL de amortiguador por cada gramo de hígado. El macerado del hígado se filtró con una doble capa de gasa y posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos.

Se utilizó el plasma y el sobrenadante del macerado de hígado para realizar las pruebas biológicas.

Durante la disección a los ratones se observó microscópicamente cada órgano, extirpando los tumores de los órganos que presentaran masa tumoral, posteriormente los tumores fueron pesados y preservados en formol. De igual forma se hizo observación a bazo y pulmón, extrayendo aquellos que presentaran alguna anomalía en tamaño y color.

Reactivos del Homogeneizado (amortiguador PBS)

TRIS-HCL (pH 7.5) 100Mm, Glicerol 5%, 2-mercaptoetanol 1mM, EDTA disódico 2mM.

7.12 Cuantificación de proteína total por el método de Biuret

Se realizó por el método de Biuret. Basado en la formación de un complejo coloreado entre el Cu^{2+} y los grupos NH de los enlaces peptídicos en medio básico. 1 Cu^{2+} se acompleja con cuatro grupos NH. La intensidad de coloración es directamente proporcional a la cantidad de proteínas (enlace peptídicos) y la reacción es bastante específica, de manera que pocas sustancias interfieren (Fernández y Galván, s.a.).

Se elaboró una curva patrón con BSA (Albúmina sérica bovina), en un rango de 1 a 10mg/mL, teniendo como volumen final 1mL, a lo cual se le añadirá 4mL del reactivo de Biuret. Para la cuantificación se tomaran 100 μL de las muestras completando el volumen a 1mL, dando el mismo tratamiento que a la curva patrón. Las absorbancias se leyeron a 545nm después de 20 minutos de incubación en la oscuridad.

Preparación del reactivo de Biuret:

Pesar 1.5g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 6.0 g. de tartrato de sodio y potasio, disolver en 500mL de agua destilada, adicionaron 300mL de una solución de NaOH 2.5M, adicionar 1g de Yoduro de potasio (KI), aforar a 1000mL con agua destilada

El reactivo se puede guardar en un frasco ámbar y conservar en refrigeración (Valencia, Cuéllar, Aguilar, Salmerón y Rodríguez, 2012).



Fig. 20 Curva de cuantificación de proteínas por el método de Biuret

7.13 Cuantificación de nitritos en plasma y homogenado de hígado

El óxido nítrico es un mensajero fisiológico y regulador molecular en muchos de los sistemas orgánicos como el inmunológico, neuronal y cardiovascular. Debido a que está involucrado en todos estos sistemas se puede comprender por qué la determinación del NO en líquidos y tejidos corporales ha cobrado muchas fuerzas en los últimos años (Gallardo, s.a.).

En grandes cantidades, el \bullet NO mata cualquier tipo de célula, inhibe el crecimiento de muchos patógenos incluyendo bacterias, hongos y parásitos, en especial patógenos intracelulares; posee además, un papel importante en el sistema inmunológico y en la inflamación (Ruíz, Andamayo, Castillo, Ruíz y Navarro, 2010).

La cuantificación de \bullet NO es difícil en medios biológicos, debido a su corta vida media (de 6 a 10 segundos) y a sus bajas concentraciones y por eso se cuantifican sus metabolitos estables: nitrito y nitrato (Adarmes, Solís, Müller y Galleguillos, 2009).

Se determinó la concentración de nitrito utilizando la reacción de Griess, que detecta específicamente nitrito y no a nitrato.

El reactivo de Griess se preparó mezclando una solución de N-1-(naftil) etilendiamina dihidrocloruro (0.2% p/v en agua) con una solución de sulfanilamida (1% en ácido fosfórico al 5%).

Se elaboró una curva patrón con NaNO_2 1mM, en un rango de 0 a 1mM, teniendo como volumen final 1mL, a lo cual se le añadirá 2mL de del reactivo de Griess. Para la cuantificación se tomaran 100 μL de las muestras completando el volumen a 1mL, dando el mismo tratamiento que a la curva patrón. Se leerá a 540nm después de cinco minutos de incubación en la oscuridad (Adarmes et al., 2009).

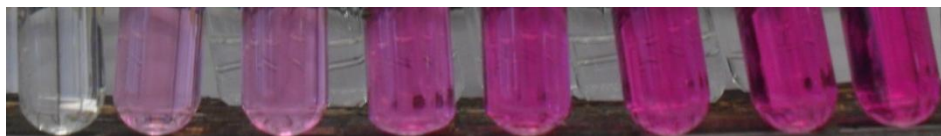


Fig. 21 Curva de calibración de nitritos

7.14 Actividad enzimática de catalasa por el método de Chance y Machely

La actividad enzimática de la catalasa se realizó midiendo la descomposición del peróxido de hidrógeno 30mM a 240nm en amortiguador PBS (Díaz et al, 2010)



Se colocaron 3mL del sustrato y 25 μ L de muestra, resuspendiendo cuidadosamente y leyendo inmediatamente en espectrofotómetro UV a 240nm, se registró la absorbancia obtenida cada 10 segundos durante 1 minuto.

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

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

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

7.15 Cuantificación de peroxidación lipídica en plasma y homogenado de hígado

Como indicador directo del daño celular y de la peroxidación lipídica se utiliza el MDA, que es uno de los productos finales de la reacción, y cuya determinación en tejidos, plasma u orina, es uno de los métodos principales para evaluar el estrés oxidativo (Rojas y Martínez, 2010). La cuantificación de peroxidación lipídica se realizó por el método de TBARS.

Se tomaron 100 μ L de muestra, 100 μ L de buffer TRIS-HCL, 100 μ L de sulfato de hierro FeSO_4 y 100 μ L de ácido ascórbico, se completó el volumen a 1mL con agua destilada y se puso a incubar por 15 minutos a 37°C, se añadió 1mL de TCA y 2mL de TBA y se puso a incubar por 15 minutos a 100°C, posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos y se leyó la absorbancia del sobrenadante a 532nm.

Se empleó el coeficiente de extinción molar de malondialdehído para obtener la concentración. Con la siguiente ecuación

$$C = A_{532} / \epsilon P$$

Donde ϵ es el coeficiente de extinción molar del MDA a 532nm ($155\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y P es el grosor de la fotocelda (1cm).

Reactivos

Ácido ascórbico 1.5mM, Sulfato de hierro 1mM, TCA (10%) ácido tricloroacético, TBA ácido tiobarbitúrico, TRIS 150mM.

7.16 Análisis estadístico

Los resultados se sometieron a un análisis estadístico ANOVA, considerando un nivel de confianza de $p < 0.05$.

VIII. RESULTADOS

8.1 Registro de información etnobotánica

El resultado de la entrevista dirigida al curandero de la localidad abarcó cuatro puntos importantes como: el uso medicinal que le dan a la planta, parte de la planta que utilizan en la localidad, forma de uso y tiempo de tratamiento; arrojando como resultado lo siguiente:

Tabla 4. Información recaudada de la entrevista dirigida

Nombre común	Cacahuatillo
Uso medicinal que le dan a la planta	Inflamación y dolor en el riñón
Parte de la planta utilizada	Planta completa
Forma de uso	Té
Tiempo de tratamiento	Hasta que se sienta mejoría

8.2 Rendimiento de los extractos acuosos e hidroalcohólicos de *Crotalaria retusa*

El rendimiento obtenido por cada uno de los extractos se calculó mediante la siguiente reacción:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{P}{m} \cdot 100$$

Donde P es el peso del extracto seco obtenido (g) y m es el peso del material vegetal (g) (Tolosa y Cañizares, 2002). En la tabla 5 se muestran el rendimiento de los extractos de las diferentes estructuras vegetales.

Tabla 5. Rendimiento de los ocho extractos de *Crotalaria retusa*

Rendimiento de los extractos (%)				
Extracto	Hoja	Tallo	Raíz	Planta completa
Acuoso	3.849%	1.193%	0.453%	1.238%
Hidroalcohólico	7.690%	2.400%	0.226%	1.437%



A.H A.T A.R A.P.C H.H H.T H.R H.P.C

Fig. 22 Color de los extractos acuosos e hidroalcohólicos de *Crotalaria retusa*

8.3 Cuantificación de azúcares totales presentes en *Crotalaria retusa*

Se realizó la cuantificación de los azúcares presentes en los extractos de hoja, tallo, raíz y planta completa de *Crotalaria retusa* debido a su importancia al momento de proporcionar energía a la planta para realizar trabajo metabólico y crecimiento, entre otras actividades importantes.

Tabla 6. Concentración de azúcares totales en extractos de *Crotalaria retusa*.

Extracto	Concentración
1. Acuoso hoja	70.93µg/ml
2. Acuoso tallo	57.61µg/ml
3. Acuoso raíz	61.70µg/ml
4. Acuoso P.C.	45.07µg/ml
5. Hidroalcohólico hoja	53.88µg/ml
6. Hidroalcohólico tallo	34.71µg/ml
7. Hidroalcohólico raíz	50.36µg/ml
8. Hidroalcohólico P.C.	26.94µg/ml



Blanco A.H A.T A.R A.P.C H.H H.T H.R H.P.C

Fig. 23 Color de los extractos acuosos e hidroalcohólicos de *Crotalaria retusa* al cuantificar carbohidratos comparados con la muestra blanco.

8.4 Análisis fitoquímico preliminar de los extractos de *Crotalaria retusa*

Los extractos fueron sometidos a diferentes reacciones coloridas específicas para la evaluación de los metabolitos secundarios de interés. A partir del extracto seco obtenido se preparó cada extracto a una concentración de 0.01g/mL y de este se tomaron 500µL para la realización de las pruebas colorimétricas de identificación.

Como resultado se obtuvo la presencia de Alcaloides, Flavonoides, Glicósidos cardiotónicos, Esteroides, Polifenoles, Taninos y Saponinas en extractos acuosos (Tabla 7).

Tabla 7. Identificación de metabolitos secundarios en extractos acuosos

Metabolito	Prueba	Acuoso hoja	Acuoso tallo	Acuoso raíz	Acuoso P. C.
Alcaloides	Dragendorff	++	-	+	+++
	Wagner	+	+	+	+++
	Mayer	-	+	+	+++
Flavonoides	Shinoda	+++	-	-	+++
Glicósidos cardiotónicos	Baljet	++	-	++	++
	Keller-Killani	+	-	-	+
Esteroides	Lieberman B.	+++	++	+	++
Polifenoles	Folin-Ciocalteu	+++	+++	++	++
Taninos	Gelatina-sal	++	++	++	+++
	Cloruro férrico	+++	++	+	+++
Saponinas	Espuma	+++	++	+	+
Cumarinas	Hidroxamato férrico	-	-	-	-

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

De igual forma se identificaron Alcaloides, Flavonoides, Glicósidos cardiotónicos, Esteroides, Polifenoles, Taninos y Saponinas en extractos hidroalcohólicos (Tabla 8). Siendo fácil reconocer que los extractos acuosos fueron los que arrastraron mayor número de metabolitos secundarios.

Tabla 8. Identificación de metabolitos secundarios en extractos hidroalcohólicos

Metabolito	Prueba	H. A. hoja	H. A. tallo	H.A. raíz	H. A. P.C.
Alcaloides	Dragendorff	++	-	+	++
	Wagner	+	+	+	+
	Mayer	+++	+	++	+++
Flavonoides	Shinoda	-	-	+	-
Glicósidos cardiotónicos	Baljet	++	+++	+	++
	Keller-Killani	+	+	+	+
Esteroides	Lieberman B.	+++	++	+	++
Polifenoles	Folin ciocalteu	++	++	-	++
Taninos	Gelatina-sal	++	+	-	-
	Cloruro férrico	+++	-	-	-
Saponinas	Espuma	-	++	-	-
Cumarinas	Hidroxamato férrico	-	-	-	-

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

Para cada estructura de la planta los metabolitos secundarios identificados fueron diversos (Fig. 23), identificando mayor presencia en el extracto acuoso de planta completa, destacando por resultar positivo a siete de los ocho metabolitos durante las pruebas colorimétricas. Este extracto acuoso de planta completa está preparado como se utiliza en la localidad de Limón Chiquito.

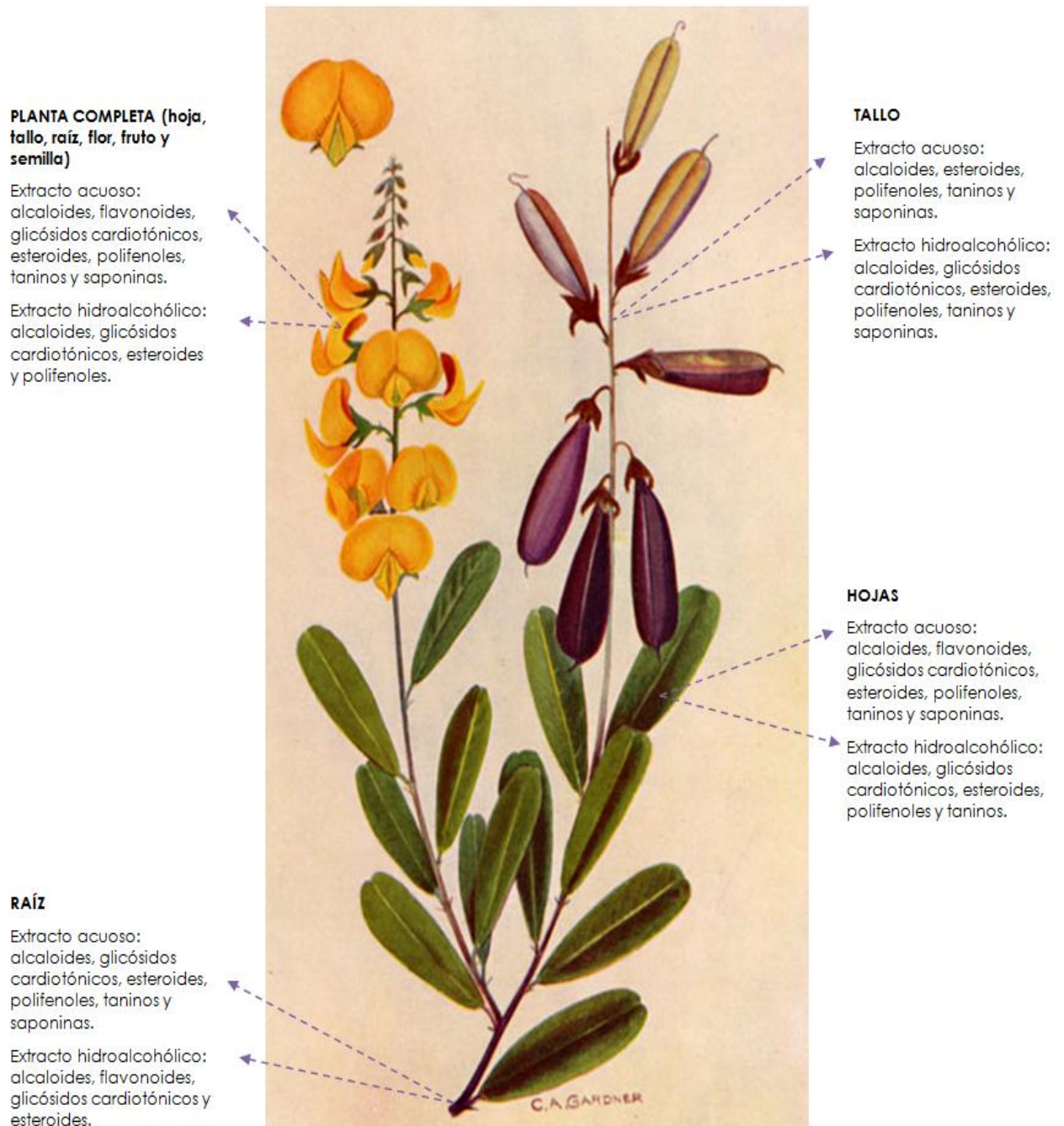
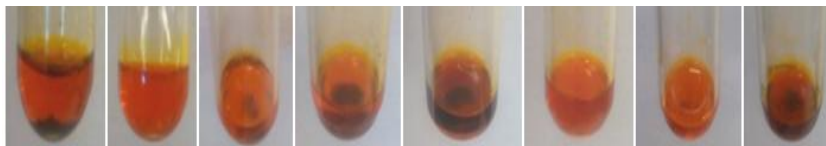


Fig. 24 Metabolitos secundarios identificados en cada uno de las estructuras de *Crotalaria retusa*. Imagen originalmente publicada en *The toxic Plants of Western Australia* (1956). Tomada y modificada de <https://www.anbg.gov.au/gallery/crotalaria-retusa-gardner-c-a.html>

En la siguiente figura se muestra la coloración que toma cada extracto después de someterlos a las pruebas colorimétricas de identificación. Los tubos se encuentran en el siguiente orden: acuoso hoja (A.H), acuoso tallo (A.T), acuoso raíz (A.R), acuoso planta completa (A.P.C), hidroalcohólico hoja (H.H), hidroalcohólico tallo (H.T), hidroalcohólico raíz (H.R), hidroalcohólico planta completa (H.P.C).

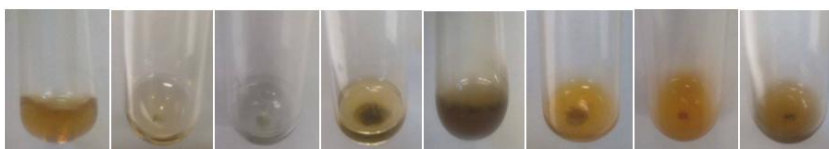
Alcaloides

Reactivo de Dragendorff. La prueba es positiva al dar precipitado naranja o rojizo.



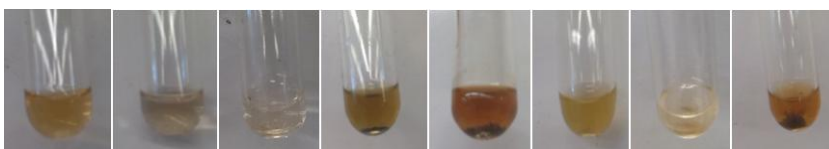
A.H A.T A.R A.P.C H.H H.T H.R H.P.C

Reactivo de Wagner. La prueba es positiva al dar precipitado naranja o rojizo.



A.H A.T A.R A.P.C H.H H.T H.R H.P.C

Reactivo de Mayer. La prueba es positiva si se presenta un precipitado blanco o color crema.



A.H A.T A.R A.P.C H.H H.T H.R H.P.C

Flavonoides

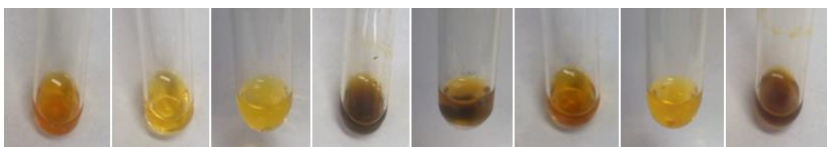
Reactivo de Shinoda. La prueba es positiva si hay coloración rojiza, naranja o violeta.



A.H A.T A.R A.P.C H.H H.T H.R H.P.C

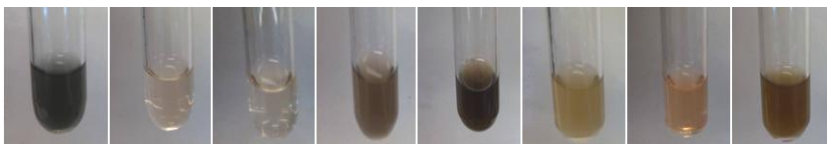
Glicósidos cardiotónicos

Prueba de Baljet. La prueba es positiva si se presenta un precipitado o coloración rojiza.



A.H A.T A.R A.P.C H.H H.T H.R H.P.C

Prueba de Keller-Killiani. La prueba es positiva si hay coloración verde o parda.



A.H A.T A.R A.P.C H.H H.T H.R H.P.C

Esteroides

Prueba de Lieberman-Burchard. La muestra vira a roja-naranja en presencia de núcleo triterpenico, si la coloración es azul-verde, indica la presencia de núcleo esteroide.



A.H A.T A.R A.P.C H.H H.T H.R H.P.C

Polifenoles

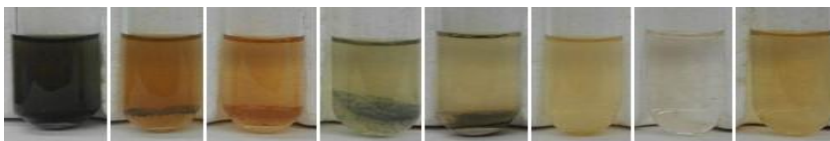
Método de Folin Ciocalteu. La prueba es positiva cuando hay coloración azul.



A.H A.T A.R A.P.C H.H H.T H.R H.P.C

Taninos

Prueba de gelatina sal. La prueba es positiva en presencia de precipitado blanco.



A.H A.T A.R A.P.C H.H H.T H.R H.P.C

Reacción de cloruro férrico. La prueba es positiva con coloración verde, azul o negra.



A.H A.T A.R A.P.C H.H H.T H.R H.P.C

Saponinas

Prueba de la espuma. La prueba es positiva si transcurrido un tiempo de dejarlo de agitar se mantiene la espuma.



A.H A.T A.R A.P.C H.H H.T H.R H.P.C

Cumarinas

Prueba de hidroxamato férrico. La prueba es positiva si se observa una coloración rojiza



A.H A.T A.R A.P.C H.H H.T H.R H.P.C

Fig. 25 Pruebas de identificación de metabolitos secundarios en los extractos acuosos e hidroalcohólicos de *Crotalaria retusa*.

8.5 Cuantificación de metabolitos secundarios

Posterior al análisis fitoquímico preliminar de los extractos de *Crotalaria retusa* se cuantificaron los metabolitos secundarios que dieron como positivo a las pruebas colorimétricas en los extractos. A partir del extracto seco obtenido se preparó cada extracto a una concentración de 0.01g/mL y de este se tomaron 50µL para la realización de las pruebas de cuantificación.

En la siguiente tabla se muestran las cantidades expresadas en µg/mL de metabolito para cada extracto.

Tabla 9. Concentración de metabolitos secundarios en los extractos de *Crotalaria retusa*.

Metabolito (expresados como equivalentes)	Extracto	Concentración µg/mL			
		Hoja	Tallo	Raíz	Planta completa
Alcaloides (Cafeína)	Acuoso	237.109µg/mL	89.321µg/mL	57.923µg/mL	197.049µg/mL
	Hidroalcohólico	96.900µg/mL	74.434µg/mL	27.067µg/mL	117.201µg/mL
Flavonoides (Quercetina)	Acuoso	0.0429µg/mL	0.0076µg/mL	0.0046µg/mL	0.0180µg/mL
	Hidroalcohólico	0.0167µg/mL	0.0056µg/mL	0.0031µg/mL	0.0165µg/mL
Glicósidos cardiotónicos (Digoxina)	Acuoso	9.95µg/mL	4.55µg/mL	3.64µg/mL	4.61µg/mL
	Hidroalcohólico	9.62µg/mL	3.38µg/mL	1.56µg/mL	4.09µg/mL
Esteroides (Colesterol)	Acuoso	124.578µg/mL	36.534µg/mL	12.338µg/mL	56.61µg/mL
	Hidroalcohólico	144.204µg/mL	12.581µg/mL	2.899µg/mL	17.662µg/mL
Polifenoles (Ac. Gálico)	Acuoso	10.721µg/mL	8.483µg/mL	6.733µg/mL	6.639µg/mL
	Hidroalcohólico	14.803µg/mL	7.994µg/mL	0.771µg/mL	8.464µg/mL
Taninos (Ac. Tánico)	Acuoso	1.199µg/mL	1.722µg/mL	-	5.905µg/mL
	Hidroalcohólico	1.722µg/mL	0.984µg/mL	-	3.106µg/mL
Saponinas (Sapogenina)	Acuoso	11.938µg/mL	2.653µg/mL	4.438µg/mL	3.826µg/mL
	Hidroalcohólico	4.744µg/mL	1.938µg/mL	0.051µg/mL	2.959µg/mL

En la siguiente figura se muestra la coloración que toma cada extracto con las pruebas de cuantificación. Los tubos se encuentran en el siguiente orden: Blanco, acuoso hoja (A.H), acuoso tallo (A.T), acuoso raíz (A.R), acuoso planta completa (A.P.C), hidroalcohólico hoja (H.H), hidroalcohólico tallo (H.T), hidroalcohólico raíz (H.R), hidroalcohólico planta completa (H.P.C).

Alcaloides



Blanco A.H A.T A.R A.P.C H.H H.T H.R H.P.C

Flavonoides



Blanco A.H A.T A.R A.P.C H.H H.T H.R H.P.C

Glicósidos cardiotónicos



Blanco Digoxina A.H A.T A.R A.P.C H.H H.T H.R H.P.C

Esteroides



Blanco A.H A.T A.R A.P.C H.H H.T H.R H.P.C

Polifenoles



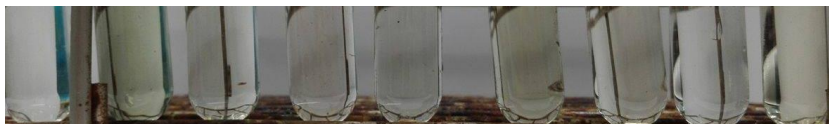
Blanco A.H A.T A.R A.P.C H.H H.T H.R H.P.C

Taninos



Blanco A.H A.T A.R A.P.C H.H H.T H.R H.P.C

Saponias



Blanco A.H A.T A.R A.P.C H.H H.T H.R H.P.C

Fig. 26 Pruebas de cuantificación de metabolitos secundarios en los extractos acuosos e hidroalcohólicos de *Crotalaria retusa*.

8.6 Seguimiento de la inducción del carcinoma

El peso de los ratones fue registrado semanalmente durante todo el desarrollo del experimento, observando en todos los grupos un aumento constante de peso. Al finalizar el experimento el grupo tratado con el extracto acuoso de planta completa presento durante todo el experimento pesos muy parecidos al grupo negativo tratado con DMBA (Gráfico 1). Los grupos tratados con extracto de hoja acuoso e hidroalcohólico mantuvieron un aumento de peso normal (Gráfico 2). El grupo tratado con el extracto acuoso de tallo fue el que presento el peso más bajo, siendo incluso más bajo que el grupo negativo tratado con DMBA, manteniéndose muy irregular durante todo el proceso (Gráfico 3).

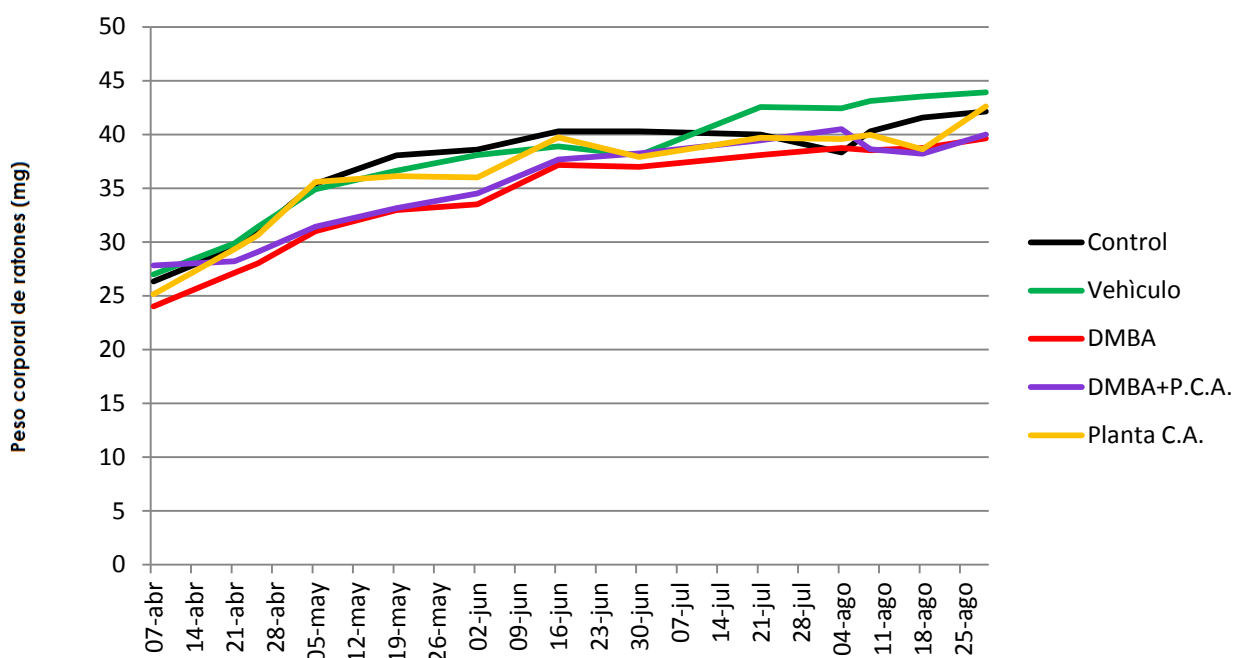


Gráfico 1. Peso corporal de ratones tratados con DMBA, extracto acuoso de Planta completa y DMBA+Planta completa acuoso.

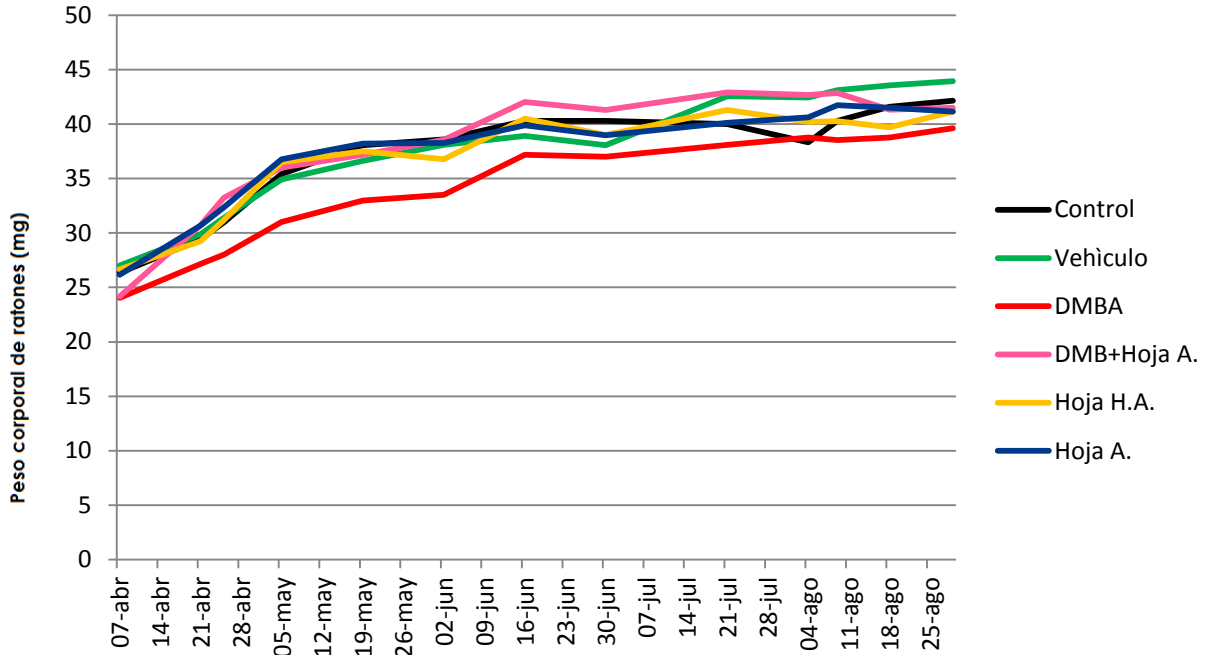


Gráfico 2. Peso corporal de ratones tratados con DMBA, extracto acuoso de Hoja, extracto hidroalcohólico de Hoja y DMBA + Hoja acuoso.

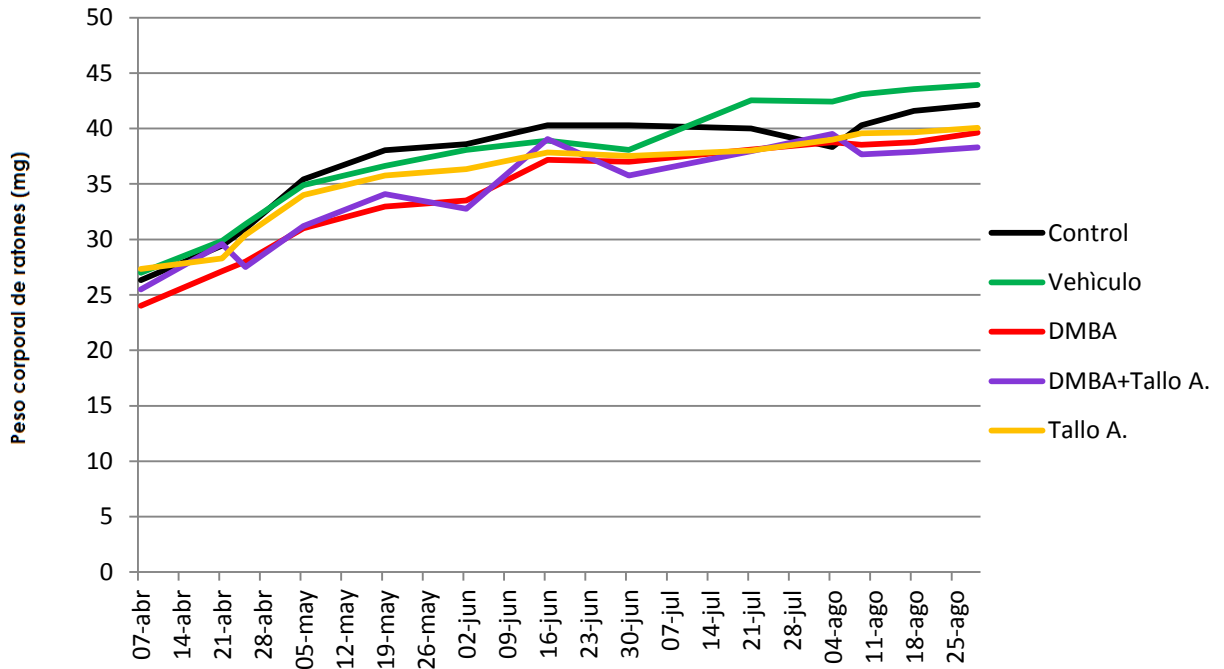


Gráfico 3. Peso corporal de ratones tratados con DMBA, extracto acuoso de Tallo y DMBA + Tallo acuoso.

8.7 Actividad enzimática de la catalasa en plasma y homogenado de hígado

Se observa que los tratamientos de hoja acuoso, y planta completa acuoso de *Crotalaria retusa* en los grupos experimentales inducidos a cáncer de mama con DMBA disminuyeron significativamente la actividad plasmática de catalasa con respecto al control positivo inducido a cáncer con DMBA, por el contrario el tratamiento con tallo acuoso del grupo inducido con cáncer no presentó disminución significativa de la actividad plasmática de catalasa.

Los resultados obtenidos de los grupos tratados únicamente con los extractos de *Crotalaria retusa* (sin inducción de cáncer) hoja hidroalcohólico, hoja acuoso, planta completa acuoso y tallo acuoso, mostraron una disminución significativa en la actividad plasmática de catalasa con respecto al control positivo inducido a cáncer de mama con DMBA (Gráfico 4).

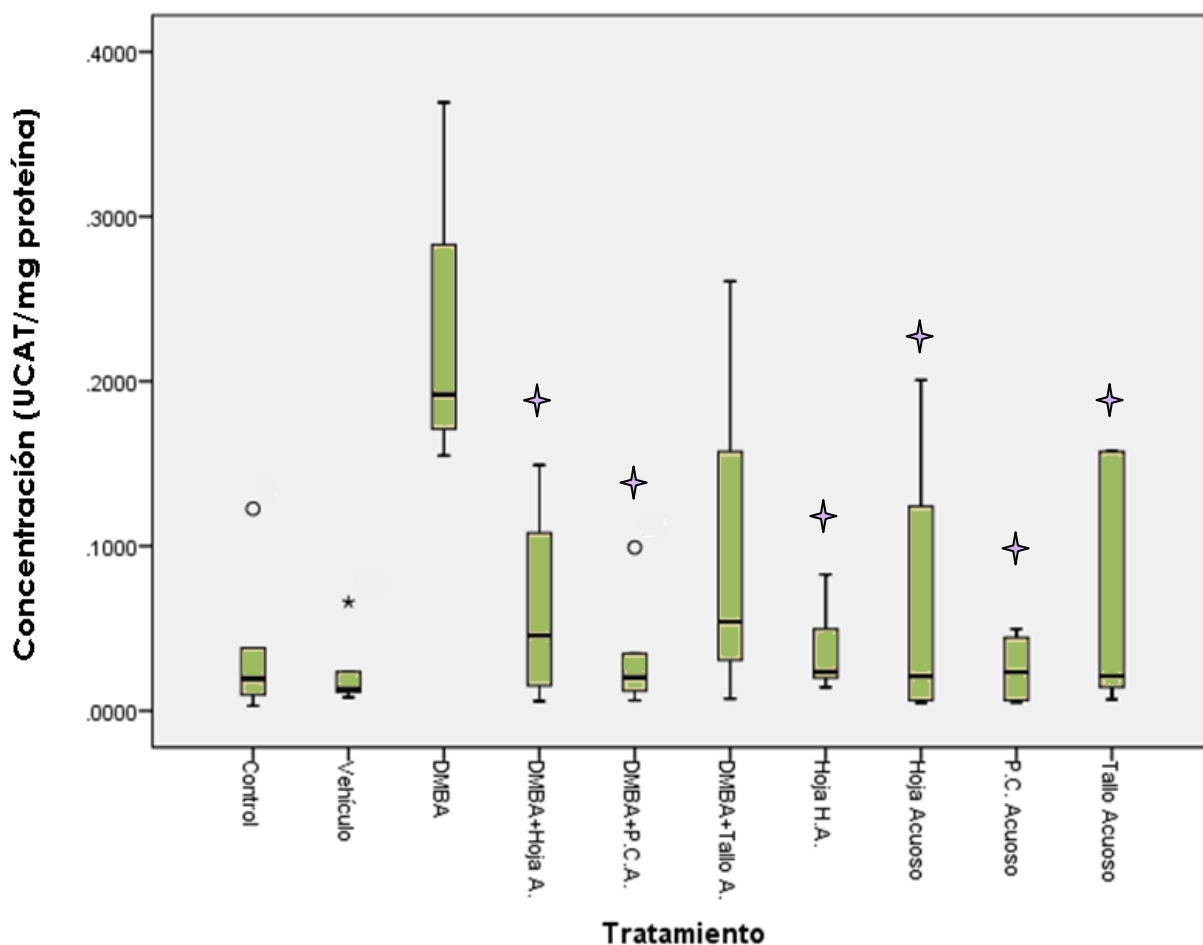


Gráfico 4. Efecto de los extractos de *Crotalaria retusa* sobre la actividad enzimática de la catalasa (UCAT/mg proteína) en plasma sanguíneo de ratones hembra de la cepa CD-1.

En homogenado de hígado, la actividad enzimática de la catalasa no mostró diferencia significativa en ningún tratamiento con respecto al control positivo inducido a cáncer de mama con DMBA. Por otra parte, el grupo inducido a cáncer y tratado con el extracto de hoja acuoso mostró significativamente un aumento en la actividad de la catalasa con respecto al grupo control (Gráfico 5).

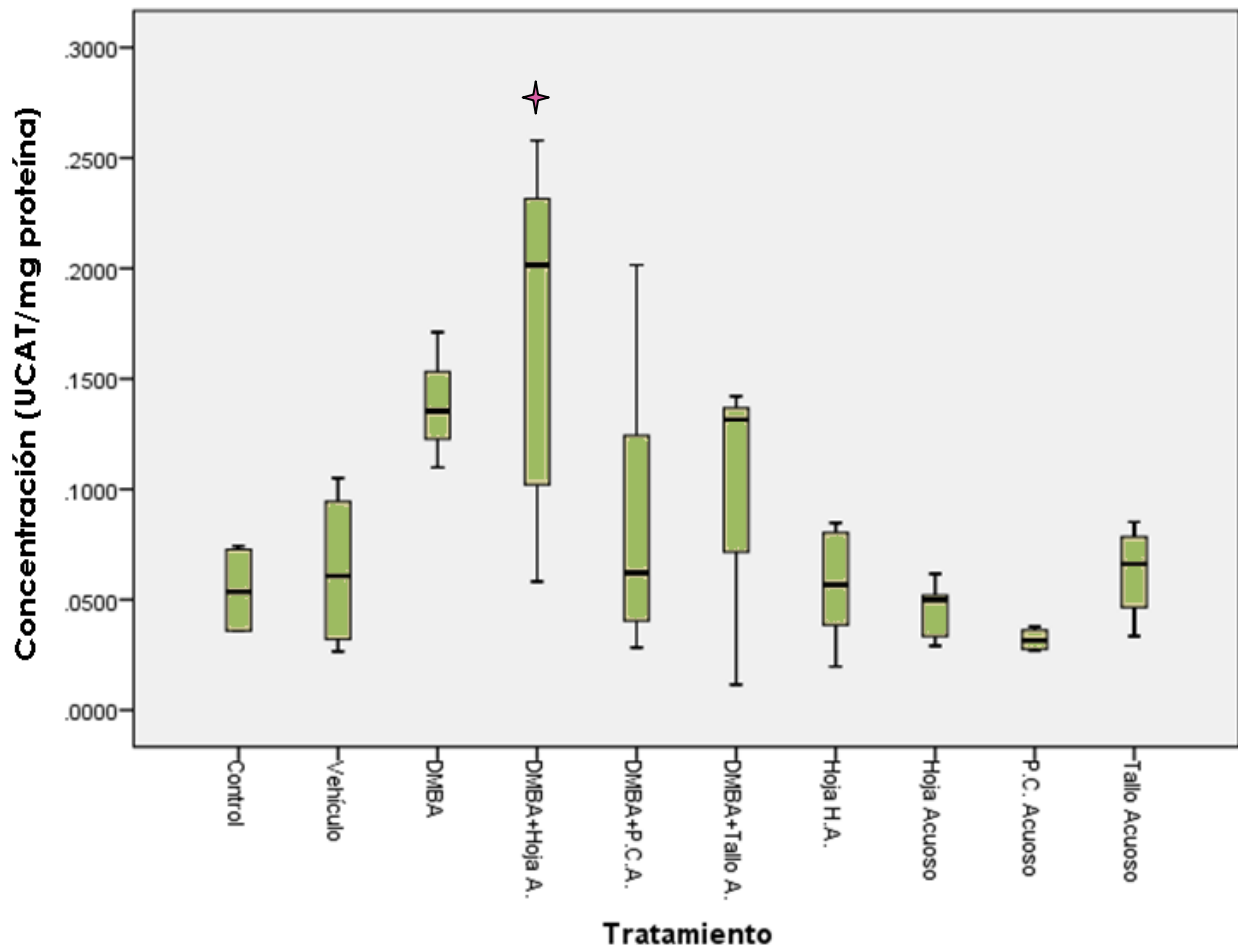


Gráfico 5. Efecto de los extractos de *Crotalaria retusa* sobre la actividad enzimática de la catalasa (UCAT/mg proteína) en homogenado de hígado de ratones hembra de la cepa CD-1.

8.8 Concentración de nitritos en plasma y homogenado de hígado

Los resultados obtenidos muestran una disminución estadísticamente significativa de la concentración de nitritos en plasma sanguíneo en el grupo inducido a cáncer de mama con DMBA y tratado con el extracto de hoja acuoso, comparado con el control positivo inducido a cáncer de mama con DMBA (Gráfico 6).

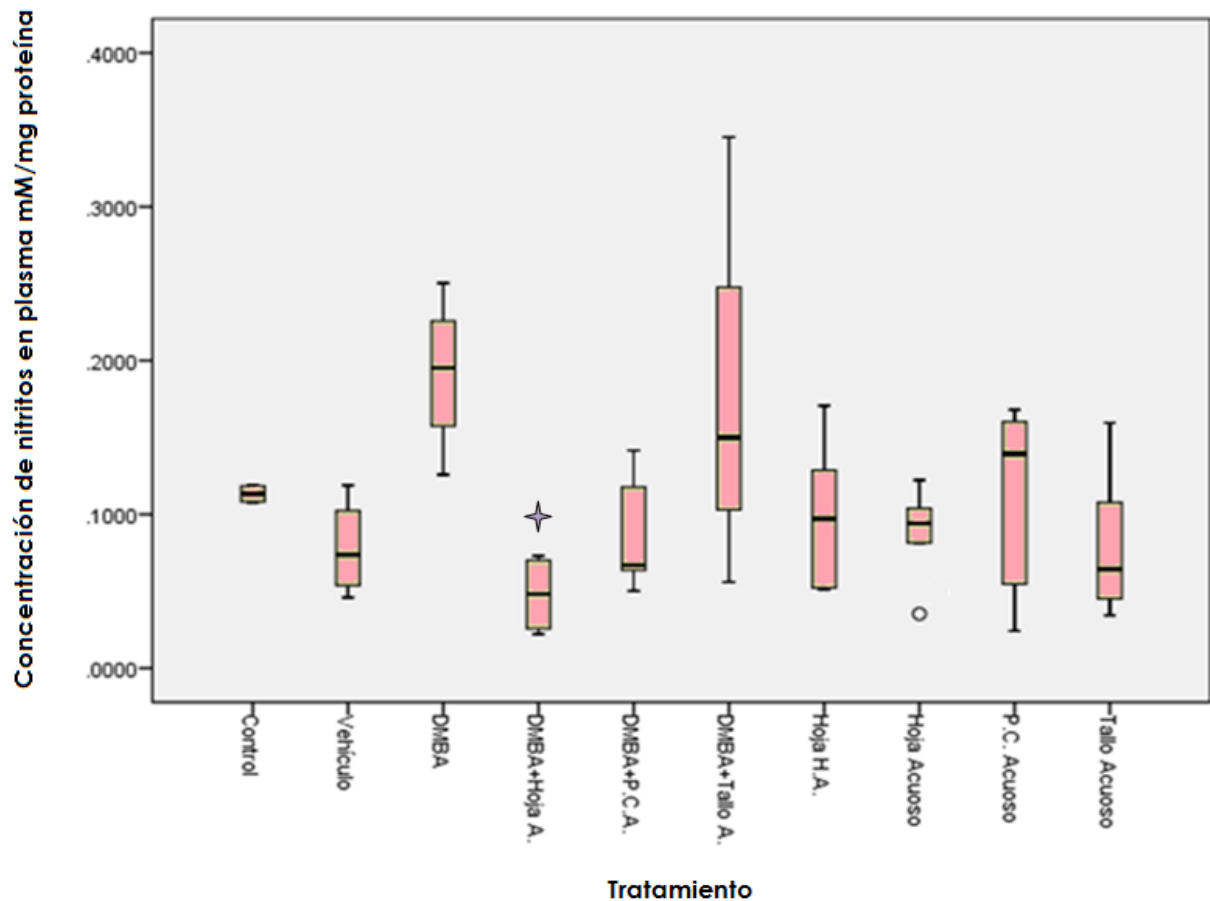


Gráfico 6. Efecto de los extractos de *Crotalaria retusa* sobre la concentración de nitritos (mM/mg proteína) en plasma de ratones hembra de la cepa CD-1.

La concentración de nitritos en homogenado de hígado no muestra diferencia estadísticamente significativa en ninguno de los tratamientos (Gráfico 7).

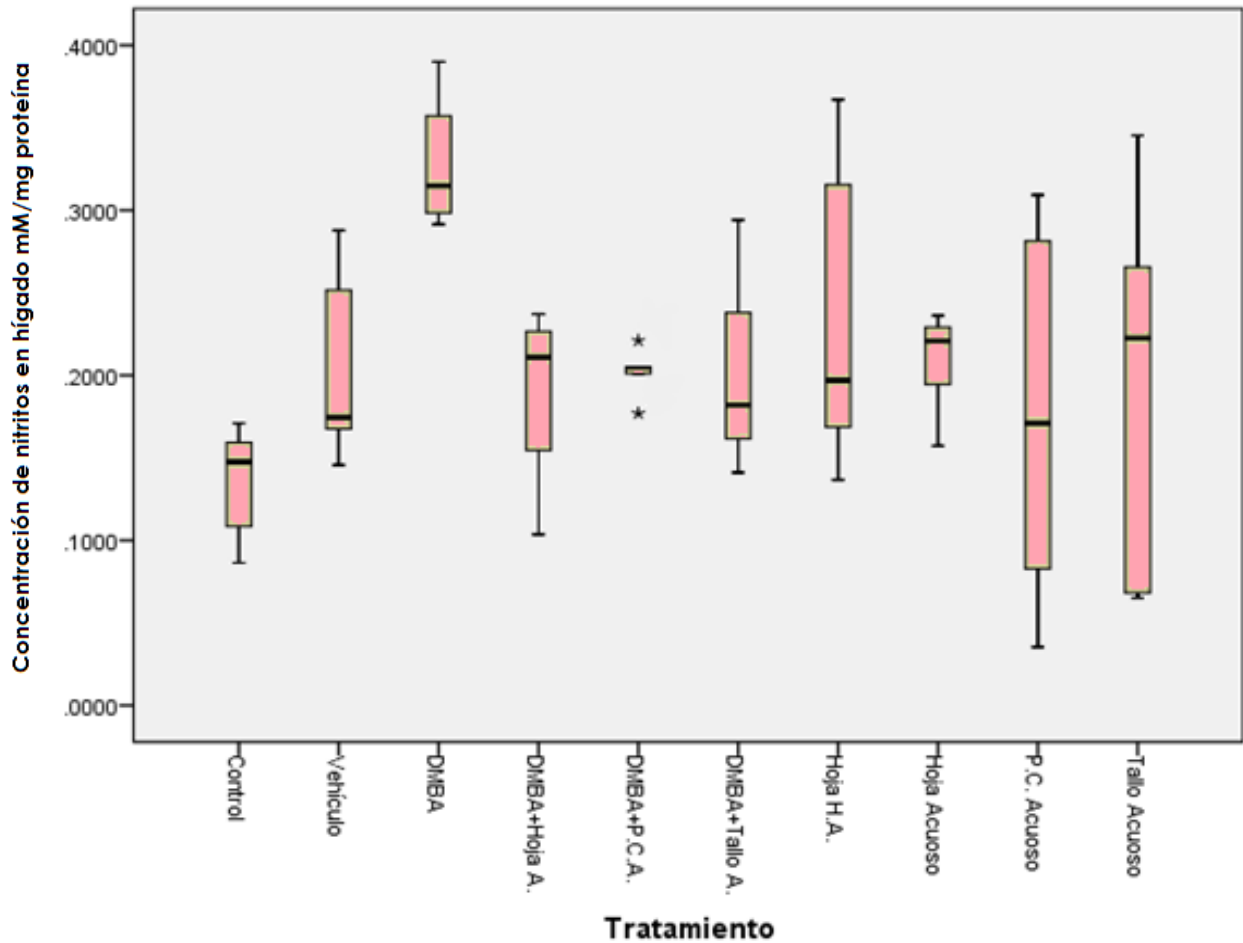


Gráfico 7. Efecto de los extractos de *Crotalaria retusa* sobre la concentración de nitritos (mM/mg proteína) en homogenado de hígado de ratones hembra de la cepa CD-1.

8.9 Cuantificación de peroxidación lipídica en plasma y homogenado de hígado

Se observó que el tratamiento con todos los extractos de *Crotalaria retusa* disminuyen la concentración de MDA con respecto al control positivo inducido a cáncer de mama con DMBA, disminuyendo también significativamente la concentración de MDA en el control negativo y el vehículo con respecto al control positivo (Gráfico 8).

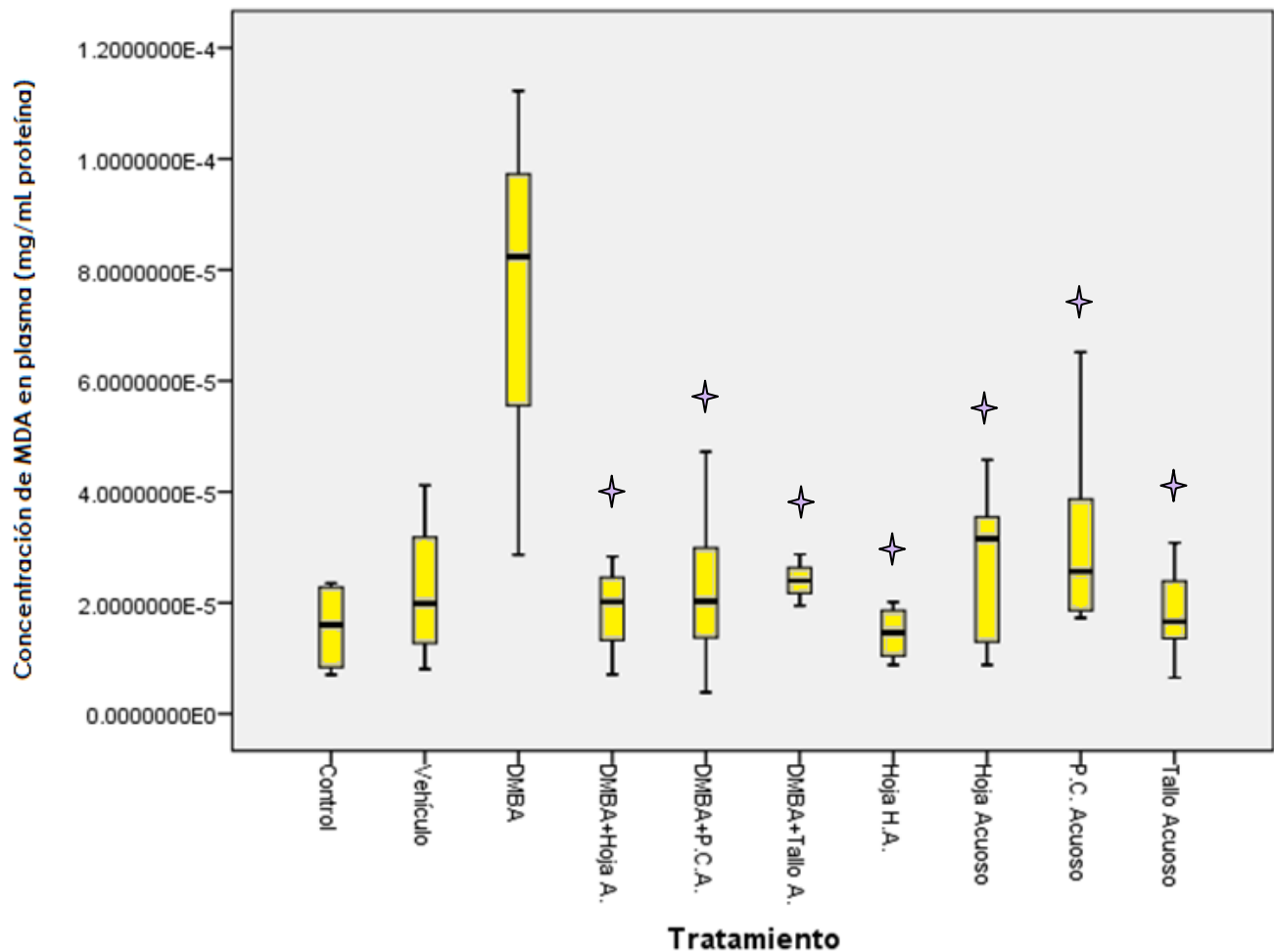


Gráfico 8. Efecto de los extractos de *Crotalaria retusa* sobre la concentración de MDA (mg/mL) en plasma de ratones hembra de la cepa CD-1.

En homogenado de hígado la concentración de MDA resulto ser estadísticamente no significativo en ninguno de los tratamientos (Gráfico 9).

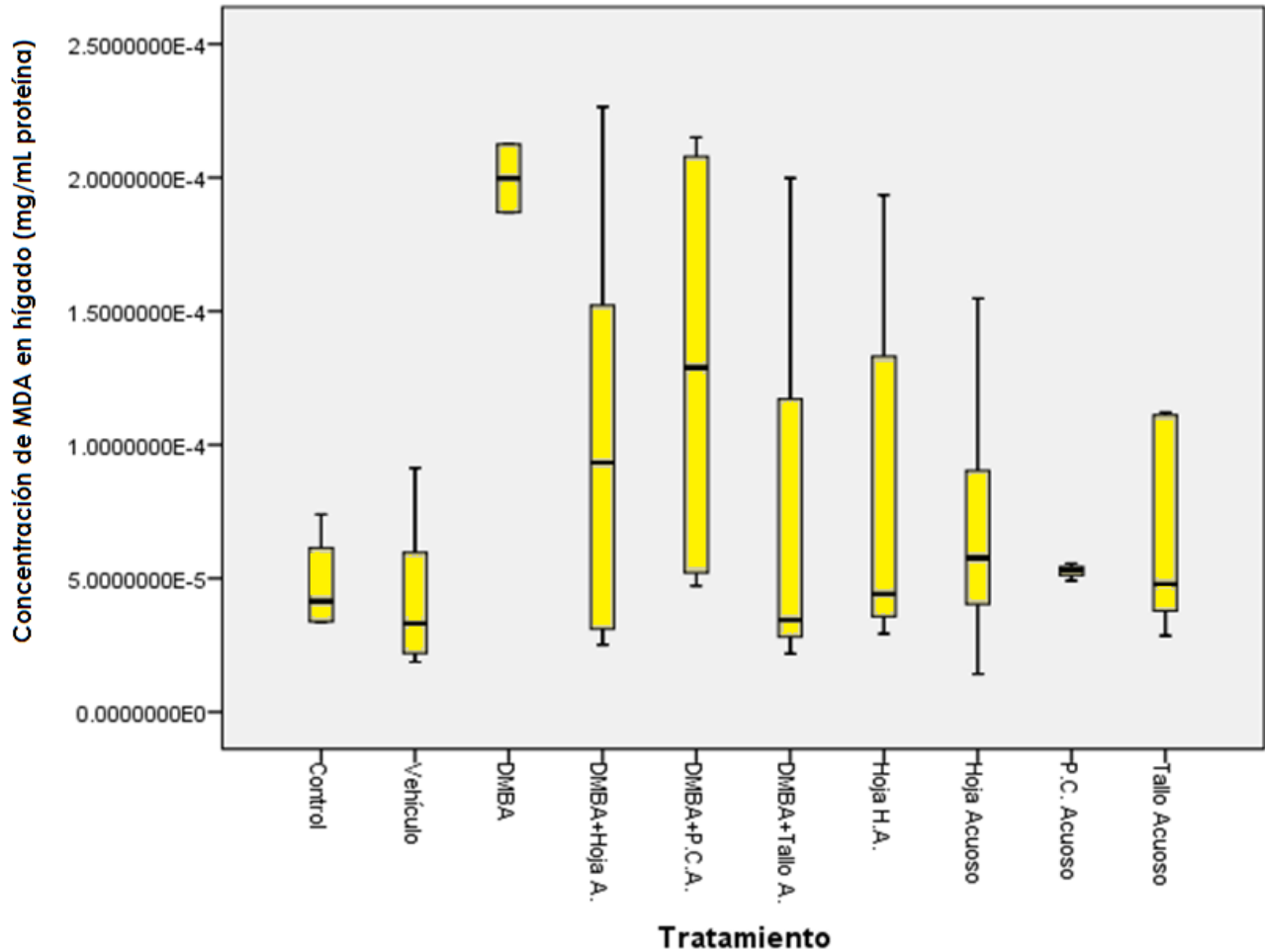


Gráfico 9. Efecto de los extractos de *Crotalaria retusa* sobre la concentración de MDA (mg/mL) en homogenado de hígado de ratones hembra de la cepa CD-1.



IX. DISCUSIÓN

Desde las épocas más remotas de la humanidad, las sociedades han recurrido al uso de las plantas como fuente de medicamentos, actualmente tanto los países desarrollados como los que se encuentran en vías de desarrollo han aumentado la utilización de las plantas medicinales o productos derivados de éstas (Cruz y Castillo, 2008). Esto puede deberse al elevado precio de los medicamentos convencionales, a los efectos colaterales que algunos producen, el fácil acceso a las especies vegetales, a la tendencia que hay en las comunidades rurales de respetar y mantener los conocimientos transmitidos de sus ancestros y a su confianza en la eficacia de las plantas como medicinales (Chifa y Ricciardi, 2004).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el 80% de la población mundial recurre a la medicina tradicional para atender sus necesidades de atención primaria de salud, lo que ha provocado un aumento en el interés científico para la comprobación de las propiedades atribuidas a estas plantas, y el interés por conocer las plantas que con fines medicinales utilizan las distintas comunidades (Cruz y Castillo, 2008).

El género *Crotalaria* es uno de los más grandes géneros de la familia Fabácea con aproximadamente 690 especies, dentro del género se han realizado distintos estudios anatómicos, citológicos, etnobotánicas, fisiológicos, fitoquímicos, virológicos, etc., y se han descrito diversos usos como fertilizante orgánico, forrajes, lucha contra nematodos, en la medicina popular y actividades farmacológicas (Magon *et al.*, 2013).

El estudio etnobotánico de *Crotalaria retusa* refleja que en la comunidad de Limón Chiquito la especie posee propiedades antiinflamatorias, lo que contrasta con el uso como analgésico para picaduras de escorpión, infecciones de la piel y combinada con *Crotalaria quinquefolia* actúa contra la fiebre, uso que se le da en otras regiones de donde es originaria (<http://tropical.theferns.info/viewtropical.php?id=Crotalaria+retusa>). En la zona del Caribe el uso de esta especie con fines medicinales está muy extendido, pero se han descrito numerosos casos de intoxicación, descubriendo con el historial detallado que es debido al uso regular y prolongado del remedio (Bruneton, 2001), semejante a como lo usan en Limón Chiquito donde la planta es utilizada hasta que se sienta una mejoría y disminución en el malestar. Siendo este un problema general de la fitoterapia popular pues no se lleva un control sobre la dosis y la calidad del producto, lo que propicia riesgos y daños a la salud (Schlaepfer y Mendoza, 2010).

De la misma forma, el uso de la planta completa en la comunidad de Limón Chiquito podría no ser tan recomendable debido a las múltiples descripciones en las que se considera a la semilla como tóxica (Nobre *et al.*, 2005) o como causa de envenenamientos (Riet *et al.*, 2011).

Con el desarrollo de la química, se ha logrado el aislamiento de los elementos activos de las plantas, y reproducir la actividad de los extractos crudos con la dosis equivalente del principio activo aislado, también se han podido sintetizar estos principios activos o moléculas bioactivas estructuralmente relacionadas (Schlaepfer y Mendoza, 2010).



Conociendo esto, se abre un preámbulo para la realización de un estudio fitoquímico de *Crotalaria retusa*, con el cual es posible la identificación de los metabolitos responsables de su acción terapéutica y mejor conocimiento de su uso medicinal (Venegas, 2012), en la Localidad de Limón Chiquito.

Un factor importante en la evolución de las plantas ha sido el referente a los llamados metabolitos secundarios (Granados et al., 2008).

El metabolismo es el conjunto de reacciones químicas que realizan las células de los seres vivos para sintetizar sustancias complejas a partir de otras más simples (Avalos y Pérez, 2009). Se conoce que la vida en la tierra depende en gran medida de la transformación de carbono y energía solar en moléculas de azúcares ricos en energía química, y su consiguiente producción de Oxígeno. En las plantas, la producción de azúcar a través de la fotosíntesis es un proceso vital, que mediante diferentes reacciones llega al proceso de glucólisis y consecuentemente a la respiración celular o biosíntesis de otras moléculas (Sáez, 2013). Las principales rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios derivan del metabolismo primario del carbono (Avalos y Pérez, 2009), lo que hace a los carbohidratos productos de vital importancia para la producción de metabolitos secundarios.

En el presente estudio, antes de realizar el análisis fitoquímico a *Crotalaria retusa*, se hizo la cuantificación de carbohidratos totales en cada uno de los extractos, los resultados indican que existe una relación entre la concentración de azúcares y la cantidad de metabolitos secundarios. En la tabla 6 se muestran las cantidades de azúcares totales de cada extracto, se observó que los extractos acuosos contienen más azúcares que los hidroalcohólicos, tal como en las pruebas de identificación donde algunos metabolitos resultaron negativos para los extractos hidroalcohólicos y positivos en los extractos acuosos para el mismo metabolito, de la misma forma el extracto de hoja acuoso presenta el nivel más alto de azúcares, 70.93µg/mL, lo que confirma, dada las concentraciones de metabolitos y a las pruebas de identificación que si existe una relación directamente proporcional con los niveles de azúcares (moléculas del metabolismo primario) y los compuestos del metabolismo secundario.

En un tiempo, los metabolitos secundarios fueron considerados sustancias de desecho (Granados et al., 2008), debido a que no tienen una función aparente en el metabolismo primario de los organismos que las producen (Anaya y Espinosa, 2006). Actualmente se sabe que los productos del metabolismo secundario tienen funciones ecológicas específicas como por ejemplo, ser atrayentes o repelentes de animales con pigmentos que proporcionan color a flores y frutos jugando un papel esencial en la reproducción, atrayendo a insectos polinizadores o a animales que van a utilizar los frutos como fuente de alimento, contribuyendo de esta forma a la dispersión de semillas; otros tienen función protectora frente a predadores, actuando como repelentes proporcionando a la planta sabores amargos, haciéndolas indigestas o venenosas y también intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas naturales (Ávalos y Pérez, 2009).

Por ejemplo los alcaloides sintetizados por *Crotalaria retusa*, son parte de una respuesta general de defensa (Sepúlveda et al., 2003), en el que las partes efímeras



como flores, frutos o retoños, suelen estar protegidas por toxinas que aparecieron como respuesta a los consumidores (Granados et al., 2008).

En las especies de *Crotalaria* se conoce una adaptación en la que las larvas de *Uteheisa ornatrix* L. secuestran el alcaloide monocrotalina y lo retienen durante su metamorfosis hasta la etapa adulta, durante el apareamiento los alcaloides son utilizados para la síntesis de feromonas, usadas como señales por el macho para atraer a la hembra; en la copulación, la hembra recibe los alcaloides del macho que junto con sus alcaloides son transmitidos hasta el huevo, sirviendo de protección contra insectos depredadores. Debido a los alcaloides, tanto el huevo, como las larvas y los adultos muestran sabores desagradables para sus depredadores (Sepúlveda et al., 2003).

Independientemente del uso que tienen en las plantas y en otros organismos, los metabolitos secundarios presentan propiedades medicinales (Hinojosa et al., 2013), ya que en virtud de su estructura son químicamente reactivos, es decir, son aptos para ingresar en los sistemas vivos, interactuar y cambiar la estructura de un receptor o blanco molecular, y penetrar en las células donde pueden afectar varios procesos fisiológicos (Anaya y Espinosa, 2006).

Con los antecedentes expuestos, el estudio se enfocó en realizar el análisis fitoquímico de *Crotalaria retusa*, ya que es posible la identificación de algunos de los componentes químicos responsables de los efectos preventivos-terapéuticos y con ello contribuir a la base científica para su uso apropiado (Ruíz-Reyes et al., 2010).

El análisis consistió en la realización de extractos acuosos e hidroalcohólicos, que fueron sometidos a pruebas fitoquímicas preliminares, las cuales consisten en una reacción química que produce alteración rápida en la estructura molecular de un compuesto, por ejemplo, la modificación de un grupo funcional, la apertura de un sistema anular, la formación de un aducto o un complejo, lo cual genera como resultado una manifestación sensible como el cambio de coloración, la formación de un precipitado o el desprendimiento de un gas, lo cual indica la presencia o ausencia de un metabolito secundario en particular (Mora et al., 2012).

Para la descripción de los ensayos se utilizó el sistema cualitativo de cruces para especificar la presencia o ausencia de los grupos de metabolitos siguiendo los siguientes criterios: (+) Presencia escasa, (++) Presencia relativamente abundante, (+++) Presencia abundante y (-) No detectado (Baldizán, Domínguez, García, Chacón y Aguilar, 2006). Posteriormente, los metabolitos identificados fueron cuantificados, reportando en µg/mL las concentraciones.

Nuestro análisis muestra la presencia de compuestos benéficos para la salud y útiles para la producción de fármacos en la terapia contra el cáncer (García, 2004)¹, como lo son los alcaloides, flavonoides, glicósidos cardiotónicos, esteroides, polifenoles, taninos y saponinas. Existen muy pocos reportes de la fitoquímica de *Crotalaria retusa*, algunos corroboran la presencia de alcaloides, esteroides, flavonoides y saponinas (Nagaraju et al., 2012), pero la mayoría de los estudios químicos realizados a la especie hacen referencia al alcaloide monocrotalina (Nakka et al., 2013), (Maia et al., 2013). Por lo que el presente estudio puede presentarse como uno de los primeros reportes en los que se hace un análisis fitoquímico más completo a la especie.



Partiendo de esto y de los estudios anteriores realizados a *Crotalaria retusa*, se sabe que uno de los metabolitos mayormente sintetizados por la planta, son los alcaloides, reconocidos en la industria farmacéutica, pues se han probado en diferentes patologías para las que ahora es bien aceptado su uso (Jin et al., 2012). Acorde con estos resultados, en nuestro estudio comprobamos que el metabolito más sintetizado por *Crotalaria retusa* son los alcaloides (tabla 9).

De acuerdo a sus propiedades antioxidantes y anticancerígenas destacan la camptotecina, un inhibidor de la topoisomerasa I y vinblastina, que interactúa con tubulina (Jin et al., 2012), la vincristina, es usada como anticancerígeno (Palacios et al., 2004), las betacianinas presentan una actividad antioxidante mayor a la de otros compuestos antioxidantes ya conocidos, en algunos estudios se demostró que la síntesis de betacianinas es inducida por el organismo de las plantas cuando se encuentran en un sistema que genera H_2O_2 , proponiendo que las betacianinas atrapan el exceso de ERO producido bajo condiciones de estrés, contribuyendo a mantener el estado oxido-reducción en equilibrio (Sepúlveda et al., 2003). Esto lleva relación con los resultados de la evaluación en la enzima catalasa, que como se observa en el gráfico 4, los tratamientos de hoja acuoso, y planta completa acuoso de *Crotalaria retusa* en los grupos experimentales inducidos a cáncer de mama con DMBA disminuyeron significativamente la actividad plasmática de catalasa con respecto al control positivo inducido a cáncer con DMBA, pues estos mismos dos extractos son los que mostraron la mayor concentración de alcaloides, con 237.109 μ g/mL del extracto de hoja acuosos y 197.049 μ g/mL para el extracto de planta completa.

Otro alcaloide conocido por su amplia gama de bioactividades es la berberina, con propiedades antiinflamatorias, antibacterianas, antidiabetes, etc. Varios estudios han demostrado que la berberina tiene potenciales anticancerígenos al interferir con los múltiples aspectos de la tumorogénesis y la progresión tumoral tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo*. La evodiamina posee efectos ansiolíticos, antiinflamatorios, antialérgicos y anticancerígenos; exhibe actividades anticancerosas tanto *in vitro* como *in vivo* induciendo la detención del ciclo celular o la apoptosis, inhibiendo la angiogénesis, la invasión y la metástasis en una variedad de líneas celulares de cáncer. Presenta potenciales anticancerígenos a concentraciones micromolares e incluso a nivel nanomolar en algunas líneas celulares *in vitro* (Jin et al., 2012).

Debido a tales efectos comprobados, se cree que la fuente de alcaloides con potencial anticancerígeno es muy extensa, con variadas actividades farmacológicas, y con focos de investigación también muy diferentes, centrándose algunas en la prevención del cáncer, mientras que la mayoría de las investigaciones con alcaloides se enfocan en la quimioterapia contra el cáncer, especialmente en la evaluación de la actividad antiproliferativa (Jin et al., 2012).

Aunque los alcaloides sean los más reportados en el género *Crotalaria*, en el presente estudio, sobre *Crotalaria retusa*, los esteroides presentaron también elevadas concentraciones, siendo 144.204 μ g/mL, el valor más alto, obtenido del extracto hidroalcohólico de hoja.



Los esteroides son metabolitos secundarios derivados de los triterpenoides, compuestos de importancia medicinal por sus propiedades anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimalarías, antimicrobianas, etc. La principal función de los esteroides en plantas es formar parte de las membranas y determinar su viscosidad y su estabilidad (Avalos y Pérez, 2009). Se han reportado esteroides con elevada actividad antioxidante, como el ciclostadienol (4-metil-esterol), que pueden reaccionar rápidamente con los radicales libres de los lípidos para formar otros radicales relativamente estables, además de interrumpir la reacción en cadena de la autooxidación de los lípidos (Maestro y Borja, 1993). Se demostró entonces, que cuando se aplicaron los extractos acuosos e hidroalcohólicos de *Crotalaria retusa* que contiene elevadas cantidades de esteroides, disminuyen significativamente la concentración de MDA en plasma, es decir disminuye el daño en las membranas celulares y en consecuencia a sus funciones fisiológicas. Se puede observar en el gráfico 8 que el grupo tratado con extracto de hoja hidroalcohólico es el que presenta mayor diferencia significativa con respecto al control negativo tratado con DMBA. La concentración de MDA en hígado no demostró diferencias significativas, a pesar de esto al observar el gráfico 9, es evidente ver que si existe diferencia en los niveles de MDA entre el grupo positivo y el grupo tratado con extracto de planta completa, que de igual manera toma relación con la cantidad de esteroides, al ser el tercer extracto con mayor cantidad de este compuesto con 56.61 µg/mL (tabla 9).

Se ha demostrado también, que existen algunos esteroides que son capaces de inhibir la óxido nítrico sintetasa (Ávila, Amaya, Martínez y Moreno, 2014), por lo que al observar el gráfico 6 y las concentraciones de esteroides, se demuestra que el efecto de *Crotalaria retusa* sobre la concentración de óxido nítrico en plasma sanguíneo disminuyó significativamente en el grupo inducido a cáncer y tratado con extracto de hoja acuoso (124.57 µg/mL de esteroides), además demuestra diferencia notable aunque no significativa con el tratamiento de los demás extractos. Esto se traduce en buenos resultados, pues es bien sabido que el •NO es un radical que establece condiciones patológicas tales como el estrés nitrosante, nitración de proteínas, peroxidación de biomoléculas, hidroxilaciones, alteración de vías de señalización, etc. (Guzmán, Velázquez y Sierra, 2006).

De los metabolitos cuantificados, los polifenoles demostraron altos niveles, colocándose como el tercer metabolito con mayor concentración en *Crotalaria retusa*. Este tipo de compuestos son a los que se les confiere el mayor poder antioxidante y secuestradores de radicales libres (Sotelo et al., 2010). La capacidad de los polifenoles para modular la actividad de diferentes enzimas, y para interferir consecuentemente en mecanismos de señalización y en distintos procesos celulares, puede deberse, a las características fisicoquímicas de estos compuestos, que les permiten participar en distintas reacciones metabólicas celulares de óxido-reducción. Sus propiedades antioxidantes justifican muchos de sus efectos beneficiosos (Quiñones et al., 2012).

Se ha evaluado que uno de los factores más importantes para que los polifenoles adquieran su alto poder como antioxidantes es la energía de disociación del enlace fenólico O-H, que conforme es más débil, es más fácil transferir sus átomos de hidrogeno. Otro parámetro fisicoquímico importante para evaluar la eficacia antioxidante de los polifenoles es el potencial de ionización, debido a que por

medio de la transferencia de un sólo electrón, el polifenol dará lugar a un catión radical estable, entonces en cuanto más bajo sea el potencial de ionización, más fácil será la transferencia de un electrón (Munin y Edwards, 2011).

Otra forma de actuar es inactivando los iones de hierro por quelación y, por consiguiente, suprimir la reacción de Fenton impulsada por superóxido, que se cree es la fuente más importante de ERO perjudicial; también pueden actuar como potentes inhibidores de las enzimas generadoras de ERO, como la xantina oxidasa, la ciclooxigenasa y la lipoxigenasa (Munin y Edwards, 2011).

Actualmente se desarrollan numerosas investigaciones sobre el tema, en los que se ha demostrado que los compuestos polifenólicos pueden capturar directamente ERO tales como radicales superóxido ($O_2\bullet$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($HO\bullet$), oxígeno singulete ($1O_2$) o radicales peroxilo ($RO_2\bullet$) (Munin y Edwards, 2011), además de que pueden interferir con los sistemas de detoxificación celular, como la superóxido dismutasa, la catalasa o la glutatión peroxidasa (Quiñones et al., 2012). Estos compuestos polifenólicos, demostraron encontrarse en altas concentraciones en todos los extractos, excepto en el de raíz hidroalcohólico, siendo muy evidente la diferencia. Se encontraron predominantemente en los extractos de hoja hidroalcohólico ($14.80\mu g/mL$) y hoja acuoso ($10.72\mu g/mL$), en los demás extractos las concentraciones fueron muy parecidas.

Debido a las funciones benéficas para la célula, y para el mantenimiento del equilibrio entre oxidantes y antioxidantes (Sotelo et al., 2010), los polifenoles son uno de los compuestos con mayor repercusión en los marcadores de estrés aquí evaluados, en primer lugar, la actividad enzimática de la catalasa en plasma disminuyó significativamente con el tratamiento de hoja y planta completa acuosa en grupos inducidos a cáncer, y con el tratamiento de hoja acuosa e hidroalcohólico, tallo y planta completa acuosa en grupos tratados sólo con la planta, como segundo, los nitritos demuestran disminuir significativamente con el tratamiento de hoja acuosa en plasma, y por último, como es observable en el gráfico 8, la concentración de MDA en plasma, que nos indica peroxidación lipídica, demostró disminuir con el tratamiento de todos los extractos de la especie. La peroxidación lipídica está asociada con la presencia de ERO, lo que causa daño a las membranas celulares y a sus funciones fisiológicas (Erisir, Benzer y Kandemir, 2009), por lo que la presencia de polifenoles en los extractos de *Crotalaria retusa*, comprueba que se puede evitar el daño celular por ERO.

Los glicósidos cardiotónicos son otro tipo de metabolitos que se identificó en todas las estructuras de la planta, su actividad farmacológica se fundamenta en la aglicona, pero se modifica por la naturaleza del azúcar en el carbono 3 (Martínez y Romero, 2011), además, el número de hidroxilos tienen capacidad en aumentar la actividad farmacológica (Martínez, 2002).

La acción biológica de estos glicósidos, incluye actividad antiviral, anti-ATPasa y antibacteriana, entre otras, ha estimulado múltiples investigaciones que procuran el aislamiento, caracterización y evaluación de análogos estructurales de este tipo de metabolito (Amaringo et al., 2011).

A pesar de esto ejercen acciones similares, normalmente actuando sobre el músculo cardíaco por inhibición de la bomba sodio potasio ATPasa dependiente,



umentando la contractilidad intrínseca de la fibra muscular (efecto inótropro positivo) (Martínez y Romero, 2011), incrementando las fuerzas de contracción del músculo cardíaco (Martínez, 2002).

Esta clase de compuestos incluye fármacos bien conocidos tales como digitalis (Newman, et al., 2008), que tiene un efecto diurético y por esta razón se utiliza en tratamientos de nefritis, edemas y algunas enfermedades infecciosas (Martínez, 2002).

La digoxina, digitoxina y ouabaína son otro tipo de glicósidos que se utilizan para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva y como agentes antiarrítmicos, sin embargo, es menos conocido el papel emergente de esta categoría de compuestos en la prevención y/o tratamiento de enfermedades proliferativas tales como el cáncer.

Nuevos hallazgos en los últimos cinco años han puesto de manifiesto que estos compuestos están implicados en complejos mecanismos de transducción de señales celulares, dando como resultado un control selectivo del proceso tumorogénico. Como tal, representan una forma prometedora de quimioterapia de cáncer dirigida (Newman, et al., 2008).

La mayor concentración de este metabolito está dada para las hojas de *Crotalaria retusa*, tanto en extracción acuosa como en extracción hidroalcohólica con concentraciones de 9.95µg/mL y 9.62µg/mL respectivamente, pudiendo inferir que dicha estructura puede adquirir el valor farmacéutico reportado para este compuesto, incluyendo el papel anticancerígeno.

Durante el seguimiento del carcinoma se observaron distintas reacciones de los ratones a el tratamiento con *Crotalaria retusa*.

En primera instancia, con respecto al peso de los ratones, se observó un aumento normal para la mayoría de los grupos, a excepción del grupo tratado con tallo, esto puede deberse a los factores antinutricionales que representan algunos de los metabolitos, inhibiendo la digestión al limitar la absorción de los alimentos (García, 2004)², *Crotalaria retusa* al pertenecer a la familia de las leguminosas se considera potencialmente útil en los sistemas de alimentación de ganado (forrajera) (Escobar, 2009), entre los grupos reportados con mayor efecto antinutricional se encuentran los taninos y saponinas (López et al., 2008), por lo que podría creerse que el cambio de peso en el grupo tratado con el extracto de tallo acuoso se debe a la presencia de estos metabolitos, pero no se puede comprobar puesto que en la cuantificación se obtuvo mayor concentración de taninos en planta completa (5.90µg/mL) y no se observó disminución ni cambio repentino de peso. Los grupos tratados con hoja acuosa e hidroalcohólico se mantuvieron durante todo el experimento con pesos muy parecidos a los del grupo control, por los que se puede decir que los componentes de la hoja de *Crotalaria retusa* no adquieren efectos contraproducentes en el peso corporal de los organismos. El grupo positivo tratado con DMBA fue, comparado con los demás grupos el de menor peso (a excepción del grupo tratado con tallo acuoso) esto puede relacionarse con la desnutrición que presentan los pacientes oncológicos, y que está relacionada con la formación del tumor, diferenciando cuatro mecanismos por los que aparece la desnutrición en pacientes cancerosos, siendo estos: el escaso aporte de energía y nutrientes,



alteraciones de la digestión y/o absorción de nutrientes, aumento de necesidades nutritivas y alteración en el metabolismo de nutrientes (Fernández et al., 2013).

Otro aspecto observado durante el experimento fue la problemática que presentaron algunos ratones, que, debido a los síntomas podemos decir presentaron daño en sistema nervioso, pues se observaron ataques tipo convulsiones que aceleraron el ritmo cardíaco, muy similar a lo que se ha reporta en caballos, a los que el consumo de la planta les ha provocado encefalopatía hepática, con opresión o hiperexcitabilidad, presión en la cabeza, caminar compulsivamente o dar vueltas y, ocasionalmente, galope incontrolable y violento (Nobre et al., 2005). Algunos estudios demuestran que el alcaloide monocrotalina causa megalocitosis y genotoxicidad *in vitro* sobre la línea celular glial GL-15 (Pitanga et al., 2011), en astrocitos puede causar disminución de los reflejos de los nervios craneales, ataxia y debilidad (Silva et al., 2010), siendo este último signo también observados en ratones tratados con extractos de planta completa, esto toma relación con la identificación y cuantificación de alcaloides, pues este extracto dio positivo con todas las pruebas de identificación en los dos tipos de extracción y la cuantificación mostró altos valores, siendo (197.04µg/mL) para el acuoso y (117.20µg/mL) para el hidroalcohólico.

A pesar de los altos valores de alcaloides en los extractos de planta completa, no fue el extracto que mostró la concentración más alta de este metabolito, la hoja de *Crotalaria retusa* fue la que mostró la mayor concentración, con 2.489µg/mL del extracto acuoso, durante el experimento ninguno ratón tratado sólo con hoja sufrió daños visibles en sistema nervioso, esto se relaciona con los estudios en los que se considera a las semillas de *Crotalaria retusa* como tóxicas o causantes de envenenamiento (Tabla 2), pero no hay estudios que indiquen directamente que las hojas son causantes de los mismos efectos que las semillas de *Crotalaria retusa*, contrario a esto, a las hojas se le atribuyen propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivirales (Maregesi et al., 2008), actividad leishmanicida (Guerra et al., 2009), antioxidantes (Nagaraju et al., 2012), etc.

Al momento del sacrificio se hicieron observaciones en bazo, por ser un órgano linfático que cumple funciones en el mecanismo de defensa del organismo (Larranga, Espil, Oyarzún, De Salazar y Kozima, 2014) y porque una de las principales maneras de propagación del cáncer de mama es a través del sistema linfático, mediante los ganglios linfáticos que rodean al seno (ACS, 2014), se observó entonces aumento en el tamaño del bazo, conocido como esplenomegalia, (anexo 2) este signo en humanos puede deberse a múltiples enfermedades por ejemplo mononucleosis, tuberculosis, insuficiencia hepática, leucemia, anemia hemolítica, etc., sin embargo no siempre indica la presencia de una enfermedad (Rabaza, Fundora, Rodríguez y Hernández, 2010), en un experimento realizado con pollos a los que se les suministró concentraciones de (0.1 y 0.5%) de semillas de *Crotalaria retusa* se observó esplenomegalia (ELIKA, 2013), siendo este el único reporte encontrado de este síntoma por la exposición a *Crotalaria retusa*, en el que se lo atribuyen a los alcaloides de pirrolizidina. Este reporte y los resultados encontrados en este estudio pueden ser la base para una investigación mucho más detallada de los daños que puede causar la especie al sistema linfático, y por ende al sistema inmune del organismo.



En cuanto a los marcadores de estrés oxidativo se observó para las tres evaluaciones, catalasa, óxido nítrico y MDA que ninguna mostró disminución significativa comparadas con el control positivo tratado con DMBA en hígado, esto puede deberse también a los efectos de monocrotalina, pues es sabido que se activa por el complejo citocromo P450 (CYP450) que se ha encontrado mayormente en hígado y que genera el metabolito activo dehidromonocrotaline (DHMC) (Silva et al., 2010), el cual produce la toxicidad reconocida de esta especie (Leite et al., 2010).

A pesar de esto se pueden observar diferencias en la actividad enzimática de la catalasa en hígado, que si bien no son significativas si hay disminución de las concentraciones de la enzima en los grupos tratados con hoja acuoso y planta completa acuoso, acercando mucho los niveles a los del grupo control (gráfico 5), es también visible que el grupo inducido con DMBA y tratado con extracto de hoja acuosos incrementa los niveles de la enzima, lo cual puede indicar que el sistema se encontraba en condiciones de estrés oxidativo, al presentar mayor actividad enzimática antioxidante (Baquero, Castro y Narváez, 2005); la concentración de óxido nítrico cuantificado como nitritos en hígado tampoco mostró diferencias significativas, y los niveles con ningún tratamiento bajaron hasta alcanzar los del grupo control (gráfico 7); los niveles de MDA en hígado muestran que el extracto de planta completa reduce mucho la concentración, hasta casi alcanzar los del grupo control, pero no hay diferencia estadísticamente significativa (gráfico 9).

Como anteriormente fue descrito, en el estado normal del metabolismo los niveles de oxidantes y antioxidantes en el hombre se mantienen en equilibrio, lo cual es importante para mantener las condiciones fisiológicas óptimas. La sobreproducción de oxidantes en determinadas condiciones puede producir un desequilibrio que conduce al daño oxidativo de diferentes biomoléculas tales como lípidos, ADN, y proteínas. La presencia de antioxidantes tiene un efecto protector (García et al., 2011), tal es el caso de *Crotalaria retusa* que dio positivo a siete metabolitos, y que al observar los resultados en las pruebas a los marcadores de estrés oxidativo, se demuestra que es una fuente de metabolitos secundarios con potencial uso como agentes antioxidantes de origen natural que pueden ayudar a prevenir y retardar el daño oxidativo en lípidos, proteínas, ADN y contribuir al estilo de vida saludable.

Se puede decir entonces, que las hojas de *Crotalaria retusa* son las más efectivas para el tratamiento de enfermedades causadas por estrés oxidativo, como lo es el cáncer, relacionándolo con el análisis fitoquímico en donde el extracto acuosos de hoja mostró la mayor concentración de alcaloides, flavonoides, y glicósidos cardiotónicos, y el extracto de hoja hidroalcohólico tuvo la mayor concentración de esteroides y polifenoles (Tabla 9), compuestos que por su actividad antioxidante y anticancerígena influyeron directamente en la actividad enzimática de la catalasa, en la concentración de óxido nítrico cuantificado como nitritos y la peroxidación lipídica cuantificada con MDA, que demostraron disminuir significativamente en plasma con el extracto de hoja.



X. CONCLUSIÓN

Con el presente estudio donde se evaluó la actividad antioxidante de *Crotalaria retusa* se puede concluir que:

- El registro etnobotánico realizado en la comunidad de Limón Chiquito demostró que la planta completa es preparada en té para el dolor e inflamación de riñón, hasta la desaparición del malestar.
- Se identificaron esteroides, polifenoles, glicósidos cardiotónicos, alcaloides, taninos y saponinas en todas las estructuras de la planta.
- Los alcaloides presentaron la máxima concentración en cada una de las estructuras de *Crotalaria retusa*, siendo 237.10µg/mL el valor mas alto.
- La actividad de catalasa en plasma sanguíneo, disminuyó considerablemente en respuesta al tratamiento con el extracto acuoso de planta completa.
- El extracto acuoso de hoja disminuyó significativamente la concentración de nitritos en plasma.
- La concentración de MDA en plasma sanguíneo disminuyó significativamente con el tratamiento de todos los extractos acuosos e hidroalcohólicos.
- No hubo respuesta significativa en las concentraciones de los marcadores de estrés oxidativo en hígado.

Crotalaria retusa presenta actividad antioxidante en plasma, pero al contener monocrotalina, que se activa comúnmente en hígado, no se observa tal efecto en este órgano, por lo que su uso tendría restricciones.

Más estudios enfocados en la extracción de monocrotalina, tiempo de tratamiento y dosis empleadas podrían contribuir a que *Crotalaria retusa* pueda considerarse una planta medicinal sin efectos secundarios.



XI. REFERENCIAS

- Abrego, U. C., & Honles C. J. (2012). *Identificación, cuantificación y determinación de la actividad citotóxica de los glicósidos cardiotónicos procedentes de las raíces y flores de Plumeria rubra (flor de mayo), Stemmadenia donnell-smithii (cojon de puerco) Y Thevetia ahouia (cojon de costa de hojas largas) de la familia Apocynaceae* (Tesis para obtener el título de Química y Farmacia). UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR. San Salvador, El Salvador.
- Adarmes, H., Solís, J. P., 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* 41, 244-259.
- Ali, M., Elgindi, M., Abd K. M., Mahmoud, I., & Atia, H. (2004). Antioxidant, anti-inflammatory, and analgesic activities of the chloroform extract of *Crotalaria aegyptiaca*. *Bull. Fac. Pharm. Cairo Univ*, 42(2).
- Alvarado, F. C., Álvarez, C. P., Guayerbas, V. N., Puerto, C. M., Jiménez, L., & Fuente, R. M. (2005). El daño peroxidativo en leucocitos peritoneales de ratones viejos disminuye si se suplementa la dieta con galletas enriquecidas con antioxidantes. Relación con la supervivencia. *Rev Esp Geriatr Gerontol*, 40(6), 351-356.
- Álvarez, J. (2007). Tanino: La revolución enológica, mito o realidad. *Enología*, 4(2), 1-15.
- Amaringo, V. F., Hormaza, A. A., & Arias, Z. M. (2011). Thevetin B: glicósido cardiotónico predominante en thevetia peruviana. *Scientia et Technica*, 16(49), 298-303.
- "American Cancer Society (ACS)" (2014). Cáncer de seno. Recuperado de <http://www.cancer.org/>
- Anaya, L. A., & Espinosa, G. F. (2006). La química que entretiene a los seres vivos. *Ciencias*, 83, 4-13.
- Arango, A. G. (2008). *Alcaloides y compuestos nitrogenados*. Universidad de Antioquia. Medellín.
- Arroyo, A. J., Prashad, G. M., Vásquez, B. Y., Li, P. E., & Tomás, C. G. (2005). Actividad citotóxica in vitro de la mezcla de *Annona muricata* y *Krameria lappacea* sobre células cancerosas de glándula mamaria, pulmón y sistema nervioso central. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*, 22(4), 247-253.
- Ávalos, G. A., & Pérez-Urria, C. E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), 119-145.
- Ávila, A., Amaya, M., Martínez, J., & Moreno, J. (2014). Panorama actual de las alternativas en el tratamiento de la cicatriz hipertrófica y queloide. *Dermatol Rev Mex*, 58(3), 247-261.
- Ávila, N. R., Rivas, P. B., Hernández, M. R., & Chirinos, M. (2012). Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en *Agave cocui* Trelease. *MULTICIENCIAS*, 12(2), 129-135.
- Baldasquín, C. B. (2012). Efecto de los compuestos fenólicos Apigenina, Catequinas del Cacao, Ácido Rosmarínico y Eriotrina sobre la carcinogénesis oral inducida por DMBA en Hámster. (TESIS) Universidad de Murcia.
- Baldizán, A., Domínguez, C., García, D., Chacón, E., & Aguilar, L. (2006). Metabolitos secundarios y patrón de selección de dietas en el bosque deciduo tropical de los llanos centrales venezolanos. *Zootecnia Trop.*, 24(3), 213-232.



- Baquero, D. L., Castro, R. J., Narváez C. C. (2005). Catalase, Peroxidase and Polyphenoloxidase from Pitaya Amarilla (*Acanthocereus pitajaya*) Fruits: Ripening and Senescence. *Acta Biológica Colombiana*, 10(2), 49-59.
- Barrera, R. R., Peralta, Z. O., & Madrid, M. V. (1995). Bases Moleculares de la Inmunología del Cáncer. *Salud Publica Mex*, 37(4), 344-353.
- Barrón, Y. R., García, M. M., Soto, H. M., Colinas, L. T., & Kite, G. (2011). Flavonoides y actividad antioxidante de *Calia secundiflora* (Ort.) Yakovlev. *Rev. Fitotec. Mex.*, 34(3), 151-157.
- Beyra, M. A., Herrera, O. P., & Junco, G. N. (1995). El género *Crotalaria* L. (Fabaceae, Faboideae) en Cuba: Biología, Distribución y Ecología. *Fontqueria*, 42, 257-268.
- Bonilla, R. N., Varón, F., & Garzón, L. (2014). Extracción de pigmentos colorantes tipo flavonoides, flor del pomo (*Syzygium jambos*). Zona verde del iear. Florencia caqueta. *Amazonia Investiga, Florencia, Colombia*, 3(5), 34-42.
- Bruneton, J. (2001). *Plantas toxicas, vegetales peligrosos para el hombre y los animales*. España: ACRIBIA, S. A.
- Brunner, B., Martínez, S., Flores L., & Morales, P. (2009). *Hoja informativa Crotalaria*. Proyecto de Agricultura Orgánica Z-NRCS-007/Z-208.
- Cheirif, W. O., Sáez, O. M., & Lammoglia, O. L. (2015). Esteroides tópicos: revisión actualizada de sus indicaciones y efectos adversos en dermatología. *Dermatología Cosmética, Medica y Quirúrgica*, 13(4), 305-312.
- Chia, C. C., Ming, H. Y., Hwei, M. W., & Jiing C. C. (2002). Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178-182.
- Chifa, C., & Ricciardi, A. (2004). Evaluacion etnofarmacológica de plantas usadas popularmente por las comunidades del Chaco argentino. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*.
- Chithan, K., Lung, T. L., Ping, P. L., Jiuan, J. H., Ferng, C. K., Ying, T. H., & Ming, T. L. (2005). The Antitumor Activities of Flavonoids. *In vivo*, 19, 895-910.
- Chouhan, H., Sahu, A., & Singh, S. (2011). Fatty acid composition, antioxidant, anti-inflammatory and antibacterial activities of seed oil from *Crotalaria juncea* Linn. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(6), 984-991.
- Criado, D. C., & Moya, M. M. (2009). *Vitaminas y antioxidantes*. Madrid: SANED.
- Cruz, M. C., & Castillo, D. (2008). Etnobotánica en el batey palavé: prueba de sensibilidad y resistencia microbiana de cinco plantas utilizadas en atención primaria de salud. *CIENCIA Y SOCIEDAD*, 33(3), 361-387.
- Cuenca, R. C., Despaigne, B. A., & Beltrán, M. Y. (2013). Factores de riesgo de cáncer de mama en mujeres pertenecientes a un consultorio médico del Centro Urbano "José Martí". *MEDISAN*, 17(9):4089.
- Dardon, O. V., & Duran, C. M. (2011). *Cuantificación espectrofotométrica de Taninos y analisis bromatologico proximal de cuatro diferentes mezclas de forrajes a base de gramíneas y leguminosas*. (Tesis para obtener el grado de química y farmacia). UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR. Facultad de Química y Farmacia. San Salvador, El Salvador.
- Delgado, O. L., Betanzos, C. G., & Sumaya, M. M. (2010). Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. *Investigación y ciencia*, (50), 10-15. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=67415744003>
- Díaz, A. (2003). La estructura de las catalasas. *REB*, 22(2), 76-84.



- Díaz, J. L., Ibarra, A. E., & Jiménez, L. K. (s.a.). Cuantificación de saponinas en ajo genéticamente seleccionado. *Ciatec*. 1-5.
- Díaz, M., Pérez, Y., Cazaña, Y., Prieto, M., Wencomo, H., & Lugo, Y. (2010). Determinación de antioxidantes enzimáticos en variedades e híbridos de *Morus alba*. *Pastos y forrajes*, 33(3).
- Domínguez, X. A. (1979). *Métodos de investigación fitoquímica*. México: Editorial Limusa.
- Dorado, M. C., Rugerio, V. C., & Rivas, A. S. (2003). Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Rev Fac Med UNAM*, 46(6), 229-235.
- Dornelles, P. C., Santos, S. P., Oliveira, N. C., Goldim, J., & Ashton, P. P. (2015). Conocimiento del cáncer de mama y cáncer de mama hereditario en el personal de enfermería de un hospital público. *Rev. Latino-Am. Enfermagem*, 23(1), 90-97.
- ELIKA. (2013). Sustancias indeseables. Alcaloides Pirrolizidínicos. Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria.
- Elejalde, G. J. (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *An Med Interna (Madrid)*, 18(6), 326-335.
- Erisir, M., Benzer, F., Kandemir, M. (2009). Changes in the Rate of Lipid Peroxidation in Plasma and Selected Blood Antioxidants before and during Pregnancy in Ewes. *ACTA VET. BRNO*, 78, 237-242. doi: 10.2754/avb200978020237
- Escobar, M. G. (2009). Incidencia de metabolitos secundarios presentes en las leguminosas en sistemas silvopastoriles en caprinos. Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente. Bogotá D.C.
- Fernández, L. M., Saenz, F. C., Sás, P. M., Urrutia, S., Bardasco, A. M., Alves, P. M.,... Mato, M. J. (2013). Desnutrición en pacientes con cáncer; una experiencia de cuatro años. *Nutricion Hospitalaria*, 28(2), 372-381.
- Fernández, R. E., & Galván, C. A. (s.a.). *Métodos para la cuantificación de proteínas*. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales. Córdoba.
- Gallardo, M. J. (s.a.). Óxido Nítrico: Método de Griess. *Laboratorio de toxicología protocolos*. Recuperado de: <http://www.fisio.cinvestav.mx/~gallardo/polytecnicas/polytec-002.htm>
- Gandhi, S., Mahajan, V., & Bedi, Y. (2015). Changing trends in biotechnology of secondary metabolism in medicinal and aromatic plants. *Plants*, 241, 303-317. doi: 10.1007/s00425-014-2232-x
- García, D. E. (2004)¹. Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. *Pastos y forrajes*, 7(1) 1-12.
- García, D. E. (2004)². Principales factores antinutricionales de las leguminosas forrajeras y sus formas de cuantificación. *Pastos y forrajes*, 27(2), 101-116.
- García, J., De la Rosa, L., Herrera, D. B., González, B. A., López, D. J., González, A. G., Ruíz, C. S., & Álvarez, P. E. (2011). Cuantificación de polifenoles y capacidad antioxidante en duraznos comercializados en Ciudad Juárez, México. *Tecnociencia, Chihuahua*, 5(2), 67-75.
- González, N. L., Ávila, G. A., Echeverri, J. C., Jaramillo, V. S., Salazar, C. R., & Aristizábal B. B. (2007). Cáncer de mama: HER2/neu, métodos diagnósticos y consideraciones clínicas. *Rev Colomb Cancerol*, 11(1), 40-57.



- Gore, R., & Gaikwad, S. (2015). Checklist of Fabaceae Lindley in Balaghat Ranges of Maharashtra, India. *Biodiversity Data Journal*, doi: 10.3897/BDJ.3.e4541
- Granados, S. D., Ruíz, P. P., & Barrera E. H. (2008). Ecología de la Herbivoría. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 14(1), 51-63.
- Guerra, R. L., Soares, A. C., Bezerra, L. M., Aracyl, B. R., Freitas, P. N., Carvalho, X. C., & Felinto, B. M. (2009). Evaluation of the leishmanicide action of ethanol extracts of *Crotalaria retusa* L. (Fabaceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 19(1A), 51-56.
- Gutiérrez, R. A., & Estévez, B. A. (2009). Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el S. XXI. *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat. (Esp)*, 103(2), 409-419.
- Guzmán, B., Cruz, D. L., Alvarado, J. A., & Mollinedo, P. (2013). Cuantificación de saponinas en muestras de Cañihua *Chenopodium pallidicaule* Aellen. *Revista Boliviana de Química*, 30(2), 131-136.
- Guzmán, G. A., Velázquez, G. A., & Sierra, V. M. (2006). Óxido nítrico, estrés nitrosante y función mitocondrial. *Revista de Endocrinología y Nutrición*, 14(4), 227-232.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144, 646-674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hernández, S. R., Lugo, C. E., Díaz, J.L., & Villanueva, S. (2005). Extracción y cuantificación indirecta de las saponinas de *Agave lechuguilla* Torrey. *e-Gnosis*, 3(3) 1-9.
- Hinojosa, D. J., Gutiérrez, L. M., Siller, L. F., Rodríguez, S. A., Morales, D. J., Guerrero, M. P., & Del Toro, S. C. (2013). Screening fitoquímico y capacidad antiinflamatoria de hojas de *Tithonia tubaeformis*. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, 15(2), 53-60.
- Irmer, S., Podzun, N., Langel, D., Heidemann, F., Kaltenecker, E., Schemmerling, B.,... Ober, D. (2015). New aspect of plant-rhizobia interaction: Alkaloid biosynthesis in *Crotalaria* depends on nodulation. *PNAS*, 112(13), 4164-4169.
- Jin, J. L., Jiao, L. B., Xiu, P. C., Min, H., & Yi, T. W. (2012). Alkaloids Isolated from Natural Herbs as the Anticancer Agents. *Hindawi Publishing Corporation. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-12. doi: 10.1155/2012/485042
- Knaul, F. M., Nigenda, G., Lozano, R., Arreola, O. H., Langer, A., & Frenk, J. (2009). Cáncer de mama en México: una prioridad apremiante. *Salud pública de México*, 51(2), 335-344.
- Kumari, M., Eesha, B. R., Amberkar, M., Rajshekar, S., & Kumar, N. (2010). Wound healing activity of aqueous extract of *Crotalaria verrucosa* in Wistar albino rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 783-787.
- Lanari, C., & Molinolo, A. (2003). Progestágenos y cáncer de mama: desarrollo de un modelo experimental. *Revista Química Viva*, 2(3), 111-121.
- Larrañaga, N., Espil, G., Oyarzún, A., De Salazar, A., & Kozima, S. (2014). No nos olvidemos del bazo: el órgano huérfano. *REVISTA ARGENTINA DE RADIOLOGÍA*, 78(4), 206-217.
- Leite, A. B., Nobre, V., Dantas, A., Medeiros, R., Oliveira, N. T., Molyneux, R., Riet, C. F. (2010). Poisoning of sheep by seeds of *Crotalaria retusa*: Acquired resistance by continuous administration of low doses. *Toxicon*, 55, 28-32. doi: 10.1016/j.toxicon.2009.06.028
- Lobato, G. C., Gómez, R. A., Alor, C. M., Badal, M. J., Hernández, V. C., & Díaz, O. V. (2008). Cuantificación de flavonoides, taninos y esteroides en plantas medicinales de uso tradicional en Tabasco. *Semana de Divulgación y Video Científico*
- López, G. J., Prado, G. H., Aguilar, C. D., Molina, G. J., Mandoki, J., & Medina, M. F. (2000). Efecto en el ciclo celular de líneas de adenocarcinoma pulmonar por cumarina y 7-hidroxycumarina. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*, 13(4), 192-197.



- López, H. M., Rivera, L. J., Ortega, R. L., Escobedo, M. J., Magaña, M. M., Sanginés G. J., & Sierra, V. A. (2008). Contenido nutritivo y factores antinutricionales de plantas nativas forrajeras del norte de Quintana Roo. *Téc Pecu Méx*, 46(2), 205-215.
- Maestro, D. R., & Borja, P. R. (1993). Actividad antioxidante de esteroides y ácidos orgánicos naturales. *Grasas y aceites*, CSIC, 44(3), 208-212.
- Magon, G. J., Kawakita, K., Sfoggia, M. S., & Souza, M. (2013). O gênero *Crotalaria* L. (Leguminosae, Faboideae, Crotalarieae) na Planície de Inundação do Alto Rio Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Biociências*, 11(2), 209-226.
- Maia, L., Lucena, R., Nobre, V., Dantas, A., Colegate, S., & Riet, C. F. (2013). Natural and experimental poisoning of goats with the pyrrolizidine alkaloid-producing plant *Crotalaria retusa* L. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 25(5), 592-595.
- Maldonado, S. O., Jiménez, V. E., Guapillo, V. M., Ceballos, R. G., & Méndez, B. E. (2010). Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, 32-39.
- Martínez B. J., & Romero A. M. (2011). Identificación, cuantificación y determinación de la actividad citotóxica de los glicósidos cardiotónicos procedentes de los frutos, semillas y flores de *Calotropis procera* (matacoyote) de la familia de las asclepiadaceae. (Tesis para obtener el grado de LICENCIATURA EN QUÍMICA Y FARMACIA). UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR. San salvador, El Salvador.
- Martínez, F. S., González, G. J., Culebras, J. M., & Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, 17(6), 271-278.
- Martínez, M. A. (2002). Esteroides cardiotónicos. Universidad de Antioquia. Medellín.
- Mayor, O. R. (2010). Estrés oxidativo y sistema de defensa antioxidante. *Rev. Inst. Med. Trop.*, 5(2), 23-29.
- Mena, V. L., Tamargo, S. B., Salas, O. E., Plaza, P. L., Blanco, H. Y., Otero, G. A., & Sierra, G. G. (2015). Determinación de saponinas y otros metabolitos secundarios en extractos acuosos de *Sapindus saponaria* L. (jaboncillo). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 20(1), 106-116.
- Méndez, M. L., Zañudo, H. J., Castruita, D. J., Meza, V. K., & Gómez, L. J. (2014). Importancia del Estudio del Metabolismo Secundario en Plantas.
- Maregesi, M. S., Pieter, L., Ngassapa, O. D., Apers, S., Vingerhoets, R., Cos, P.,.... Vlietinck, A. (2008). Screening of some Tanzanian medicinal plants from Bunda district for antibacterial, antifungal and antiviral activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 119, 58-66. doi: 10.1016/j.jep.2008.05.033
- Monzón, O., Mora, P. E., Torres, T. L., Gutiérrez L., & Rubi, C. (2011). Bases moleculares del cáncer. *Repertorio de medicina y cirugía*, 20(4), 210-216.
- Mora, A. C., Galeano, J. E., & Osorio, D. E. (2012). *Manual de prácticas de laboratorio de farmacognosia I*. UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA, Medellín.
- Mpiana, P. T., Mudogo, V., Nyamangornbe, L., Kakule, M.K., Ngbolua, K. N., Atibu, E. K.,.... Ntumba, J. K. (2009). Antisickling activity and photodegradation effect of anthocyanins extracts from *Alochornea cordifolia* (Schumach & Thonn) and *Crotalaria retusa*. *Annales Africaines de Médecine*, 2(4), 239-244.
- Munin, A., & Edwards, L. F. (2011). Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review. *Pharmaceutics*, 3, 793-829. doi: 10.3390/pharmaceutics3040793
- Nagaraju, D. B., Srinivas, N., & Sandeep, S. K. (2012). A comparative pharmacological and phytochemical analysis of in vivo & in vitro propagated *Crotalaria* species. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 37-41. doi: 10.1016/S1995-7645(11)60242-3



- Naivy, P. A., & Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. *Biotecnología vegetal*, 11(4), 195-211.
- Nakka, S., Veerendra, K. B., & Nagaraju, D. B. (2013). Analysis of pyrrolizidine alkaloid from *Crotalaria retusa* L. *Der Pharma Chemica*, 5(6), 6-11.
- Newman, R. A., Yang, P., Pawlus, A. D., & Block, K. I. (2008). Cardiac Glycosides as Novel Cancer Therapeutic Agents. *Molecular interventions*, 8(1), 36-49.
- Nobre, V.M., Dantas, A. F., Riet, C. F., Barbosa, F. J., Tabosa, I. M., & Vasconcelos, J. S. (2005). Acute intoxication by *Crotalaria retusa* in sheep. *Toxicon*, 45, 347-352. doi: 10.1016/j.toxicon.2004.11.005
- NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Ojito, R. K., Herrera, S. Y., Vega, P. N., & Portal, V. O. (2012). Actividad antioxidante in vitro y toxicidad de extractos hidroalcohólicos de hojas de Citrus spp. (Rutaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17(4), 368-379.
- OMS. (2017). Cáncer, nota descriptiva. Consultado en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- Oropeza, G. M. (2012). *Alcaloides totales y actividad antioxidante de extractos metanólicos de hojas de Ipomoea murucoides (casahuate)* (Tesis para obtener título de Ingeniero en alimentos). Universidad Tecnológica de la Mixteca, Huajuapán de León, Oaxaca, México.
- Palacios, R. N., Burtin, D., & Leech, M. (2004). Biología molecular, una herramienta para la bioprospección del metabolismo secundario de plantas en Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 6(2), 67-77.
- Pinto P., & Ruiz P. (1986). Flora de Colombia. *Crotalaria*. Instituto de Ciencias Naturales. Bogotá, Colombia.
- Pitanga, B. P. S., Silva, V. D., Souza, C. S., Junqueira, H. A., Fragomeni, B. O., Nascimento, R. P.,... Costa, S. L. (2011). Assessment of neurotoxicity of monocrotaline, an alkaloid extracted from *Crotalaria retusa* in astrocyte/neuron co-culture system. *NeuroToxicology*, 32, 776-784.
- Qinhu, S., & Guixin, C. (2015). Isoflavonoids from *Crotalaria albida* Inhibit Adipocyte Differentiation and Lipid Accumulation in 3T3-L1 Cells via Suppression of PPAR- γ Pathway. *PLOS ONE*, 10(8), 1-13. doi: 10.1371/journal.pone.0135893
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición hospitalaria*, 27(1), 76-89. doi: 10.3305/nh.2012.27.1.5418
- Rabaza, J., Fundora, H., Rodríguez, A., & Hernández, M. (2010). Sonografía de bazo y timo como elemento evaluador de la respuesta inmune en niños con infecciones recurrentes. *VacciMonitor*, 19(2), 5-10.
- Ralph, S., Rodríguez, E. S., Neuzil, J., Saavedra, E., & Moreno, S. R. (2010). The causes of cancer revisited: "Mitochondrial malignancy" and ROS-induced oncogenic transformation – Why mitochondria are targets for cancer therapy. *Molecular Aspects of Medicine*, 31, 145-170.
- Ramos, B. E., Paz, V. J., & Ortiz, S. G. (2014). Determinación del contenido de hierro, saponinas y porfirinas en *Cassia grandis* L, procedente de Masaya, Chinandega y Jalapa durante el periodo de mayo 2013, abril del 2014. (tesis que para obtener el título de Químico Farmacéutico). UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA UNAN-LEON. Nicaragua, León.



- Reimann, A., Nurhayati, N., Backenköhler, A., & Ober, D. (2004). Repeated Evolution of the Pyrrolizidine Alkaloid-Mediated Defense System in Separate Angiosperm Lineages. *The Plant Cell*, 16, 2772-2784.
- Reuter, S., Gupta, S., Chaturvedi, M., & Aggarwal, B. (2011). Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?. *Free Radic Biol Med*, 49(11), 1603-1616. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006.
- Ribeiro, H. J., Silva, V. G., Sousa, R. F., Sena, F. J., Barbosa, F. J., Torres, A. C.,... Mendes, V. S. (2012). Monocrotaline: Histological Damage and Oxidant Activity in Brain Areas of Mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. doi: 10.1155/2012/697541
- Riet, C. F., Carvalho, K. S., Dantas, A. F. M., & Medeiros, R. M. T. (2011). Spontaneous acute poisoning by *Crotalaria retusa* in sheep and biological control of this plant with sheep. *Toxicon*, 58, 606-609. doi: 10.1016/j.toxicon.2011.09.002
- Robles, C. J., Ruvalcaba, L. E., Maffuz, A., & Rodríguez, C. S. (2011). Cáncer de mama en mujeres mexicanas menores de 40 años. *Ginecol Obstet Mex*, 79(8), 482-488.
- Rockinger, A., Silva, F. A., & Renner, S. (2017). Clock-dated phylogeny for 48% of the 700 species of *Crotalaria* (Fabaceae-Papilionoideae) resolves sections worldwide and implies conserved flower and leaf traits throughout its pantropical range. *BMC Evolutionary Biology*, 1-13. Doi: 10.1186/s12862-017-0903-5
- Rojas, H. M., & Martínez, P. T. (2010). Peroxidación de lípidos y sus efectos sobre la salud. *Lípidos y salud*, 10(3), 1-8.
- Rossi, C., De León, M., González, G., & Pereyra, A. (2007). Presencia de metabolitos secundarios en el follaje de diez leñosas de ramoneo en el bosque xerófito del Chaco árido Argentino. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 7(2), 133-143.
- Ruíz-Gómez, G., Andamayo, F. D., Castillo, A. D., Ruíz, P. M., & Navarro, R. V. (2010). Determinación de los niveles plasmáticos de óxido nítrico en animales de experimentación, por influencia de la altura. *BIOFARBO*, 18(2), 85-89.
- Ruíz-Reyes, S., Venegas, C. E., Chávez, G. M., & Eustaquio, S. C. (2010). Identificación preliminar de los metabolitos secundarios de los extractos acuosos y etanólicos del fruto y hojas de *Morinda citrifolia* L. "noni" y cuantificación espectrofotométrica de los flavonoides totales. *UCV – Scientia*, 2(2), 11-22.
- Ruíz-Sanjuán, M. (2005). Estudio de las actividades específicas de la aminopeptidasa regulada por insulina (IRAP/P-LAP) y las aminopeptidasas formadoras de angiotensina IV en el suero de ratas con cáncer de mama inducido por N-Metil-Nitrosourea (NMU). (Trabajo de investigación tutelado). UNIVERSIDAD DE JAÉN.
- Rundhaug, J., & Fischer, S. (2010). Molecular Mechanisms of Mouse Skin Tumor Promotion. *Cancers*, 2, 436-482. doi : 10.3390/cancers2020436
- Sáez, R. A. (2013). El rol de los carbohidratos en la inducción a la floración en *Lesquerella mendocina*. Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Católica Argentina. Disponible en: <http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/rol-carbohidratos-induccion.pdf>
- Samuelson, E. (2008). *Analyses of Rat Tumor Models for DMBA-induced Fibrosarcoma and Spontaneous Endometrial Carcinoma*, Lundberg Institute, University of Gothenburg.
- Sánchez, V. V., & Méndez, S. N. (2013). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Rev Invest Med Sur Mex*, 20(3), 161-168.
- Santaballa, B. A. (2015). "Cáncer de mama". Consultado de <http://www.seom.org/es/info-sobre-el-cancer/cancer-de-mama?showall=1>



- Sepúlveda, J. G., Porta, D. H., & Rocha, S. M. (2003). La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3), 355-363.
- Serrano, C. A., & Suárez, S. F. (2014). Efectos quimiopreventivos del jugo de *Morindia citrifolia* (noni) sobre cáncer mamario experimental en ratas: estudio preliminar. *Rev. Med. Vet.*, (27), 41-57.
- Schlaepfer, L., & Mendoza, E. J. (2010). Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 41(4), 17-27.
- Silva, N. J., Barreto, R. A., Pitanga, B.P., Souza, C. S., Silva, V. D., Silva, A. R.,... Costa, S. L. (2010). Genotoxicity and morphological changes induced by the alkaloid monocrotaline, extracted from *Crotalaria retusa*, in a model of glial cells. *Toxicon*, 55, 105-117. doi: 10.1016/j.toxicon.2009.07.007
- Sorenmo, K., Rasotto, R., Zappulli, V., & Goldschmidt, M. (2011). Development, Anatomy, Histology, Lymphatic Drainage, Clinical Features, and Cell Differentiation Markers of Canine Mammary Gland Neoplasms. *Veterinary Pathology*, 48(1), 85-97. doi: 10.1177/0300985810389480
- Sotelo, D. I., Casas, F. N., & Camelo, M. G. (2010). Borojó (*Borojoa patinoi*): Fuente de polifenoles con actividad antimicrobiana. *Vitae*, 17(3), 329- 336.
- Soto, V. M. (2015). Estudio fitoquímico y cuantificación de flavonoides totales de las hojas de *Piper peltatum* L. y *Piper aduncum* L. procedentes de la región Amazonas. *In Crescendo. Institucional*, 6(1), 105-116.
- Sumi, F., Ansari, P., Azam, S., Nazneen, S., Sultana, M., Uddin, N., & Baidya, T. (2015). In-vitro Investigation of Anti-Coagulation Property of Four Bangladeshi Plants of *Crotalaria* Species and Analysis of their Qualitative Bioactive Compounds. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical*, 7(4), 740-744.
- Talaviya, P., Vyas, B., Sharma, D., Indoria, S., & Suman, R. (2014). Anti-inflammatory activity of four fractions of ethanolic extract of *Crotalaria burhia* Buch.-Ham. Root in rats. *National Journal of Physiology, Pharmacy & Pharmacology*, 4(3), 213-217. doi: 10.5455/njppp.2014.4.120420141
- Tolosa, L., & Cañizares, E. (2002). Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. *Ars Pharmaceutica*, 43, 37-55.
- Valencia, L. E., Cuéllar, R. I., Aguilar, R. I., Salmerón, A. A., & Rodríguez, C. F. (2012). Implementación del método de biuret para la determinación de proteína residual en lactosuero. *Revista Sistemas Ambientales*, 5(1), 21-24.
- Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cáncer. *Chemico-Biological Interactions*, 160, 1-40. doi: 10.1016/j.cbi.2005.12.009
- Velásquez, V. A. (s.a.). Extracción de taninos presentes en el banano verde. *Revista Lasallista de investigación*, 1(2), 17-22.
- Venegas, C. E. (2012). Cuantificación de flavonoides totales y taninos presentes en el extracto acuoso de hojas de *Thea sinensis* L. y su capacidad antioxidante. *UCV – Scientia*, 4(2), 161-175.
- Venereo, G. J. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit*, 31(2), 126-133.
- Viñas, G., Puig, T., & Porta, R. (2012). Estrés oxidativo en pacientes con cáncer: dos caras de una misma moneda. *Medicina Clinica*, 139(4), 171-175.



- Weigelt, B., Peterse, J., & Veer, L. (2005). Breast cancer metastasis: markers and models. *Nature Publishing Group*, 5, 591-602.
- Wibowo, A. E., Sriningsih., Wuyung, P. E., & Ranasasmita, R. (2010). The Influence of DMBA (7,12-dimethylbenz-[a]anthracene) Regimen In The Development of Mammae Carcinogénesis on Sprague Dawley Female Rat. *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention*, 1(1), 60-66.
- Consulta en línea *Crotalaria retusa* <http://botany.si.edu/bdg/medicinal/index.html>
- Consulta en línea *Crotalaria retusa* <http://tropical.theferns.info/viewtropical.php?id=Crotalaria+retusa>
- Consulta en línea *Crotalaria retusa* <http://botany.si.edu/bdg/medicinal/index.html>

ANEXOS

1. Fotografías de formación de tumores



Fig. 27 Formación de tumor en cuello de raton hembra inducida con DMBA

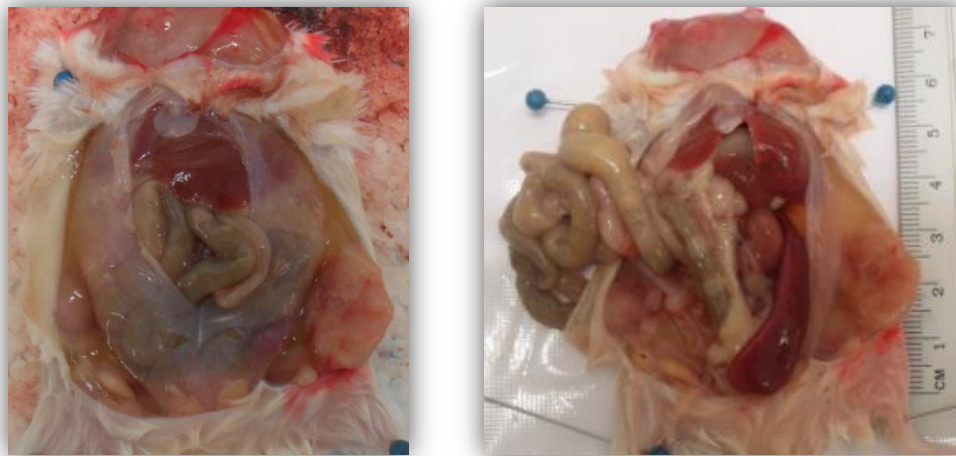


Fig. 28 Tumor en mamas de lado derecho e izquierdo de ratón hembra (cepa CD-1) tratada con el extracto acuoso de planta completa de *Crotalaria retusa*

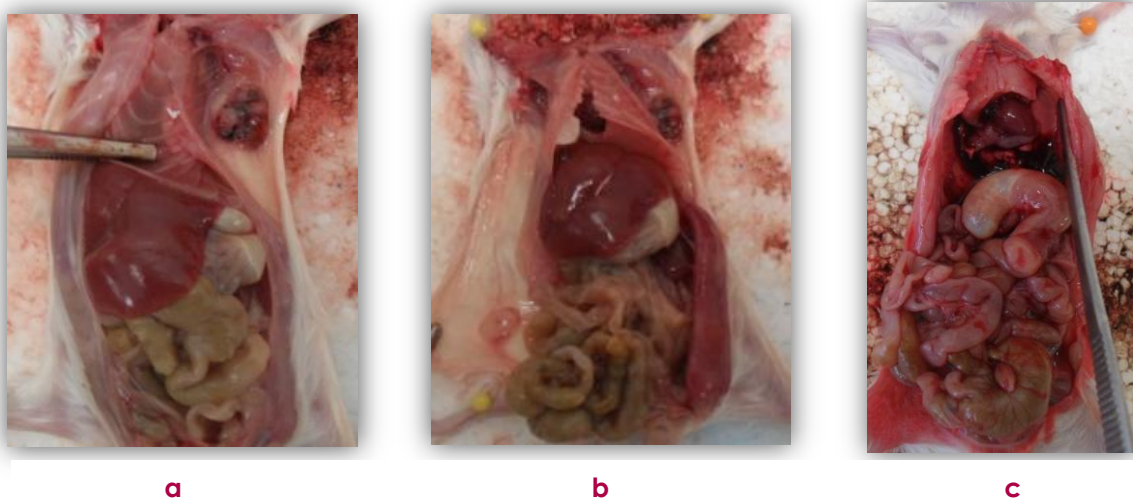


Fig. 29 Ratones hembra (cepa CD-1) inducidos a cáncer con DMBA y tratados con extracto acuoso de hoja de *Crotalaria retusa*. **a** Tumor en mama superior. **b** Tumor en mama inferior y bazo con esplenomegalia. **c** Tumor en pecho comprimiendo corazón y pulmones

2. Revisión a bazo

Al momento de la disección de los ratones se extirpo bazo. Se observó un tamaño entre los 2.2-4.4cm, saliendo de las medidas normales el bazo de los grupos tratados con hoja acuoso y planta completa acuoso.

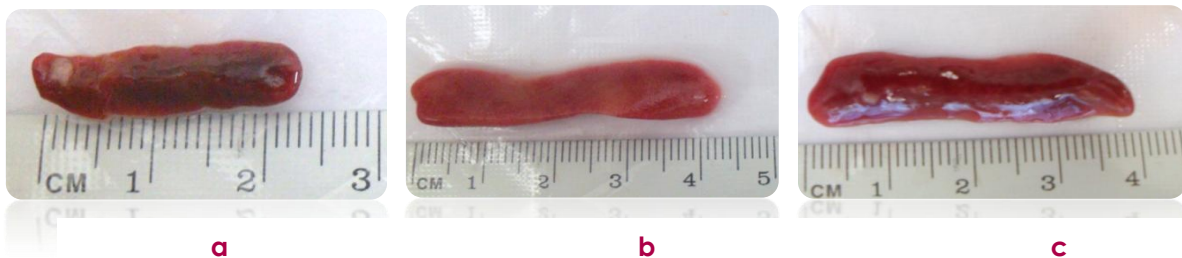


Fig. 30 **a** Bazo de ratón del grupo control con crecimiento normal, la medida del bazo de todos los ratones de este grupo fue de entre 2.2-2.4cm; **b** Bazo inflamado de ratón del grupo tratado con hoja acuoso inducido con DMBA; **c** Bazo inflamado de ratón del grupo tratado con planta completa.