



Universidad Nacional
Autónoma de México



Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

**Respuesta antioxidante de *Plantago major* L.
en un modelo de cáncer**

Tesis

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGA

Presenta:

Eyra Gabriela Salinas Arreortua

Directora de tesis:

M. en C. Catalina Machuca Rodríguez

CDMX, 2018





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.



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 está protegido por la Ley Federal del Derecho del 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 del 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.



Dedicatorias

Como muestra de amor, dedicación y enseñanza brindada, este título es para ustedes papas, gracias María del Carmen por el cariño, el apoyo y la comprensión que siempre tienes para mí ante cualquier situación, gracias Luis por la fuerza, el cariño que me brindas y las palabras de ánimo que siempre me dices por las mañanas. A los dos, por el esfuerzo y sacrificio demostrado día a día, por los valores que han forjado en mí y por los ejemplos que han formado, esto no hubiese sido posible sin ustedes. Con todo el amor y gratitud que les tengo, este logro es para ustedes, los amo.

A mis tres hermanos. He logrado una meta y esta meta también es de ustedes, son y serán siempre mi mayor y más bello ejemplo, con todo mi cariño los amo.

Manito Noe, mi querido Dr. gracias por ser guía fundamental en mi carrera, por tus consejos de fortaleza, por esas risas y dedicación que siempre me has brindado. Por ayudarme a crecer y porque sigo aprendido de ti, nunca olvides la grandeza con la que te miro.

Manito Luis, mi querido Dr. gracias por las muestras de cariño, por esos brazos que me han brindado siempre confianza, porque has creído en mí, porque siempre recuerdo lo grande y brillante que eres y por ser mi más grande ejemplo.

Manito Anuar, mi querido Antropólogo, gracias por compartir y enseñarme día a día, por ser tan leal a nuestro cariño, por ser mi compañero de risas y peleas, y por hacerme amenas tantas y tantas noches de trabajo al escucharte tocar tu guitarra.

A Jatziry, Noah, Ian, Yaretzi y Yareni, esto también es dedicado para ustedes, porque siempre tenerlos a mi lado me hacen tan feliz, por las risas, abrazos y amor más sincero y bonito, con todo mi cariño gracias, son el más hermoso regalo que la vida me ha dado, los amo.

Esto también va dedicado con cariño para ti Francisco, por la paciencia y dulzura que hay en tu persona gracias, por esas pláticas de enseñanza y cordura que compartimos, por estar en todo momento conmigo, porque siempre tienes un aliento de amor para mí y por todo este tiempo dedicado, a ti mi bello compañero de carrera gracias amor, te amo.

A quienes han recorrido un largo camino conmigo y han estado en todo momento. A ti amiga Karla, por recorrer esta vida juntas, porque a pesar de las circunstancias has sido claro ejemplo de fuerza, y porque espero creas en ti tanto como yo, deseo que muy pronto compartas conmigo tus metas. A ti amiga Karis y amigo Ale, gracias por haber compartido las aulas en los años de prepa, por brindarme la confianza, por compartir momentos buenos y malos, pero siempre juntos, y porque pronto festejaremos una meta más. Gracias por tantas risas, momentos, enseñanzas y viajes, los amo.



Agradecimientos

A mi hermosa casa de estudios la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por brindarme tanto conocimiento y ayudarme a crecer personal y profesionalmente, gracias.

A la M. en C. Catalina Machuca Rodríguez, por haberme permitido formar parte de su proyecto en la UMIEZ, por las palabras de aliento, por el tiempo y enseñanzas compartidas, por ayudarme a crecer tanto, con mucho cariño gracias maestra, me llevo un enorme gusto haber trabajado con usted.

Al Dr. Ernesto Mendoza, por siempre darme palabras de aliento en aquellos días difíciles, por brindarme la confianza y amistad en toda ocasión, muchas gracias maestro, por ser tan profesional y no olvidar la esencia de ser estudiante.

A mis tíos Celerino y Eusebio por el apoyo incondicional que siempre me han brindado, porque siempre me impulsaron a seguir estudiando y por todo el cariño correspondido, muchas gracias.

Monse, gracias amiga por el tiempo compartido desde el inicio de carrera, por las horas y horas de platica y estudio en los pastos, por enseñarme la bondad y empatía, y porque he aprendido de ti muchísimas cosas, más de las que te puedes imaginar. Claudia, gracias amiga, por la confianza que me has brindado, porque no hay día que no me regales una sonrisa y por los momentos que hemos vivido y que nos faltan por vivir, las amo.

Lalo, Kalid, Max, Luis y Jovani, con quienes compartí viajes, momentos de alegría y a quienes también considero amigos no menos que otros, gracias.

A quienes me ayudaron en mi trabajo experimental y a quienes considero grandes y ejemplares amigos, gracias Poncho y Yaz.

A Clari, gracias por haber sido una compañera ejemplar, por las risas y momentos que vivimos en laboratorio y porque siempre trataré de aprender lo ordenada y la paciencia con la que haces tu trabajo.

A mis compañeros con quienes compartí algún momento de la carrera y fuimos testimonio de lo difícil y bonita que es, gracias.

A la comunidad de Limón Chiquito, Veracruz, que me abrió las puertas y me brindó la información necesaria para realizar este estudio, especialmente a la señora Verónica Ramírez por su disponibilidad y tiempo, muchas gracias.

A los miembros de mi jurado a la Dra. Francisca Leonora Sánchez y García Figueroa, a la Mtra. María Judith Villavicencio Macías, a la Mtra. Balbina Vázquez Benítez y a la Biól. Ana Laura Maldonado Tena. Gracias a todos y cada uno de



ustedes por brindarme su tiempo en la revisión de mi estudio, por las críticas y observaciones que hicieron para mejorar este trabajo.



Índice

1. Abreviaturas	1
2. Resumen	3
3. Marco teórico	4
3.1 Cáncer de mama	5
3.1.2 Factores de riesgo	8
3.3 Causas del cáncer de mama	9
3.3.1 Especies reactivas de oxígeno (ERO)	9
3.3.2 Especies reactivas de nitrógeno (ERN).....	11
3.3.3 Generación de especies reactivas	11
3.4 Función de los antioxidantes	14
3.5 Marcadores de estrés oxidante	15
3.6 Tratamientos contra el cáncer.....	17
3.7 Etnobotánica	17
3.8 Generalidades de <i>Plantago major</i> L.....	18
3.8.1 Clasificación taxonómica	19
3.8.2 Estudios de <i>Plantago major</i> L.	20
3.9 Fitoquímica.....	23
3.10 Metabolitos secundarios	23
3.11 Inductor de cáncer de mama.....	30
4. Justificación	32
5. Hipótesis	33
6. Objetivo general	33
6.1 Objetivos particulares	33
7. Material y método	34
7.1 Zona de estudio	34
7.1.2 Registro de información etnobotánica	34
7.1.3 Material vegetal.....	35
7.2 Cuantificación de azúcares totales presentes en <i>Plantago major</i>	35
7.3 Identificación de grupos de metabolitos secundarios.....	36
7.4 Cuantificación de grupos de metabolitos secundarios	39
7.4 Diseño experimental	42
7.4.1 Inducción de carcinoma.....	42
7.4.2 Tratamiento con extractos <i>Plantago major</i> en ratones	44



7.5 Obtención de plasma y homogenado de hígado	45
7.5.1 Extirpación de tumores.....	45
7.6 Cuantificación de proteína en plasma e hígado	46
7.7 Evaluación de marcadores de estrés oxidante	47
7.7.1 Óxido Nítrico (NO).....	47
7.7.2 Catalasa	48
7.7.3 Lipoperoxidación lipídica	48
8. Análisis estadístico ANOVA.....	49
9. Resultados.....	50
9.1 Información etnobotánica	50
9.1.2 Obtención de extractos de <i>Plantago major</i>	51
9.1.3 Cuantificación de azúcares totales de <i>Plantago major</i>	53
9.4 Identificación y cuantificación de grupos de metabolitos secundarios en extractos de <i>Plantago major</i>	53
9.6 Evaluación de marcadores de estrés oxidante	71
10. Discusión.....	78
11. Conclusiones	85
12. Referencias.....	86
Anexo 1.	97



1. Abreviaturas

µg: microgramos

µL: microlitros

•OH: Radical hidroxilo

ANOVA: Analysis Of Variance

BRCA1 y 2: Gen situado en el cromosoma 17.

CAT: Catalasa

Da: Dalton

DMBA: 7,12-dimetilbenzo[a]antraceno

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ERN: Especies reactivas de nitrógeno

ERO: Especies reactivas de oxígeno

F.A: Flor acuoso

F2-IsoP: F2-isoprostanos

GPXs: Glutación peroxidasa

Gr: Glutación reductasa

H.A: Hoja acuoso

H.H: Hoja hidroalcohólico

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HNE: 4-Hydroxy-2-nonenal

HO₂: Radical perhidroxilo

IBM® SPSS® Statistics: Statistical Package for the Social Sciences

kWh: kilovoltio-hora

m.s.n.m: metros sobre el nivel del mar

MDA: Malondialdehído



MEXU: Herbario Nacional de México

mM: milimolar

N: Nitrógeno

N₂O₃: Trióxido de dinitrógeno

NADPH: Nicotinamida-adenina dinucleotido fosfato

NO: Óxido de nitrógeno

NO₂: Dióxido de nitrógeno

NO₃: Nitrato

NOS: Óxido nítrico sintasa

NOSmt: Sintetasa Óxido Nítrico mitocondrial

O₂: Oxígeno molecular

O₂••: Anión superóxido

O₃: Ozono

OH•: Ion hidroxilo

ONOO•: Anión peroxinitrito

PVPP: Polivinilpolipirrolidona

R.A: Raíz acuoso

R.H: Raíz hidroalcohólico

RL: Radicales libres

RN: Nitrato reductasa

ROO•: Radical peroxilo

SOD: Superóxido dismutasa

TRIS: tris(hidroximetil)aminometano

UCAT: Unidades de catalasa

UV: Radicación ultravioleta



2. Resumen

En este estudio se evaluaron efectos de *Plantago major* L. en un proceso de cáncer de mama inducido en roedores.

En México, una de las principales causas de muerte entre la población femenina es el cáncer de mama. A pesar de los diversos tratamientos que hay para el cáncer, estos tienen efectos secundarios al no ser específicos. Debido al impacto negativo de los tratamientos, se ha recurrido al uso de plantas medicinales como medicina alternativa. Debido a esto, se ha incrementado el interés en la investigación de los principios activos y sus efectos en diversas patologías particularmente en cáncer.

Plantago major L. es una planta herbácea, distribuida desde Canadá hasta Brasil, en México es comúnmente conocida como Llanté y se utiliza para tratar diversas enfermedades como oculares, respiratorias, hematológicas y cáncer de mama. Estudios reportan que *Plantago major* tiene diferentes actividades como antiinflamatoria, antihelmíntica, bacteriana y antioxidante que se atribuyen a la presencia de metabolitos secundarios.

De acuerdo a lo anterior, el objetivo del presente estudio consistió en determinar el efecto de los extractos acuosos e hidroalcohólicos de *Plantago major* en un proceso de cáncer de mama en murinos CD₁ inducido con el carcinógeno DMBA (7,12-dimetilbenzo (α) antraceno), mediante la evaluación de marcadores de estrés oxidante como óxido nítrico, catalasa y lipoperoxidación lipídica en plasma y homogenado de hígado.

Encontrando que los extractos de *Plantago major* ejercen efecto antioxidante gracias a las moléculas presentes como polifenoles, cumarinas, saponinas y saponinas esteroideas, el extracto acuoso de hoja aumentó la actividad enzimática de catalasa en sangre e hígado, el extracto acuoso de hoja disminuyó la concentración de óxido nítrico en plasma, y el extracto acuoso de raíz inhibió el daño a membrana celular en hígado en roedores CD₁.

3. Marco teórico

El cáncer es un grupo de enfermedades que se caracteriza por un crecimiento tisular de células anormales producto de una proliferación continua, las cuales tienen la capacidad de invadir y destruir tejidos adyacentes (Gandur, 2009). En el 2016 el INEGI reportó más de 100 tipos diferentes de cáncer (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2016).

Las células cancerígenas adquieren propiedades distintivas como potencial replicativo ilimitado, auto-suficiencia en señales de crecimiento, inhibidores de supresores de crecimiento, evasión de apoptosis, potencial inflamatorio, inestabilidad y mutación genómica, desregulación celular energética, y son capaces de evadir el sistema inmunitario e influir en las células normales para crear microambientes (angiogénesis) y lograr invadir otros tejidos, lo que se conoce como metástasis (Figura 1) (Medina, 2011).



Figura 1. Características del cáncer. Tomado de Sánchez, 2013.

A nivel mundial las enfermedades cardiovasculares, respiratorias, diabetes y cáncer presentan una incidencia del 70% de las muertes anuales. Estas



enfermedades suelen ser crónicas, no transmisibles, de larga duración y progresión lenta

En el 2015 se atribuyeron 8.8 millones de muertes causadas por cáncer, una de cada 6 defunciones en el mundo, los más comunes son el de pulmón, hígado, estómago, colon y mama. (Organización Mundial de la Salud, 2018).

En América Latina, el cáncer de mama es el cáncer más frecuente con 152,059 casos diagnosticados anualmente, una cuarta parte (24.9%) de los casos son asignados para cáncer en mujeres. En México a partir del año 2006, se ubica el cáncer de mama como la primera causa de muerte en la mujer. Actualmente se estima una ocurrencia de 20,444 casos en mujeres al año, con una incidencia de 35.4 casos por 100,000 mujeres (Secretaría de Salud, 2015).

3.1 Cáncer de mama

El cáncer de mama se define como un crecimiento anormal y desordenado de las células de la glándula mamaria, el cual tiene la capacidad de diseminarse (Secretaría de Salud, 2009). Morfofisiológicamente la glándula mamaria es una glándula sudorípara modificada, compuesta en un 80 al 85% de tejido adiposo. Se ubica sobre la fascia superficial anterior a la musculatura pectoral y a la pared torácica anterior. Los tejidos mamarios están unidos a la piel que los recubre y al tejido subcutáneo mediante bandas fibrosas o aponeuróticas llamadas ligamentos de Cooper, estos ligamentos son los encargados de sostener la mama en posición erecta sobre la pared torácica. Las glándulas dentro de las mamas son tubuloalveolares compuestas, contienen de 15 a 20 lóbulos que se irradian desde el pezón, separados entre sí, por tejido adiposo y conectivo colagenoso. Cada lóbulo es drenado por su propio conducto lactífero que lleva directamente al pezón, antes de llegar al pezón cada uno se dilata para formar un seno lactífero los cuales se estrechan para desembocar en el pezón. Los conductos y los lobulillos están tapizados por dos tipos de células; las mioepiteliales contráctiles con miofilamentos que se disponen como una malla sobre la membrana basal y las células epiteliales luminales que se superponen a las células mioepiteliales (González y Ugalde, 2012). El pezón, está rodeado por un disco de piel altamente pigmentada conocido como areola (Figura 2) (Vinagre, 2015).

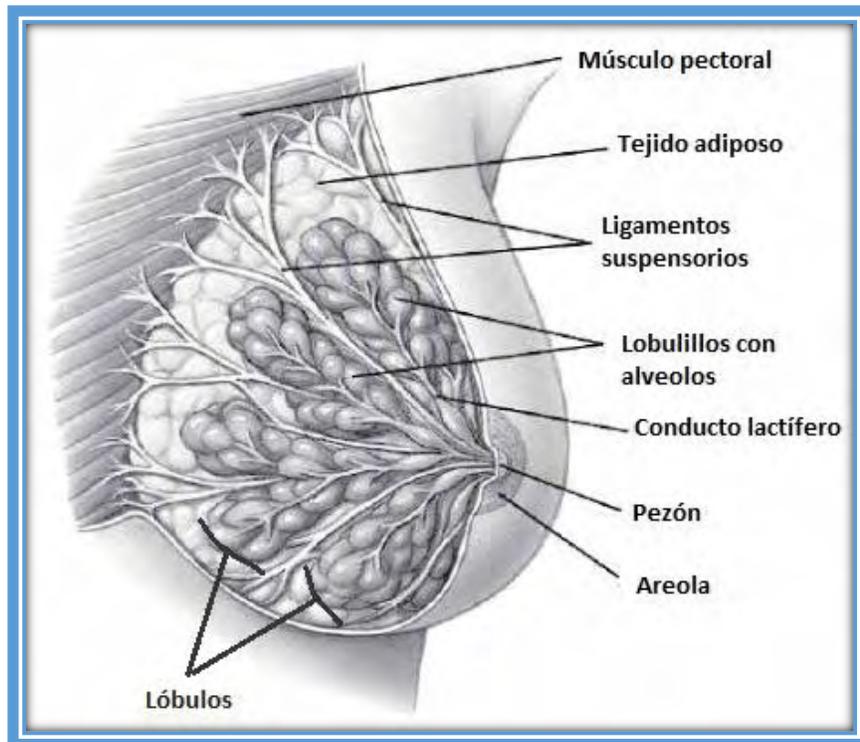


Figura 2. Estructuras de la glándula mamaria. Tomado de pág. web: Torres, 2018.

Existen dos tipos (modelos) de cáncer de mama; *in situ* e invasivo. El carcinoma *in situ*: no ha atravesado las uniones entre los tejidos (Guzmán *et al.*, 2012). El carcinoma invasor es aquel que invade más allá de la membrana basal y se introduce en el estroma mamario, el cual puede llegar a invadir los vasos sanguíneos y/o ganglios linfáticos regionales a distancia.

Las frecuencias de los tipos histológicos de carcinoma de mama el ductal con el 79%, el lobulillar con un 10%, tubular con el 6%, el mucinoso con 2%, el medular con 2%, el papilar con el 1% y el metaplásico con el 1% (Quirós *et al.*, 2010). El carcinoma ductal *in situ* no es invasivo, y se localiza en los conductos. El ductal invasivo (infiltrante) tiene comienzo en un canal o conducto lácteo, este penetra la pared del conducto invadiendo de esta manera el tejido del seno, realizando metástasis (Figura 3). El carcinoma lobulillar *in situ* con hiperplasia atípica se origina en los lobulillos de la mama. El lobulillar invasivo (infiltrante) se origina en los lobulillos de la glándula mamaria, propagándose a través de la pared de los lobulillos, el cual puede desencadenarse a metástasis (Figura 4) (Guzmán *et al.*, 2012).

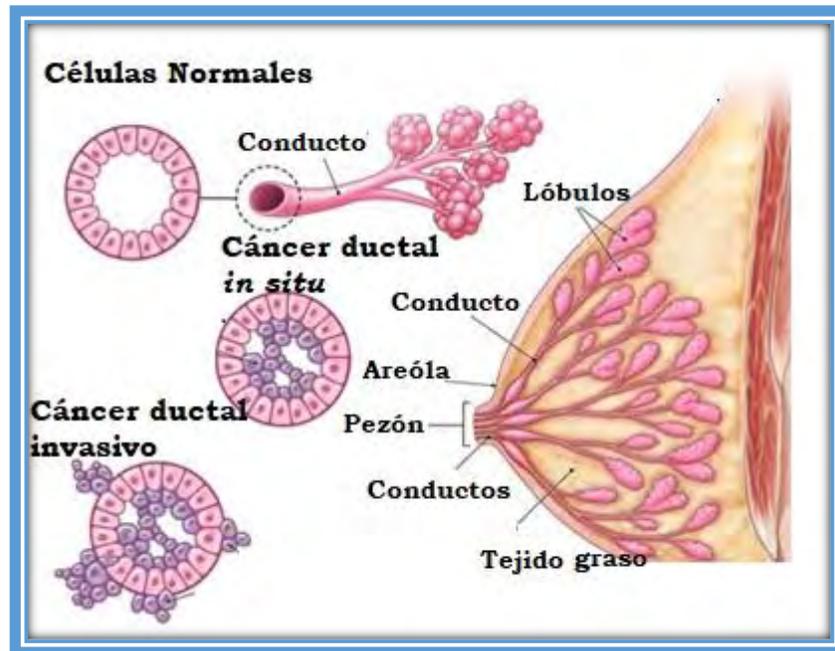


Figura 3. Estructura de la glándula mamaria donde se origina el cáncer ductal. Tomado de pág. web: Golgeon group Inc., 2017.

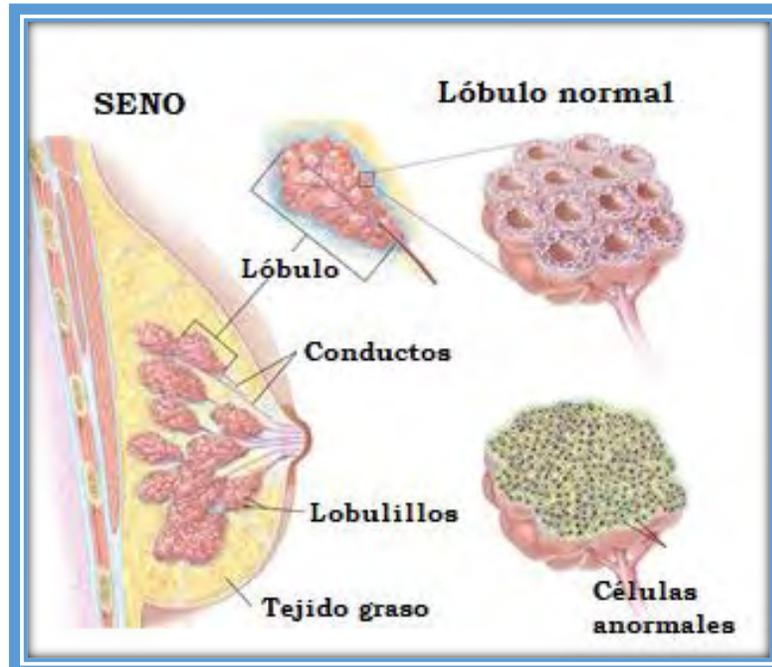


Figura 4. Estructura de la glándula mamaria donde se origina el cáncer lobulillar. Tomado de pág. web: Instituto Nacional del Cáncer, 2017.



3.1.2 Factores de riesgo

La causa del cáncer es multifactorial, debido a que son varios los factores de riesgo que están relacionados en la aparición del cáncer de mama, algunos son considerados más importantes que otros.

Biológicos

- Edad. El riesgo de padecerlo es mayor entre los 50 y 60 años, y en una menopausia tardía, o sea después de los 50 años.
- Factores hormonales. Menstruación a edad muy temprana. Tratamientos hormonales (estrógenos y/o progestinas) con fines anticonceptivos o de remplazo hormonal.
- Reproductiva. Tener el primer embarazo a edad avanzada (después de los 30 años) o ausencia de embarazo.
- Herencia. Mujeres con antecedentes familiares directos (madre, hermana e hija). Presencia de mutación de genes BRCA1 Y BRCA2, cerca de un 50-60 % de las mujeres con mutaciones en estos genes desarrollarán cáncer de mama.
- Antecedentes personales. Cuando una mujer ha tenido una patología mamaria benigna tienen mayor riesgo de desarrollar la enfermedad que aquellas mujeres que no han tenido algún cambio en la mama.

Ambientales

- Exposición a radiaciones ionizantes, durante el desarrollo o crecimiento.
- Tratamiento con radioterapia en tórax (infancia o adolescencia).

Estilo de vida

- Alimentación rica en grasas. Se ha observado que existe mayor riesgo en aquellas mujeres que tienen un consumo bajo de frutas y vegetales, y un consumo elevado de carnes rojas y de grasas saturadas.
- Obesidad (posmenopausia). Se estima que el 25 % de los casos son causados por sobre peso.
- Sedentarismo. Un estilo de vida sin ejercicio puede verse afectado en varios mecanismos: incremento en el nivel de estrógenos y testosterona, resistencia a la insulina, incremento en la inflamación y concentraciones bajas del sistema inmune.
- Alcohol. El riesgo incrementa debido al aumento en los niveles de estrógenos en la sangre y baja las concentraciones del sistema inmune.
- Tabaquismo. Favorece la aparición de tumores malignos.

(Cárdenas *et al.*, 2013, Pérez *et al.*, 2009, Asociación Española Contra el Cáncer, 2014).



3.3 Causas del cáncer de mama

El estrés oxidante es una situación bioquímica que se caracteriza por el desequilibrio entre los radicales libres y los mecanismos de defensa antioxidantes (Viñas *et al.*, 2012). Este desequilibrio está relacionado con numerosas enfermedades como la diabetes, alteraciones cardiovasculares y cáncer (Maldonado *et al.*, 2010).

Los radicales libres son elementos fundamentales en el metabolismo humano, sin embargo, constituyen un riesgo para algunas biomoléculas llegando a ocasionar daño a la célula. En dicho metabolismo se generan distintos tipos de radicales libres como especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN) (Maldonado *et al.*, 2010). Los radicales libres (RL) son moléculas cuyos átomos carecen de uno o más electrones lo que ocasiona que sean muy reactivos y tomen el electrón que les falta de la molécula vecina provocando la oxidación de esta última que a su vez, al quedar sin un electrón se convierte en un radical libre con capacidad de oxidar a otra molécula cercana, generando una reacción de cadena (Delgado *et al.*, 2010).

Existen radicales libres que se comportan como oxidantes o reductores, debido a que tienen la capacidad de donar o quitar un electrón de otra molécula. Su vida media en sistemas biológicos es de 6 a 10 segundos, aunque algunos radicales pueden sobrevivir más tiempo (Young y Woodside, 2001).

3.3.1 Especies reactivas de oxígeno (ERO)

El oxígeno molecular (O_2) es un átomo birradical esencial para la respiración (Scandalios, 1993), es altamente oxidante ya que acepta electrones de otras moléculas. Su molécula tiene dos electrones no apareados en su orbital externo que confiere la propiedad de ser un radical que reacciona con menor eficacia, pero de forma específica y selectiva con moléculas que tienen una configuración electrónica semejante (Maldonado *et al.*, 2010, Constanza y Muñoz, 2012). La adición de un electrón al oxígeno molecular forma el radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (Valko *et al.*, 2007). Este radical es el más abundante y común a nivel celular, se forma comúnmente en la cadena transportadora de electrones y en la fagocitosis. El ($O_2^{\bullet-}$) puede ser protonado formando al radical perhidroxilo (HO_2), ambos radicales pueden sufrir una dismutación espontánea, es decir, pueden ser oxidados o reducidos al mismo tiempo y generar especies más reactivas como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Benezer, Castro y García, 2008). Otra manera de formar al H_2O_2 se lleva a cabo cuando el $O_2^{\bullet-}$ reacciona con metales como el Fe^{2+} que, a su vez genera el radical hidroxilo ($\bullet OH$) (Gilead *et al.*, 2016). El H_2O_2 está compuesto por dos átomos de hidrógeno y dos átomos de oxígeno no es un radical libre, es una especie reactiva de oxígeno que se

genera en la matriz mitocondrial y en otros organelos celulares como en el retículo endoplásmico, peroxisomas y citosol (Constanza y Muñoz, 2012).

El radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), es la forma neutra del ion hidroxilo (OH^-) el cual está formado por un átomo de oxígeno y otro de hidrógeno, con una vida media de aproximadamente 9-10 segundos (Valko *et al.*, 2007). Reacciona con cualquier molécula cercana dada su alta reactividad y baja especificidad, su peligro depende de la molécula que atacó o del compartimento celular en el que se originó (Maldonado *et al.*, 2010) (Figura 5).

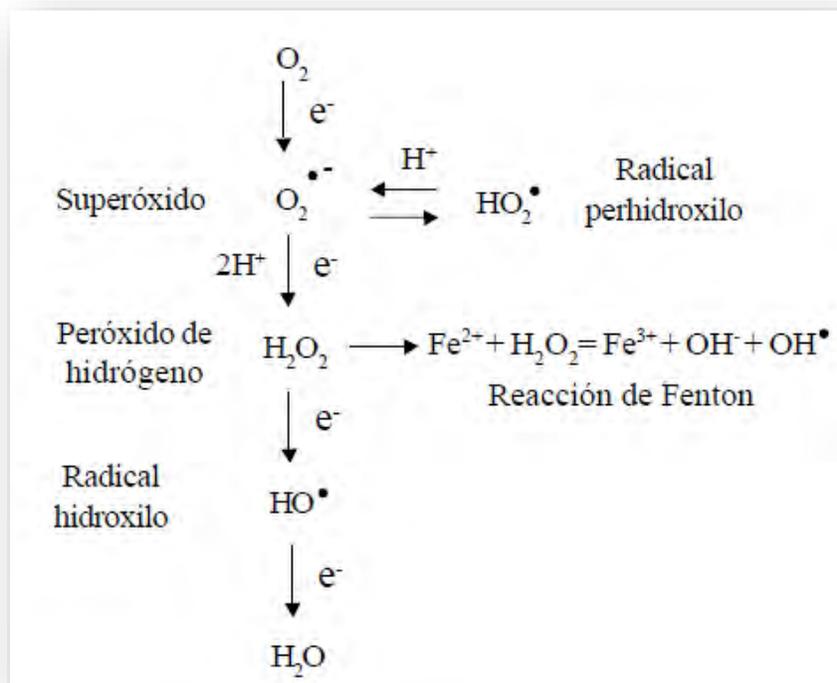


Figura 5. Formación de las especies reactivas de oxígeno. Tomado de (Benezzer, Castro y García, 2008)

La capacidad prooxidante de cada radical libre de oxígeno están determinado por factores como: reactividad, especificidad, selectividad y difusibilidad (Maldonado *et al.*, 2010). Los niveles bajos de ERO son indispensables en procesos bioquímicos como en la señalización intracelular, la diferenciación celular, progresión o detención del crecimiento celular, apoptosis y mecanismos inmunitarios contra microorganismos (Matés, Pérez y Núñez, 1999).



3.3.2 Especies reactivas de nitrógeno (ERN)

Las especies reactivas de nitrógeno están formadas por una pequeña molécula de óxido nítrico (NO), compuesta por un átomo de oxígeno (O) y un átomo de nitrógeno (N), cuando estos dos átomos se enlazan forman la molécula NO• que contienen un electrón desapareado, la presencia del electrón desapareado permite al NO• interactuar con otros átomos presentes en los sistemas biológicos. El NO• en el organismo es producido por mecanismos enzimáticos como la óxido nítrico sintasa (NOS) y nitrato reductasa (RN) (Benezzer, Castro y García, 2008). En ambientes acuosos su vida media del NO• es de pocos segundos y alcanza mayor estabilidad en ambientes con bajas concentraciones de oxígeno. El NO• es una molécula soluble en medios acuosos y lipofílica otorgándole una fácil difusión en la membrana plasmática y en el citoplasma (Valko *et al.*, 2007).

Tanto en el espacio intracelular como en el espacio extracelular NO• puede interactuar con otras moléculas generando efectos que agravan la producción de energía, transducción de señales, procesos de transporte y almacenamiento de oxígeno los cuales ocasionan daño a la célula. La interacción de NO• con iones y/o moléculas se conoce como nitrosación (Benezzer, Castro y García, 2008). El NO• funciona como vasodilatador, inhibidor de la agregación plaquetaria, neurotransmisor, en mecanismos de defensa y regulación inmunitaria (Archer, 1993).

3.3.3 Generación de especies reactivas

La formación de radicales libres ocurren por varios factores, que se clasifican en endógenos o exógenos (Young y Woodside, 2001) (Figura 6).

En los factores endógenos se encuentra la producción del O₂•⁻ principalmente en la mitocondria a través de la cadena transportadora de electrones. En este mecanismo los electrones pasan por diferentes moléculas donde algunos electrones escapan e interactúan con el oxígeno para producir radicales como es el anión superóxido. El sitio primario del radical superóxido es en el ADN mitocondrial ocasionando daño a la célula (Valko *et al.*, 2004).

En el sistema inmune los fagocitos requieren de la presencia de oxígeno para la destrucción y digestión de los agentes patógenos proceso en el cual se generan radicales libres. Durante los procesos inflamatorios el sistema inmunológico produce el anión superóxido y óxido nítrico los cuales pueden reaccionar y producir el anión peroxinitrito (ONOO⁻).



El peroxinitrito al ser un radical libre muy oxidante es agresivo y causa fragmentación al ADN y oxidación lipídica (Valko *et al.*, 2007).

Dentro de los factores exógenos está la contaminación atmosférica. El ozono (O_3) presente en el aire, no es un radical libre, pero puede reaccionar con diferentes moléculas generadas por la combustión vehicular como el óxido de nitrógeno (NO^*), dióxido de nitrógeno (NO_2) e hidrocarburos, llegando a ocasionar daños en el epitelio (Sierra *et al.*, 2004). Otro factor es la luz ultravioleta emitida por el sol (rayos UV) que generan $O_2^{\bullet-}$ y NO^* , causando un incremento en la concentración de peroxinitrito el cual induce efectos dañinos en las células que son irradiadas y en células no irradiadas ocasionando daño en el ADN (Passaglia *et al.*, 2017). La exposición a radiaciones ionizantes rompe enlaces, como en la molécula de agua que desencadena la producción de $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 y NO^* (Montoro *et al.*, 2014).

La inhalación de agentes químicos como el humo del cigarro contienen grandes cantidades de radicales libres que ocasionan graves daños (Sierra *et al.*, 2004). Así mismo los alimentos y bebidas con altas cantidades de grasas, conservadores, azúcares y fertilizantes para el caso de los vegetales, son generadores de radicales libres en el organismo humano (Delgado *et al.*, 2010).

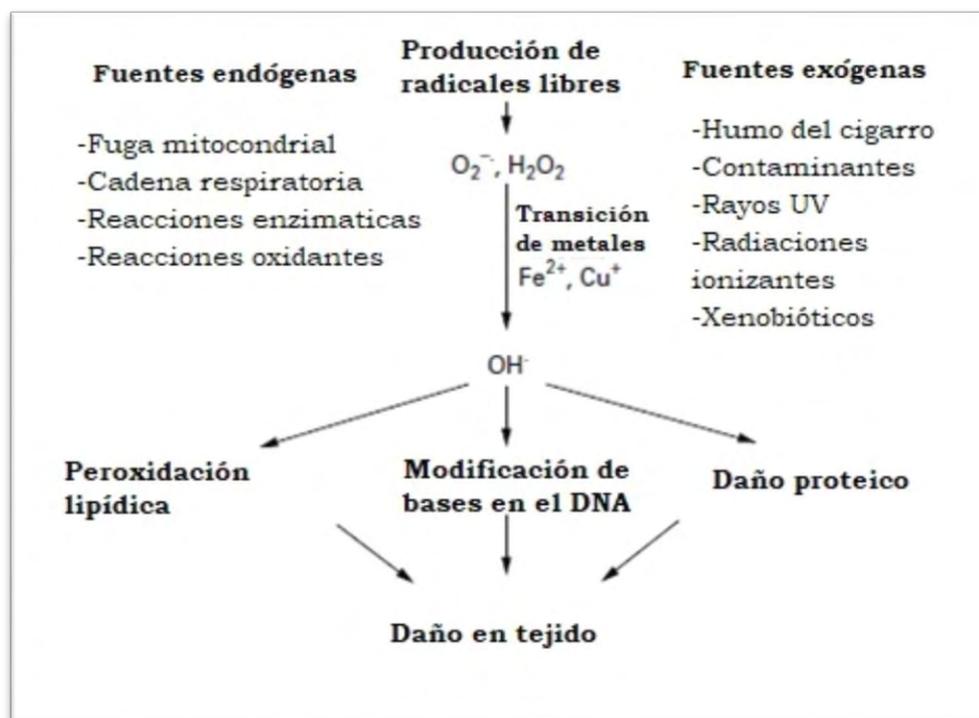


Figura 6. Formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Tomado de Young y Woodside, 2001.

La generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno ocasionan daño en tres tipos de macromoléculas (Figura 7):

1. Daño en proteínas debido a que tienen residuos susceptibles de ser atacados por los radicales libres, principalmente por el radical hidroxilo. Esta oxidación puede ocasionar un cambio conformacional en la proteína y en consecuencia hay pérdida y modificación en su función biológica. El daño causado suele ser irreversible y puede generar la desnaturalización de la proteína (Maldonado *et al.*, 2010).

2. Cuando hay daño en la membrana celular la principal forma de ataque es la lipoperoxidación lipídica, generando aldehídos como el malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinanoneal.

El mayor efecto de la lipoperoxidación lipídica se da cuando las especies reactivas oxidan los ácidos grasos polinsaturados de los fosfolípidos ocasionando alteraciones en la integridad de la membrana y desajuste en el funcionamiento de la célula (Gilead *et al.*, 2016).

3. El oxígeno se adiciona a las bases nitrogenadas (guanina y/o timina) o en las pentosas que constituyen el ADN, formando el radical peroxilo (ROO•). (Maldonado *et al.*, 2010). Ocasionando roturas en los filamentos, intercambios en las cromátidas hermanas, estas alteraciones pueden inactivar genes supresores de tumores dentro de las células anormales (Brown y Bicknel, 2001). Estas modificaciones producen diferentes daños como el envejecimiento y algunas enfermedades como las cardiopatías, neuropatías y cáncer (Scandalios, 1993).

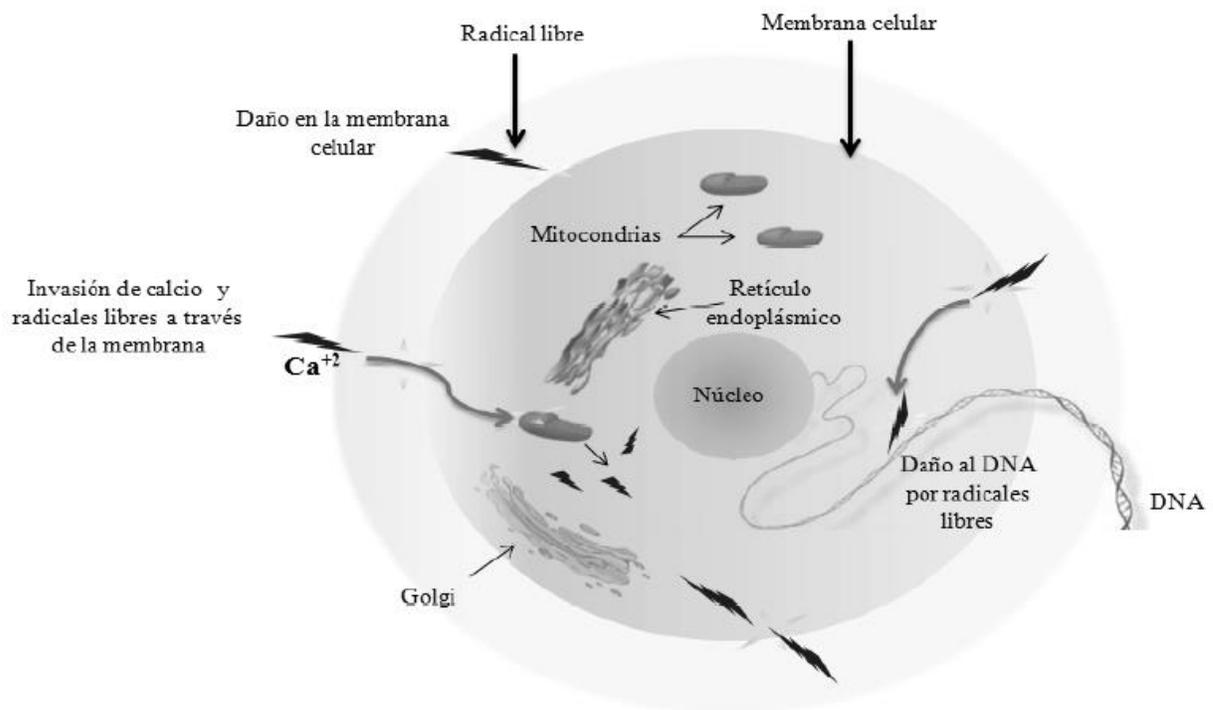


Figura 7. Daño celular provocado por las ERO y ERN. Tomado de Maldonado *et al.*, 2010.



En condiciones fisiológicas normales, el organismo neutraliza las ERO y ERN a través de mecanismos antioxidantes para evitar ciertos daños (Maldonado *et al.*, 2010).

3.4 Función de los antioxidantes

La exposición de los radicales libres ha llevado al organismo al desarrollo de diferentes mecanismos de defensa. Las moléculas antioxidantes son capaces de donar electrones para estabilizar a los radicales libres y neutralizar sus efectos dañinos (Delgado *et al.*, 2010). Este mecanismo de defensa está constituido por moléculas que se encuentran en concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable, las cuales actúan retrasando o previniendo de manera significativa su oxidación (Venereo, 2002). En condiciones fisiológicas, estos mecanismos de defensa mantienen una baja concentración de ERO y ERN en la célula (Sánchez *et al.*, 2004).

Los antioxidantes pueden ser de dos tipos:

Enzimáticas endógenas que incluyen la Superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT,) glutatión peroxidasa (GPXs), glutatión reductasa (Gr), entre otros.

No Enzimáticos exógenos como el ácido ascórbico (vitamina C), caroteno (vitamina A), tocoferol (vitamina E), selenio y metabolitos secundarios (Martínez *et al.*, 2011).

La enzima Superóxido dismutasa (SOD) cataliza la dismutación del anión superóxido para dar origen al peróxido de hidrógeno.



La SOD elimina principalmente al superóxido, durante la reacción una molécula de superóxido se oxida hasta convertirse en di-oxígeno, mientras que la otra se reduce a peróxido de hidrógeno. Esta enzima se localiza principalmente en mitocondrias, peroxisomas, citoplasma y en líquidos extracelulares como el plasma, linfa y sinovial (Barja, 1997).

La Catalasa: Es una enzima que se encuentra presente en todos los sistemas aerobios, en el organismo humano hay alta concentración en hígado y riñón, y una baja concentración en tejido conectivo y epitelios. Esta enzima cataliza la dismutación del peróxido de hidrógeno en agua y dióxígeno evitando que se forme el radical hidroxilo y el oxígeno singulete (Delgado *et al.*, 2010).



En esta reacción de la catalasa ocurre la transferencia de dos electrones entre dos moléculas de peróxido de hidrógeno, donde una molécula funciona como donadora y la otra como receptora de electrones (Díaz, 2003). La catalasa funciona como catalítica y peroxidativa, formando parte del sistema



antioxidante (Delgado *et al.*, 2010). A nivel celular se localiza en mitocondrias, peroxisomas, citosol (eritrocitos) (Venereo, 2002)

La glutatión peroxidasa (GPx) es una enzima que elimina hidroperóxidos utilizando como reductor al glutatión reducido (GSH) eliminando tanto a los orgánicos (ROOH) como inorgánicos (H_2O_2) (Barja, 1997). Esta enzima presenta dos formas: una requiere de selenio para su actividad y como sustrato peróxido de hidrógeno, y la otra forma no requiere de selenio y cataliza la degradación de peróxidos orgánicos (Korc *et al.*, 1995). La GPx está presente en el citosol y en las mitocondrias actúa de manera complementaria con la catalasa (Barja, 1997).

Los antioxidantes no enzimáticos exógenos provienen principalmente de la dieta, se conocen algunos alimentos que presentan compuestos como los flavonoides (cítricos, cebolla y frijol) otros presentan compuestos fenólicos (vino tinto, café y té) estas moléculas antioxidantes son consideradas de gran importancia debido a su acción protectora (Rodríguez *et al.*, 2015).

Cuando hay una producción de radicales libres y/o especies reactivas que superan la capacidad de acción de antioxidantes, se favorece la oxidación de biomoléculas generando metabolitos específicos, marcadores de estrés oxidante, los cuales pueden ser identificados y cuantificados (Barbosa *et al.*, 2008).

3.5 Marcadores de estrés oxidante

Tienen la capacidad de dar a conocer de manera inmediata y/o temprana la enfermedad y su progresión, los marcadores de estrés oxidante son sustancias, estructuras o productos que pueden ser medidos en tejidos y muestras (orina, suero, sangre) (Frijhoff *et al.*, 2015).

Existen una amplia variedad de marcadores biológicos para evaluar el estrés oxidante. Estos marcadores han sido desarrollados para determinar el daño mediado por los radicales libres o la generación de radicales *in vivo*, dentro de los cuales incluyen las mediciones directas (oxidación de lípidos, proteínas y ADN) e indirectas (basados en la capacidad antioxidante) ver cuadro 1 (Sánchez *et al.*, 2004).

Es posible que cuando se dispone de métodos más precisos para la medición de estrés oxidante todos pueden variar en función de diferentes factores como el ritmo circadiano, la fase postprandial, el tiempo, la temperatura, el tipo de muestra y condiciones de procesamiento. Así mismo, las diferentes mediciones podrían variar de acuerdo al tejido humano (Elejalde, 2001).



Cuadro 1. Marcadores de estrés oxidante empleados en el diagnóstico de enfermedades. Modificado de Frijhoff *et al.*, 2015.

Enfermedad	Muestra	Marcador de estrés oxidante
Cáncer		
Mama	Plasma	MDA (malondialdehído)
	Plasma	HNE (4-Hydroxy-2-nonenal)
Colon	Orina	F ₂ -IsoP (F ₂ -isoprostanos), Antioxidantes (vitamina E,C, Carotenos, Flavonoides, Polifenoles)
	Tejido	MDA (malondialdehído), HNE(4-Hydroxy-2-nonenal), Acroleína (2-propenal)
	Orina	F ₂ -IsoP (F ₂ -isoprostanos)
Próstata	Tejido	Acroleína (2- propenal)
Cerebro	Tejido	HNE (4-Hydroxy-2-nonenal)
Cardiovascular		
Ataque cerebral isquémico y Post-ataque epiléptico	Plasma	HNE(4-Hydroxy-2-nonenal)
Infarto agudo al miocardio	Plasma	HNE (4-Hydroxy-2-nonenal), MDA (malondialdehído)
Hipertensión	plasma, glóbulos rojos	MDA (malondialdehído), F ₂ -IsoP (F ₂ -isoprostanos)
Bypass cardiopulmonar	Plasma	F ₂ -IsoP (F ₂ -isoprostanos)
Sistema gastrointestinal		
Úlcera péptica o úlcera duodenal	Tejido	HNE (4-Hydroxy-2-nonenal)
Enfermedad Crohn	Orina	F ₂ -IsoP (F ₂ -isoprostanos)
Enfermedad mental		
Síndrome de Down	Líquido amniótico	F ₂ -IsoP (F ₂ -isoprostanos)
Metabólicas		
Diabetes tipo 2	Suero	MDA (malondialdehído)
Obesidad	Plasma	HNE (4-Hydroxy-2-nonenal)
Otosclerosis	Tejido	HNE (4-Hydroxy-2-nonenal)



3.6 Tratamientos contra el cáncer

El tratamiento contra el cáncer tiene como objetivo la cura total de dicha enfermedad y/o prolongar considerablemente la vida del paciente, garantizando una mejor calidad de vida (Organización Mundial de la Salud, 2017).

La cirugía es uno de los tratamientos que se utiliza con mayor frecuencia debido al éxito que tiene. La cirugía radical o curativa tiene como objetivo la extirpación, no solo del tejido, segmento u órgano donde se localiza el tumor, sino, además aquellas áreas de posible diseminación linfática del tumor (Gandur, 2009).

La quimioterapia consiste en la administración de medicamentos antineoplásicos. La selección del medicamento depende de las características del tumor y del paciente. Los medicamentos pueden ser combinados para intensificar la capacidad de destrucción celular, de este modo el tipo de administración puede variar pudiendo ser intravenosa o vía oral (Gandur, 2009). No obstante, este es un tratamiento poco selectivo de células cancerosas lo cual implica una afectación a células sanas.

La radioterapia consiste en la aplicación controlada de radiaciones ionizantes dirigidas de forma local. Estas radiaciones son capaces de romper enlaces químicos provocando la destrucción celular, en algunos casos se debe al impacto directo sobre la molécula del ADN. La radioterapia puede afectar los tejidos sanos que están próximos o cercanos al área de tratamiento y como consecuencia suscitar efectos secundarios (Gandur, 2009).

La inmunoterapia también conocida como terapia biológica, tiene como objetivo inducir una respuesta inmunitaria específica frente a las células cancerígenas (Fernández *et al.*, 2013). La administración puede ser intravenosa, oral, tópica e intravesical dependiendo del tipo de inmunoterapia asistida (Instituto Nacional del Cáncer, 2017).

La hormonoterapia es un tratamiento que emplea fármacos que pueden actuar en la síntesis de hormonas o alterando sus efectos sobre determinadas células, evitando el crecimiento del tumor (Sociedad Española de Oncología Médica, 2017).

Las terapias anteriormente mencionadas pueden ir acompañadas de medicina alternativa (Instituto Nacional del Cáncer, 2015). Un tipo de medicina alternativa es el uso de plantas cuyos metabolitos secundarios sirvan como materia prima para la obtención de medicamentos sintéticos más complejos o para el desarrollo de nuevos fármacos (Schlaepfer y Mendoza, 2010).

3.7 Etnobotánica

Estudia la relación entre los seres humanos y las plantas. El objetivo es el conocimiento acerca de la planta como su uso, percepción y clasificación en la cultura popular tradicional (Pardo y Gómez, 2003). En la investigación



etnobotánica se incorporan herramientas cualitativas y cuantitativas para recabar y analizar los datos que se obtienen. De estas herramientas que se llevan a cabo la más importante es “La entrevista” la cual permite establecer un vínculo entre el investigador y el informante (Instituto Nacional de Ecología, 2017).

En México, la etnobotánica inicia a partir de la invasión de su territorio por poblaciones humanas de españoles (finales del siglo XV-principios del siglo XVI) que contaban con conocimiento de recolecta y casería. En esta etapa, las distintas etnias tenían un amplio conocimiento sobre el uso de las plantas, debido a que eran fundamentales para satisfacer necesidades de alimento, cultura y salud, eran registradas y transmitidas a nuevas generaciones (Hernández, 2001).

En este trabajo a través de entrevistas etnobotánicas se obtuvo información acerca del uso, dosis y tiempo de tratamiento de *Plantago major* con la finalidad de extrapolarla al modelo murino de cáncer de mama.

3.8 Generalidades de *Plantago major* L.

Se tiene documentado que *Plantago major* tiene potencial terapéutico en diferentes partes de la planta como raíz, tallo, hoja y semilla, los cuales han sido utilizados para tratar diversas afecciones ver Cuadro 2 (Jyoti *et al.*, 2017).

Cuadro 2. Uso tradicional de *Plantago major* en diferentes países.

Afección	Parte de la planta	País	Referencia
Actividad antiviral	P. C	India	Jyoti <i>et al.</i> , 2017.
Actividad inmunomoduladora	Hoja P.C con <i>Plantago asiática</i> L.	India	Jyoti <i>et al.</i> , 2017.
	Hoja	Irán	Nazarizadeh <i>et al.</i> , 2013.
	Hoja	Chile	Samuelsen, 2000.
Actividad anticancerígena	Hoja Semilla	India	Jyoti <i>et al.</i> , 2017.
	Hoja Semilla	Irán	Nazarizadeh <i>et al.</i> , 2013.
Antioxidante	Hojas Semilla P.C	India	Jyoti <i>et al.</i> , 2017.
	Hojas Semilla P. C.	Irán	Nazarizadeh <i>et al.</i> , 2013.
	Hoja	Irán	Nazarizadeh <i>et al.</i> , 2013.

Comúnmente se le conoce como llanté, llantén o lantén ver figura 8.

3.8.1 Clasificación taxonómica

Reino: *Plantae*

Clase: *Mgnoliopsida*

Subclase: *Asteridae*

Orden: *Lamiales*

Familia: *Plantaginacea*

Género: *Plantago* L.

Especie: *Plantago major* L.

(Marroquín, 2014).

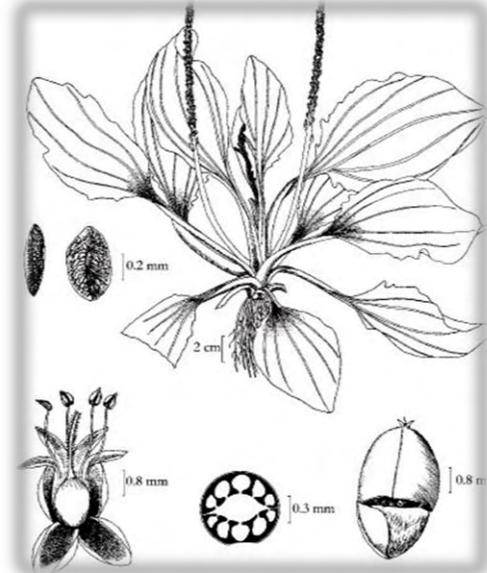


Figura 8. *Plantago major* L.

Plantago major es una hierba erecta con una altura que va desde los 10 a 30 cm. Presenta raíz degenerada con aspecto fibroso (Figura 9-C), sus hojas son basales dispuestas en roseta de manera alterna y gruesas, con forma de láminas-ovadas/elíptico-ovadas de 4 a 15 cm de largo y de 3 a 20 cm de ancho con ápice obtuso y margen entero que en ocasiones puede ser ligeramente ondulado (Figura 9-B), sus flores (inflorescencias) son espigas linear-cilíndricas con un tamaño de 3 a 20 cm de largo, conformadas por flores pequeñas de 0.05 a 1 mm de largo durante la antesis. Presenta de 30 a 60 semillas ovadas de ± 1 mm de longitud de color pardo (Figura 9-A) (Rzedowski *et al.*, 2005).

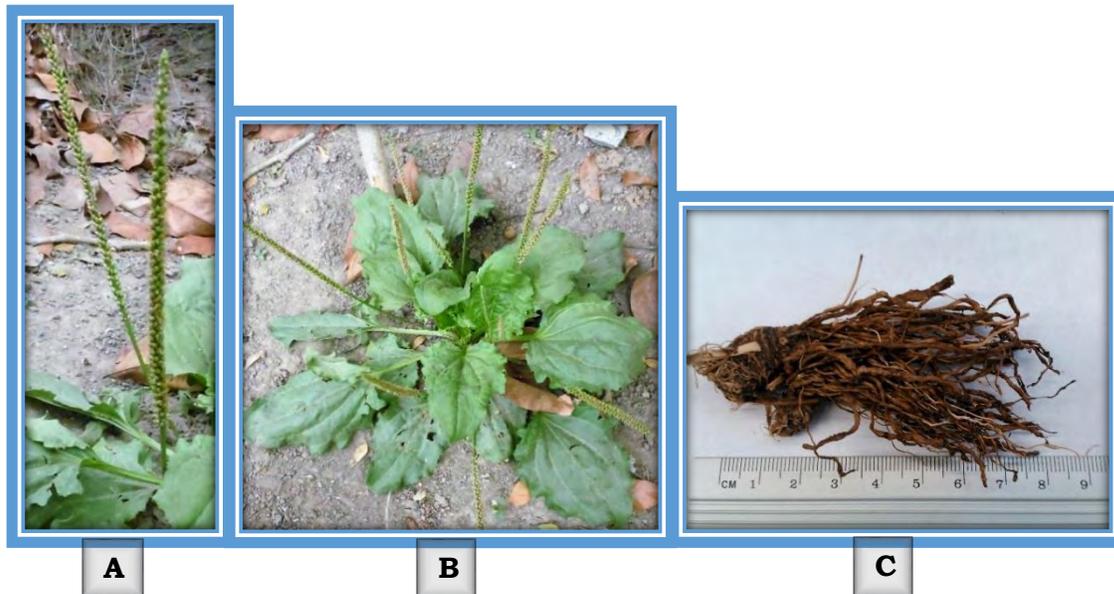


Figura 9. *Plantago major* L. A) Inflorescencia, B) Hojas en forma de roseta y C) Raíz de longitud corta.

Plantago major L. es una planta que crece en pantanos, orillas de canales y estanques, en terrenos con mucha humedad. También, habita en bosque caducifolio, bosque de encino y bosque mesófilo (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 2009). Se distribuye desde Canadá hasta Brasil. En México se registra de los 350 a los 2000 m.s.n.m y en Veracruz hasta los 2500 m.s.n.m (López y Avendaño, 1999).

3.8.2 Estudios de *Plantago major* L.

Es utilizada comúnmente como planta medicinal en algunos estados de México para tratar diferentes afecciones (Cuadro 3).



Cuadro 3. Usos comunes de *Plantago major* L. en la medicina tradicional

Estado	Afección
Chiapas	Inflamación de estómago y abdomen, desinflamante de golpes, heridas, llagas enconosas, paperas y afecciones respiratorias.
Ciudad de México	Inflamación de estómago y abdomen, disentería.
Guanajuato	Detención de hemorragias externas o internas.
Guerrero	Artritis, dolores reumáticos y de huesos.
Michoacán	Heridas y llagas. Padecimiento ocular: carnosidad, lagañas, ojos llorosos e inflamación de ojos. Detención de hemorragias internas y externas.
Morelos	Hinchazones o inflamaciones (sin especificar), dolor de riñón, gastritis, úlcera, vómito, lesiones: golpes o contusiones, heridas, quemaduras, piquetes de escorpión y caries.
Puebla	Inflamación de estómago y abdomen, hinchazones o inflamaciones (sin especificar), desinflamación de hematomas, dolor de riñón, disentería y padecimientos oculares: carnosidad, lagañas, ojos llorosos e inflamación de ojos. Enfermedades contra el cáncer.
Sonora	Úlceras de la boca, la bilis, desordenes biliares, caries, gastritis, úlceras gástricas, vómito. Lesiones: golpes o contusiones, heridas, quemaduras y piquete de escorpión.
Tabasco	Inflamación de estómago y abdomen.
Tabasco	Asma, tos, bronquitis y catarro.
Tlaxcala	Inflamación de estómago y abdomen, padecimientos oculares: carnosidad, lagañas, ojos llorosos e inflamación de ojos, detención de hemorragias internas y externas.
Veracruz	Inflamación de estómago y abdomen, hinchazones o inflamaciones (sin especificar), artritis, dolores reumáticos y de huesos, úlceras en la boca, bilis y desordenes biliares. Afecciones respiratorias: asma, tos, bronquitis y catarro. Enfermedades contra el cáncer.

Plantago major L. tiene diferentes actividades como; antiinflamatoria, antihelmíntica, bacteriana y cicatrizante, debido a la presencia de metabolitos secundarios como la aucubina (glucósido) que fueron identificada en diferentes extractos: metanólico, hidroalcohólico y acuoso, utilizando solo las hojas (Blanco, Saborío y Garro, 2008). Otra revisión como planta medicinal enfatiza en la presencia de diferentes compuestos: sustancias fenólicas, flavonoides, alcaloides, terpenoides y vitamina C que le confieren actividad antiinflaatoria, efectos hematopoyéticos y antioxidante (Haddadian *et al.*, 2014).

Estudios de *Plantago major* L. en modelos *in vivo* muestran diferentes actividades biológicas que son acreditadas a las propiedades que ejercen los



metabolitos secundarios, empleando diferentes estructuras de la planta o la planta completa (Cuadro 4)

Cuadro 4. Estudios realizados en modelos *in vivo* utilizando *Plantago major L.*

Autor	Año	Parte de la planta	Tipo de extracto	Presencia de metabolitos secundarios	Modelo <i>In vivo</i>	Efecto
Redrobán	2012	Planta completa	Hidroalcohólico	Alta concentración taninos, quinonas, antocianidinas y en menor cantidad alcaloides, flavonoides, cumarinas y saponinas (triterpenos y esteroides)	Ratones <i>Mus musculus</i>	Como respuesta se muestra una actividad cicatrizante en heridas cutáneas menores.
Caro	2013	Hoja	Acuoso	Compuestos fenólicos, flavonoides y taninos	Ratas machos Wistar	Se da una respuesta considerada de efecto ansiolítico.
Ahmed y col.	2015	Planta completa	Acuoso	Fenoles, taninos, alcaloides, flavonoides y saponinas	Cultivo de <i>Bidens pilosa</i>	Se ejerce efecto fitotóxico en el crecimiento de la plántula y germinación de <i>Bidens pilosa</i> .
Hussan y col.	2015	Hoja	Acuoso	No se realiza estudio que compruebe la presencia de algún metabolito secundario.	Ratas hembras Sprague-Dawley	Ayuda a aumentar la actividad antioxidante y mejorar la lesión hepática inducida por paracetamol.
Parhizgar y col.	2016	Planta completa	Hidroalcohólico	No se realiza estudio que compruebe la presencia de algún metabolito secundario, sin embargo su respuesta se atribuye a los principios activos reportados.	Ratas Wistar	Ayuda en los efectos dañinos causados por la nefrotoxicidad inducida por el cisplatino a la cual fueron sometidas las ratas.



A partir del conocimiento etnobotánico se inician investigaciones para conocer los metabolitos secundarios presentes en las plantas, de este modo surge la fitoquímica.

3.9 Fitoquímica

Esta disciplina estudia cada grupo de planta desde su estructura química, metabolismo, distribución natural y función biológica, a través de la extracción de compuestos y evaluación cualitativa y cuantitativa (Ringuelet y Viña, 2013).

La realización de un análisis fitoquímico permite conocer de manera cualitativa y cuantitativa los principales grupos químicos presentes en la planta (Sharapin, 2000). Este análisis requiere de la extracción de compuestos presentes en la planta con solventes apropiados, los cuales dependen de la polaridad (Palacios, 2013). El análisis fitoquímico cualitativo emplea una serie de reacciones de coloración y/o precipitación. Para conocer de manera cuantitativa los constituyentes químicos en la planta se emplean técnicas como: HPLC, cromatografías y espectrofotometría (RMN resonancia magnética nuclear, colorimetría IR y UV) (Marcano y Hasegawa, 2002).

3.10 Metabolitos secundarios

El metabolismo de las plantas requiere la continua elaboración, asimilación y eliminación de sustancias químicas para llevar a cabo funciones vitales indispensables para el desarrollo de la vida (Cruz, 2007). En el metabolismo primario el papel fundamental que tiene la fotosíntesis es convertir la energía solar en energía química, donde la mayor parte del carbono forma moléculas orgánicas (carbohidratos, proteínas, lípidos, aminoácidos y nucleótidos) que son fundamentales para la vida. Otras moléculas resultado de dicho proceso son los metabolitos secundarios (Figura 10) (Castro y González, 2008), también conocidos como principios activos, estos son sustancias que se encuentran en distintos órganos o estructuras de la planta, dichas sustancias confieren una acción farmacológica beneficiosa o perjudicial en el cuerpo humano y animal, pudiendo alterar o modificar el funcionamiento de órganos y sistemas (Palacios, 2013).

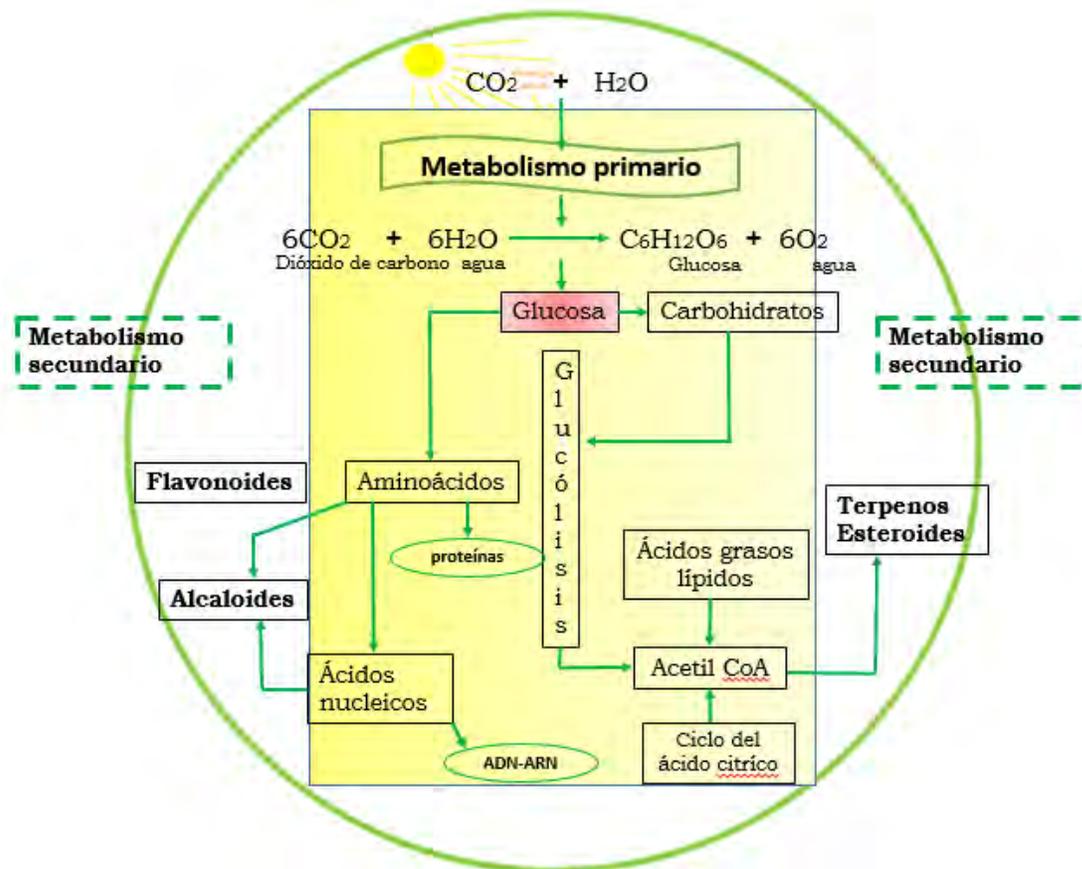


Figura 10. Relación del metabolismo primario con el metabolismo secundario de plantas. Figura modificada de Ávalos y Pérez, 2009.

Los metabolitos secundarios generalmente se encuentran en cantidades pequeñas y a menudo, su producción puede estar restringida en un determinado género, familia o especie de planta. Pueden ser sintetizados no solo por plantas, también por hongos, bacterias y animales (Castro y Gonzáles, 2008). Tienen funciones ecológicas como atrayentes o repelentes de animales. Como atrayentes de insectos polinizadores proporcionan pigmentación en flores y frutos. Otros compuestos tienen función protectora, proporcionando sabores amargos, haciéndolas indigestas o venenosas frente a depredadores (Ávalos y Pérez, 2009). En la mayor parte de los casos los metabolitos secundarios no parecen ser necesarios para la supervivencia de la planta, pero pueden conferirle una ventaja competitiva (Palacios, 2013).

Los metabolitos secundarios como alcaloides, cumarinas, esteroides, fenoles, flavonoides, glucósidos cardiotónicos, saponinas, taninos, entre otros, son considerados productos naturales o drogas que representan alrededor del 25% de los productos con uso medicinal (Anaya y Espinosa, 2006)

Características de los grupos de metabolitos secundarios:

Los alcaloides son compuestos nitrogenados que pueden contener uno o varios átomos de nitrógeno en su molécula, con un peso molecular que oscila entre 100 y 900 Da. Como derivado de una amina en soluciones son básicas debido a que el nitrógeno que posee normalmente tiene un par de electrones no compartidos. Son de estructura cristalina y forman precipitados amorfos gracias a la presencia de núcleos aromáticos en su estructura, de igual forma son absorbentes de rayos UV (Figura 11). Los alcaloides se encuentran presentes especialmente en dicotiledóneas herbáceas, son incoloros, inodoros y confieren sabores amargos, dichas características le otorgan propiedades como; bactericidas (lupinina, lupanina, angustifolina), nematocidas (anargirina, matrina y citisina) y antivirales (esparteína). En tratamientos terapéuticos se emplean como antifibrilantes, bloqueantes espasmolíticos, neuromusculares, antimaláricos antineoplásicos (Ringuelet y Viña, 2013).

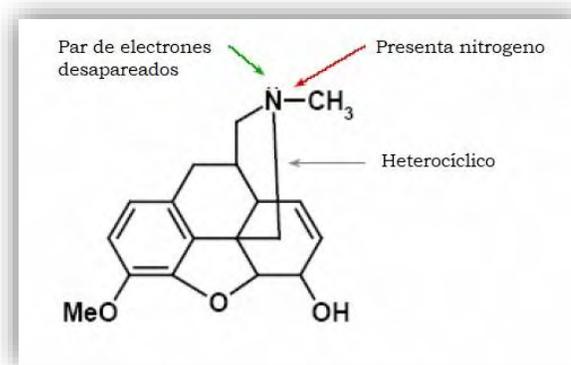


Figura 11. Estructura de un alcaloide (morfina). Tomado de pág. web: alcaloides s/a.

Las cumarinas tienen una estructura química 2H-1-benzopirano-2-ona la cual presentan un color azul característico visible en espectros ultravioleta (Figura 12). Pertenecen al grupo de compuestos fenólicos y pueden encontrarse en raíces, hojas, flores o frutos en diferentes familias de angiospermas. Presentan un amplio interés, estas suelen ser utilizadas como aditivos alimentarios, perfumes, cosméticos, productos agroquímicos y como fármacos, como este último manifiestan diversas propiedades como actividad anticoagulante, antiviral, antibacteriana, inhibidor enzimático y antioxidante, según sea el sustituyente que presente la cumarina.

Algunas cumarinas han sido estudiadas por sus propiedades cardioprotectoras y anticancerígenas, como la warfarina y el acenocumarol que son utilizados en fármacos como anticoagulantes. La geiparvarina, es conocido por su actividad citostática en ensayos *in vitro* (Correia, 2013).

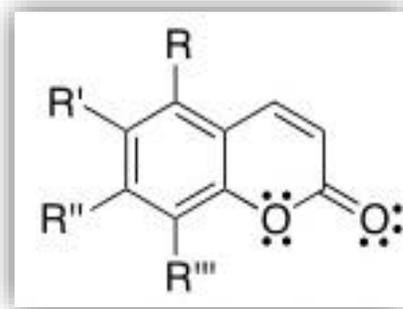


Figura 12. Estructura química de una cumarina simple. Tomado de Álvarez, 2016.

Los flavonoides son compuestos fenólicos que poseen un esqueleto primordial de quince átomos de carbono que consta de tres porciones, dos anillos aromáticos (bencénicos) y un anillo heterocíclico oxigenado (C₆-C₃-C₆) (Figura 13) (Delporte, 2010). Se encuentran ampliamente distribuidas en las plantas angiospermas, principalmente en las partes expuestas al sol como hojas, flores y frutos que otorgan a la planta funciones ecológicas como atrayentes de polinizadores debido a que brindan pigmentación en flores, frutos y hojas.

Tiene propiedades farmacológicas los cuales son empleados en proctología, metrorragias y retinopatías. Los flavonoides en conjunto con una saponina (glicirricina) confieren acción antiespasmódica, antiulcerosa, antiagregante plaquetaria y antiinflamatoria. Presentan efecto protector en la pared vascular gracias a su capacidad de inhibir enzimas y actividad antioxidante los cuales actúan inhibiendo la peroxidación lipídica, la reducción de radicales libres y quelando metales (Tránsito, 2004).

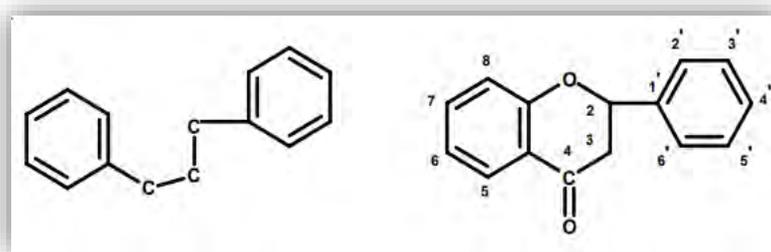


Figura 13. Estructura química de un flavonoide C₆-C₃-C₆ (2 anillos bencénicos unidos por un heterocíclico de 3 carbonos). Tomado de Delporte, 2010.

Los glucósidos cardiotónicos poseen una estructura esteroideal compuesta por una parte aglicona (no azúcar) y una glicona (azúcar). En el carbono 17 presenta un anillo de lactona no saturado, en el carbono 3 de la parte glicona puede presentar moléculas de azúcar (glucosa) o los seis desoxiazúcares (ramnosa, mucosa, digitalosa y thevetosa, etc.) como sustituyente (Figura 14)

(Amaringo *et al.*, 2011). La parte lactona les confiere el sabor amargo y la parte aglicona el nombre de cardenólidos.

Presentan actividad estimulante sobre el músculo cardiaco, participa en la adecuada circulación y aumento de la filtración renal produciendo un efecto diurético como consecuencia de los efectos que tiene sobre el corazón. Tiene un margen terapéutico muy estrecho debido a su elevada toxicidad (Vanaclocha y Cañigual, 2003).

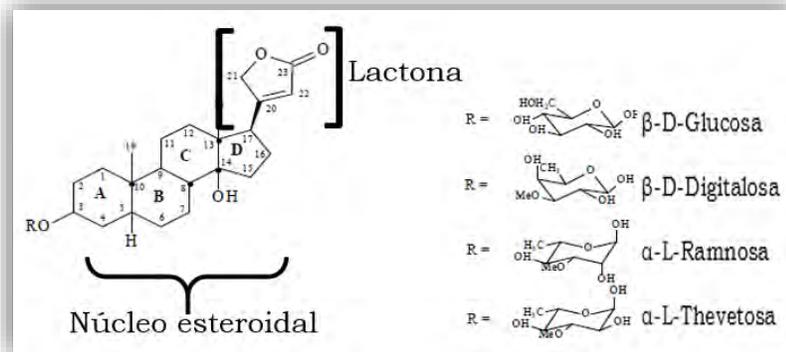


Figura 14. Estructura química de un glucósido cardiotónico y sus azúcares sustituyentes. Tomado de Amaringo *et al.*, 2011.

Los polifenoles derivan del fenol (Figura 15). Su estructura presenta un anillo aromático el cual puede estar unido a uno o más grupos hidroxilos. Son clasificados en diferentes grupos según sea la estructura principal y el número de átomos de carbonos presentes (Castro, Ortega y Lozada, 2015), están ampliamente distribuidos en los vegetales como son frutas, hortalizas y alimentos derivados. Confieren características como la pigmentación de tonos rojos, azules y violáceos característico de muchas frutas (fresas, ciruelas y uvas) y hortalizas (col, rábano y betabel), y en algunos frutos confieren el aroma (plátano). Tiene propiedades antioxidantes, puesto que son captadores de radicales libres, por lo que están relacionados en la prevención de enfermedades cardiovasculares y cancerígenas. En líneas celulares tumorales se ha demostrado que actúan inhibiendo la proliferación (Tomás, 2003).

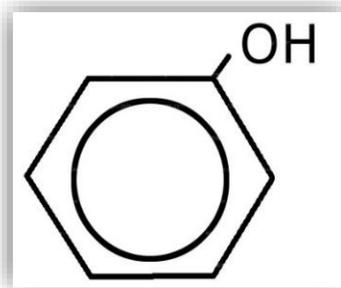


Figura 15. Estructura química del grupo fenol. Tomado de Martínez, 2015.

Las saponinas son heterósidos comúnmente divididos en dos principales grupos de acuerdo a su esqueleto; **esteroides** con 27 carbonos y **triterpénicos** con 30 carbonos (Figura 16). Estos presentan características distintivas como: sabor amargo, surfactante y hemolíticas (Valle y Lucas, 2000).

Su estructura puede estar formada por una parte glucídica de carácter neutro o ácido y una parte no glucídica denominada sapogenina. Las saponinas esteroidales carecen de efecto hemolítico (Vanaclocha y Cañigüeral, 2003). Se encuentran en varias plantas desde raíces, tallos, hojas y flores en plantas comestibles como espinacas, soya, alfalfa, espárragos, avena, entre otros. También se pueden encontrar en animales como estrellas marinas y en el veneno de serpientes pudiendo ser extremadamente tóxicos para animales de sangre fría (Valle y Lucas, 2000). Tienen propiedades expectorantes y efectos antiinflamatorios, sin embargo, su consumo puede tener efectos nocivos pudiendo irritar la mucosa bucofaringea y digestiva, causando dolor abdominal, vómito y diarrea (Tránsito, 2001).

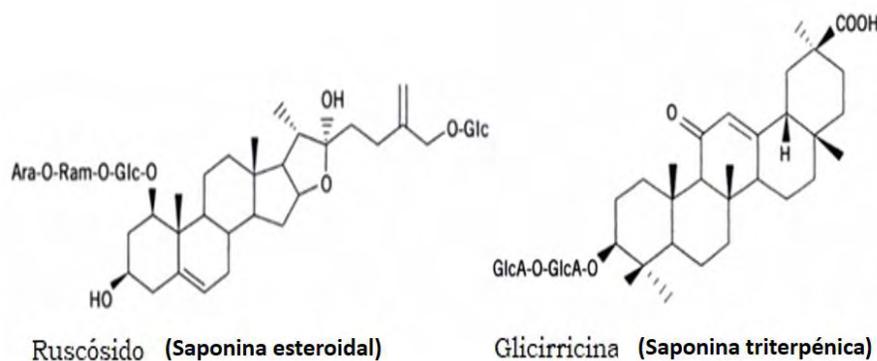


Figura 16. Estructura química de dos diferentes grupos de saponinas, esteroideal y triterpénicos. (**Glc**: glucosa, **Ram**: ramnosa, **Ara**: arabinosa, **GlcA**: ácido glucorónico). Tomado de Vanaclocha y Cañigüeral, 2003.

Los taninos son compuestos químicos que contienen grupos fenólicos, cuando se combinan con agua adquieren sabores astringentes. Se dividen en dos grupos; taninos hidrolizables y los taninos condensados (Delporte, 2010). En su estructura pueden tener grupos hidroxilos y en otros casos carboxilos los cuales le otorgan la capacidad de formar complejos con proteínas, minerales y otras macromoléculas (Figura 17) (Carulla y Pabón, 2004). Se encuentran principalmente en dicotiledoneas herbáceas, en hojas de árboles y arbustos y son relativamente escasos en gramíneas y leguminosas cultivadas (Garín *et al.*, 1996).

Los taninos hidrolizables tienen actividad antioxidante en modelos *in vitro* los cuales son capaces de neutralizar especies reactivas, como el superóxido, el radical hidroxilo y disminuir la peroxidación lipídica, en modelos *in vivo* han

presentado actividad anticancerígena en cáncer de próstata y pulmón. Los taninos condensados tienen propiedades terapéuticas como es la inhibición de la agregación plaquetaria, reduciendo la formación de trombos en el sistema circulatorio, actividad antibacteriana, propiedades anticarcinogénicas y antioxidantes. Así mismo los taninos pueden tener efectos dañinos como es la inhibición en la absorción de los metales, lo que puede llegar a ser un riesgo en la salud generando problemas de anemia (Vázquez *et al.*, 2012).

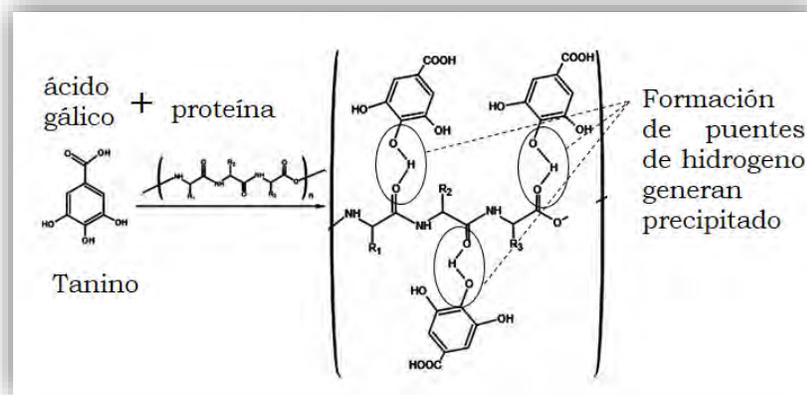


Figura 17. Estructura química de un tanino hidrolizable formando complejo con una proteína. Tomado de Orantes, 2008.

Dentro de los principales metabolitos reportados para *Plantago major* se encuentran glucósidos fenilpropanoides, iridoides que son monoterpenos, flavonoides y ácidos fenólicos presentes en las partes aéreas (Goncalves y Romano, 2016). El cuadro 5 muestra una relación de compuestos químicos encontrados en *Plantago major*.

Cuadro 5. Clases de compuestos químicos en *Plantago major*. Modificado de Goncalves y Romano, 2016.

Clase de compuesto químico	Estructura de la planta	Referencia
Ácidos triterpénoicos	Hoja y semilla	Tarvainen <i>et al.</i> , 2010.
Polifenoles	Hoja, semilla y flor	Zubair <i>et al.</i> , 2011.
Glucósidos feniletanoides y glucósidos (iridoides)	Hoja	Gonda <i>et al.</i> , 2013.
Ácidos triterpénoicos	Semilla, hoja, peciolo y raíz.	Kartini <i>et al.</i> , 2014.

Samuelsen (2000) indicó la presencia del grupo glucosinolatos, así como plantagonina, que es un alcaloide y algunos flavonoides como la baicaleína, hispidulina y plantaginina en *Plantago major*. Bahrain (2017) reportó que *P. major* es una planta con aplicaciones terapéuticas debido a la variedad de compuestos como los flavonoides (luteolina y apigenina), alcaloides (plantagonina), terpenoides, compuestos fenólicos, glucósidos iridoides (aucubina) y vitaminas (vitamina C y carotenos).

3.11 Inductor de cáncer de mama

El **DMBA** 7,12-dimetilbenzo (α) antraceno es un hidrocarburo aromático policíclico constituido por anillos bencénicos (Figura 18), se genera en la combustión de fósiles; como el carbón, petróleo y sus derivados (Jaume, 2012). El DMBA es un compuesto lipófilico que requiere de la activación metabólica para actuar como cancerígeno (Costa, 2014), desencadenando la formación de epóxidos que interaccionan de manera directa con el ADN generando transversiones: AT por TA y GC por TA. Siendo dos mecanismos los probables de dicho suceso; el primero, es la formación de aductos de DMBA- adenina y DMBA- guanina y el segundo la pérdida de purinas, los cuales son producto de la lisis espontánea del complejo formado entre el époxido del DMBA y las purinas del ADN blanco (Cortés *et al.*, 2009).

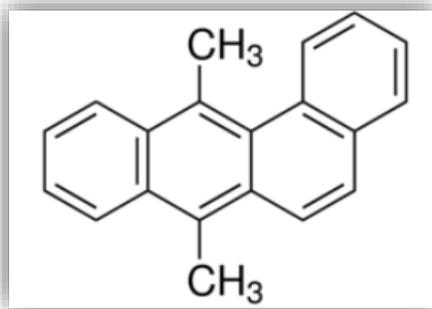


Figura 18. Estructura del DMBA (7,12-dimetilbenzo (α) antraceno). Tomado de pág. web: SIGMA-ALDRICH, 2017.

El DMBA es uno de los carcinógenos mayormente empleado para inducir cáncer de mama en modelos *in vivo*, especialmente en murinos ya que estos animales presentan características similares al cáncer de mama en humanos (Costa, 2014). Los tumores mamarios que son inducidos con DMBA rara vez hacen metástasis, pero pueden llegar a ocasionar la muerte del huésped, al alcanzar un gran tamaño e invadir tejidos adyacentes que pueden generar hemorragias o ulceraciones (Thompson y Adlakha, 1991).



El compuesto DMBA ha sido documentado para la inducción de cáncer de mama en ratas, el cual es administrado en una sola dosis (20 mg/kg) vía oral, dejando ejercer el efecto durante 14 semanas (Arroyo *et al.*, 2010). Otro estudio refiere que, para la inducción de cáncer de mama en ratas fue empleada una dosis única de DMBA (100 mg/kg) vía oral, en el cual se obtuvieron resultados a la 8va semanas de inducción (Oto *et al.*, 2011).



4. Justificación

En México la primera causa de muerte en mujeres es por cáncer de mamá (Secretaría de Salud, 2015). El cáncer de mama es un grave problema de salud pública y representa un reto multidisciplinario (Mohar *et al.*, 2009). Actualmente el tratamiento de la mayoría de las neoplasias, especialmente sólidas, incluye el uso de la cirugía, quimioterapia, radioterapia y hormonoterapia, sin embargo, estas terapias han resultado poco específicas por lo que el incidir en terapéuticas alternativas como es el uso de plantas medicinales contribuye a resolver esta problemática.

Las células neoplásicas generan un elevado estrés oxidante al producir altos niveles de especies reactivas producto de alteraciones metabólicas y del nuevo microambiente en formación (Viñas *et al.*, 2012). *Plantago major* L. es una herbácea que contiene metabolitos secundarios con actividad antioxidante que puede disminuir los niveles de especies reactivas generados en un proceso carcinogénico. Dicha especie es consumida en diferentes estados de México, sin embargo, los estudios científicos que hay en México acerca de su actividad biológica son escasos.



5. Hipótesis

Los metabolitos secundarios con actividad antioxidante presentes en extractos acuosos e hidroalcohólicos de *Plantago major*, contrarrestarán el estrés oxidante generado en un proceso de carcinogénesis inducido.

6. Objetivo general

Evaluar la actividad antioxidante de los extractos acuosos e hidroalcohólicos de *Plantago major*, mediante marcadores de estrés oxidante en un modelo de cáncer en cepa CD1.

6.1 Objetivos particulares

- ❖ Identificar y cuantificar los grupos de metabolitos secundarios presentes en extractos acuosos e hidroalcohólicos *Plantago major*.
- ❖ Evaluar los marcadores de estrés oxidante (catalasa, óxido nítrico y lipoperoxidación lipídica) en plasma e hígado de ratón.

7. Material y método

7.1 Zona de estudio

La colecta de *Plantago major* se llevó a cabo en septiembre del 2015 en la localidad de Limón Chiquito municipio de Cazonos de Herrera, Veracruz. esta localidad se ubica en las coordenadas: longitud: -97.281389 y latitud: 20.678889, a 10 m.s.n.m (Mapa 1).



Mapa 1. Localidad de Limón Chiquito, Cazonos de Herrera, Veracruz.

7.1.2 Registro de información etnobotánica

Con la finalidad de capturar información específica de la especie como; uso medicinal primordialmente anticancerígeno, forma de preparación, modo de empleo, duración del tratamiento, efectos adversos durante o posterior a su uso. Se realizó una entrevista etnobotánica, utilizando la metodología de Cruz y Castillo (2008).

Se aplicaron 25 entrevistas, dirigidas a los habitantes de la comunidad de Limón Chiquito (Anexo 1), donde participaron hombres y mujeres en un rango de edades que va de los 27 a 75 años, que emplean las plantas con fines terapéuticos, en particular la especie *Plantago major* L.

Plantago major fue recolectada a orillas de caminos, las muestras del ejemplar incluyeron partes aéreas y raíz las cuales fueron etiquetadas (Figura 19). Se recolectaron tres muestras de la especie, estas fueron prensadas y

secadas en un secador de herbario a una temperatura de 30-50 °C, estas medidas se llevaron a cabo, para prevenir que las muestras se deterioraran o fueran parasitadas por hongos (Vera de A., 2003).

La determinación taxonómica se realizó en el Instituto de Biología de la UNAM por el M. en C. Alberto Reyes García, Técnico académico del Herbario Nacional MEXU.



Figura 19. Sitio de recolecta de *Plantago major* en campo.

7.1.3 Material vegetal

Se recolectaron 22 ejemplares de *Plantago major*, los cuales fueron separados por raíz, hoja y flor, retirando el exceso de tierra con abundante agua destilada y posteriormente se dejaron secar para ser pesados.

Los extractos acuosos se obtuvieron por medio de un cocimiento durante 5 minutos, colocando por separado 100 g de material vegetal (flor, hoja y raíz) en 1000 mL de agua destilada. Para los extractos hidroalcohólicos se colocaron 100 g de material vegetal fresco por separado, cada estructura de la planta se trituro en un mortero extrayendo con una solución de etanol:agua (3:1). Los extractos acuosos e hidroalcohólicos se filtraron y almacenaron por separado en frascos ámbar a una temperatura de 4 °C hasta su uso.

Para secar los extractos acuosos e hidroalcohólicos se colocaron 50 mL de cada extracto en cristalizadores dentro de la campana de extracción hasta obtener el extracto seco, el cual se almacenó en frascos ámbar a temperatura ambiente.

7.2 Cuantificación de azúcares totales presentes en *Plantago major*

La cuantificación se llevó a cabo por el Método Fenol-sulfúrico. Este método espectrofotométrico se fundamenta en la reacción de los azúcares con ácidos fuertes, originando furfurales, los cuales son condensados al reaccionar con el fenol dando un compuesto color naranja o amarillo estable, (Figura 20) (Toledo, 2015).

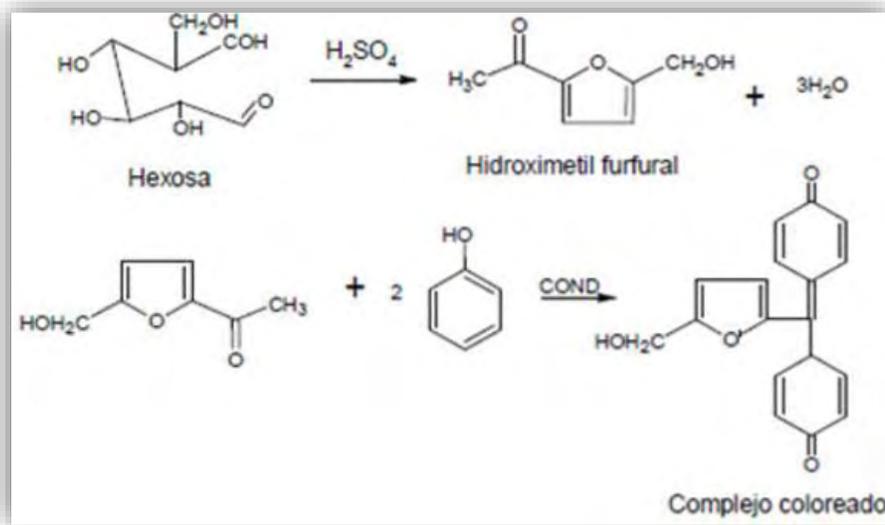


Figura 20. Reacción de una hexosa. Tomado de Toledo, 2015.

La reacción que se lleva a cabo no es estequiométrica y depende de la estructura del azúcar, por lo tanto, se realiza una curva patrón para conocer las concentraciones de azúcares totales (Toledo, 2015). Para conocer la cantidad de azúcares totales se preparó una solución estándar de glucosa 200 μ L/mL.

Para la cuantificación se preparó una curva de calibración realizando diluciones de 0, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 mg/mL de glucosa.

1. Se tomaron 100 μ L de muestra completando 1 mL con 900 μ L de agua destilada, en seguida se incorporó 300 μ L de fenol al 5 % agitando suavemente y 1.8 mL de ácido sulfúrico lentamente por las paredes.
2. Las muestras se dejaron reposar 30 minutos a temperatura ambiente. Y su absorbencia fue leída en un espectrofotómetro a 490 nm. Como blanco se utilizó, 1 mL de agua destilada, 300 μ L de fenol al 5 % y 1.8 mL de ácido sulfúrico, siguiendo el mismo proceso descrito anteriormente.

7.3 Identificación de grupos de metabolitos secundarios

A partir de los extractos secos obtenidos de *Plantago major* se desarrollaron pruebas coloridas para la identificación de grupos de metabolitos secundarios de mayor interés. Para las pruebas de identificación se preparó cada extracto a una concentración de 0.01 g/mL, del que se tomaron 500 μ L adicionando los reactivos de acuerdo al grupo de metabolito secundario a identificar.

La caracterización de los metabolitos secundarios presentes en los extractos acuosos e hidroalcohólicos fueron expresados de acuerdo a la lectura utilizada por Domínguez (1973). Leyéndose de la siguiente forma; Presencia abundante +++, presencia moderada ++, presencia poca + y ausencia --.



Alcaloides

Los alcaloides en soluciones neutras o ligeramente ácidas pueden precipitar o dar coloraciones a una serie de reactivos denominados “reactivos generales de alcaloides” (Ringuelet y Viña, 2013). Estas tres técnicas de identificación se fundamentan en la capacidad que tienen los alcaloides en estado sal (extractos ácidos), de combinarse con el yodo y metales pesados como bismuto, mercurio, tungsteno formado precipitados (Palacios, 2013). Se realizaron 3 técnicas para la identificación de alcaloides.

- a) *Meyer*. Se disolvieron 0.65 g de bicloruro de mercurio en 30 mL de agua destilada y se añadió 2.5 g de yoduro de potasio en 50 mL. De esta solución se tomó 1 mL y se agregó a la muestra, la formación de un precipitado color blanco o color crema indica la presencia de alcaloides (Palacios, 2013).
- b) *Wagner*. En 25 mL de agua se disolvió 0.31 g de yodo sublimado y 0.5 g de yoduro de potasio. De esta solución se tomó 1 mL y se agregó a la muestra, esta reacción en presencia de alcaloides presenta la formación de precipitado naranja-rojizo.
- c) *Dragendorff*. Se mezcló 2 g de nitrato de bismuto pentahidratado en 5 mL de ácido nítrico al 30 %, incorporando una solución que contenía 6.8 g de yoduro de potasio en 12.5 mL de agua. Se dejó reposar durante 24 horas, por último, se decantó y se llevó a aforo a 25 mL. De esta solución se tomó 1 mL y se agregó a la muestra. La adición de este reactivo a la solución ácida de alcaloides da la formación de un precipitado naranja-rojizo (Palacios, 2013).

Cumarinas

La identificación de cumarinas se realizó a través de la técnica de hidróxido de sodio. Las cumarinas son lactonas que pueden disolverse en soluciones alcalinas acuosas o alcohólicas dando una coloración amarilla, la cual desaparece al acidular. La *Reacción de hidróxido de sodio* consiste en adicionar a la muestra una solución de hidróxido de sodio al 10 % y, posteriormente se incorporó gota a gota un ácido débil (ácido cítrico). La prueba es positiva si presenta una coloración amarilla que desaparece al acidularse (Rivas *et al.*, 2016).

Esteroides

Los esteroides se determinaron por medio de la reacción de Liberman-Burchard que identifica los núcleos esteroideos o triterpenicos (Enríquez *et al.*, 2008). El *Reactivo Liberman-Burchard* consiste en elaborar una solución 1:1, con 25 mL de cloroformo y 25 mL de anhídrido acético, por cada 2 mL de la



solución se agregó una gota de ácido sulfúrico previamente frío, por la pared. Este reactivo se incorporó a la muestra y el cambio de coloración a rojo-naranja indica la presencia de un núcleo triterpeno, si la coloración es azul-verde, hay presencia de un núcleo esteroide (Rivas *et al.*, 2016).

Flavonoides

Para identificar flavonoides se empleó la reacción de Shinoda, en la que el magnesio metálico es oxidado por el ácido clorhídrico concentrado dando como productos hidrógeno molecular que posteriormente es eliminado en forma de gas y el cloruro de magnesio que forma complejos con los flavonoides dando coloraciones rosadas (Enríquez *et al.*, 2008). La *Reacción de Shinoda*, consiste en adicionar limaduras de magnesio a la muestra, posteriormente se agregó gota a gota ácido clorhídrico concentrado, agitando en círculos suavemente. La aparición de una coloración naranja, rojo o rosa intenso, se considera positiva (Carvajal *et al.*, 2009).

Glucósidos cardiotónicos

Para el análisis de los glucósidos cardiotónicos se emplearon dos técnicas que identifican sus estructuras. El reactivo de Baljet permite reconocer compuestos con agrupamiento lactónico (Pereira, Vega y Saavedra, 2009). Mientras que el ensayo de Keller-Killiani permite el reconocimiento de los desoxiazúcares, que pueden ser ramnosa, mucosa, digitalosa y thevetosa (Rivas *et al.*, 2016). Para el *Ensayo de Baljet* se disolvieron 0.25 g de ácido pícrico en 25 mL de etanol y se adiciono una solución de 2.5 g de hidróxido de sodio en 25 mL de agua. De esta solución se agregó 1 mL a la muestra. Si forma un precipitado color rojo-naranja la prueba de identificación es positiva (Pereira, Vega y Saavedra, 2009). Para el reactivo de *Keller-Killiani* se disolvió 0.5 g de cloruro de hierro hexahidratado en ácido acético al 2 %. En seguida se añadió 1 mL a la muestra e inmediatamente se incorporó gota a gota ácido sulfúrico. Si la muestra toma una coloración verde o pardo la reacción es positiva (Rivas *et al.*, 2016).

Polifenoles

La técnica para identificar polifenoles consiste en una reacción redox. Se emplea el reactivo Folin Ciocalteu que tiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico que reacciona con los compuestos fenólicos presentes en el extracto. El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el medio ácido) es de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un color azul intenso mostrando la presencia de polifenoles. Se colocaron 500 μ L de muestra, se adiciono agua destilada hasta completar 2 mL, incorporando 1.7 mL de solución de carbonato de sodio al 7.5% y 400 μ L



del reactivo de *Folin Ciocalteu*. Si la muestra presenta coloración azul turquesa hay presencia de polifenoles (Martínez *et al.*, 2015).

Saponinas

Las saponinas disminuyen la tensión superficial del agua, por lo que en soluciones acuosas forman espuma (Castañeda *et al.*, 2008). La *prueba de espuma* consistió en colocar 1 mL de agua destilada en 500 μ L de muestra, tapando y agitando vigorosamente. La formación de espuma estable durante 15 minutos arroja positiva la presencia de saponinas (Carvajal *et al.*, 2009).

Taninos

Los taninos son compuestos fenólicos que contienen principalmente grupos hidroxilos y en algunos casos carboxilos que forman complejos fuertes con proteínas y pueden precipitarlas. La reacción gelatina-sal se realiza para la identificación de taninos condensados (Carulla y Pabón, 2004). El *Reactivo de gelatina-sal* se preparó disolviendo 0.25 g de gnetina en 25 mL de agua, en una solución de cloruro de sodio al 10 %. Se incorporó 1ml de esta solución a la muestra. Se considera positiva la prueba si hay formación de precipitado blanco.

7.4 Cuantificación de grupos de metabolitos secundarios

Se realizó la cuantificación solo de aquellos metabolitos secundarios que fueron identificados en los extractos de *Plantago major*.

Alcaloides

Para la cuantificación de alcaloides se utilizó la técnica verde de bromocresol. La cual consiste en la reacción de alcaloides que tienen solamente un nitrógeno en el interior de su estructura, dando lugar a la formación de un complejo de transferencia de carga (alcaloide-verde de bromocresol) en un pH de 4.7 con coloración amarilla que puede ser leída espectrofotométricamente (Rojas, Jaramillo y Lemus, 2015).

Para realizar la curva de calibración se utilizó una solución estándar de cafeína (0.1 g/mL). Las absorbancias obtenidas de la curva y de las muestras se leyeron a 420 nm en un espectrofotómetro. Las concentraciones obtenidas son expresadas como equivalentes de cafeína en mg/mL (Oropeza, 2012).

Cumarinas

La cuantificación de cumarinas se lleva a cabo en medio básico, esta técnica se fundamenta en la estructura del agrupamiento lactónico presente en las cumarinas, las cuales en medio básico sufren rompimiento del anillo y forman sales de cadenas abiertas, la adición de acetato de plomo favorece la precipitación de taninos (Carvalho y Seferin, 2004, Rodríguez *et al.*, 2008).

Para realizar la curva de calibración se utilizó una solución estándar de umbelliferona (0.1 g de umbelliferona en 5 mL de metanol absoluto llevando a aforo con 50 mL agua destilada). Las absorbancias y las muestras fueron leídas a 320 nm en un espectrofotómetro UV. Las concentraciones fueron expresadas como equivalentes de umbelliferona en mg/mL (Bravo y Jiménez, 2011).

Esteroides

Para la cuantificación de esteroides se empleó el reactivo de Liberman Buchard, que identifica estructuras que comparten enlaces dobles conjugados. Se utilizó cloroformo para solubilizar la muestra con el fin de favorecer la captación de moléculas de agua, dando lugar a la liberación de iones de hidrógeno los cuales catalizan la dimerización y la generación de trióxido de azufre generando un compuesto coloreado (Figura 21) (Enríquez *et al.*, 2008).

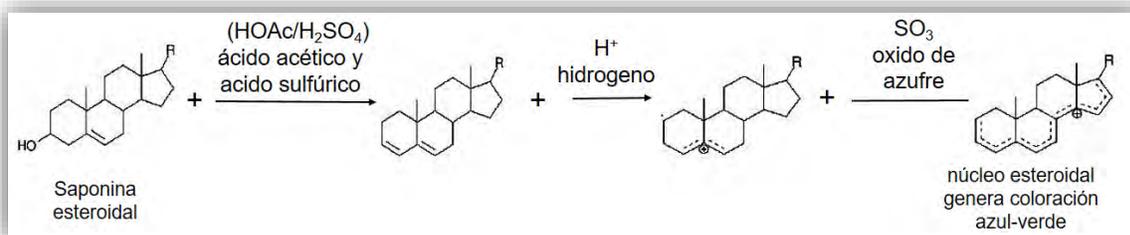


Figura 21. Reacción de saponina con el reactivo Liberman Buchard. Tomado de Enríquez *et al.*, 2007.

Para la curva de calibración se realizó una solución estándar colesterol (3.8 mg/mL) 10 mM. Las absorbancias de la curva y de las muestras fueron leídas a 550 nm en un espectrofotómetro. Las concentraciones obtenidas son expresadas como equivalentes de colesterol en mg/mL (Lobato *et al.*, 2008).

Glucósidos cardiotónicos

La deferminación de glucósidos cardiotónicos se fundamenta en la presencia de un anillo lactónico en su estructura. El anillo lactónico le confiere fragilidad a la molécula, por lo que en soluciones alcalinas se induce la apertura de éste.



La cuantificación se llevó a cabo empleando un patrón de digoxina de 0.04 mg/mL, se tomaron 5 mL de esta solución y se añadieron 3 mL de solución alcalina de picrato de sodio. En seguida, se incubó durante 30 minutos y las absorbancias fueron leídas a 495 nm.

Se realizó un único tubo con la solución estándar para la elaboración de la curva de calibración. Para determinar la concentración de glucósidos cardiotónicos presentes en los extractos se utilizó la siguiente fórmula:

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

Donde

CMx=Cantidad de glucósidos cardiotónicos en la muestra

CSt=Concentración del estándar usado en el análisis

AMx=Absorbancia de la muestra

Ast=Absorbancia del estándar

FD=Factor de dilución de la muestra

Las concentraciones obtenidas fueron expresadas como equivalentes de digoxina en mg/mL (Abrego y Honles, 2012).

Polifenoles

Su cuantificación se fundamenta en la oxidación de los polifenoles con el reactivo de Folin Ciocalteu, en un pH básico, este reactivo de color amarillo, oxida los fenolatos reduciendo los ácidos del reactivo, dando lugar a un complejo molibdeno-wolframio de coloración azul. Los fenoles son oxidados rápidamente en un medio alcalino, por esta razón el reactivo debe estar presente en altas concentraciones (Cadahia, 1995).

Para la curva de calibración se realizó una solución estándar de ácido gálico (0.018 g en 50 mL) 2 mM. La absorbancia fue determinada en un espectrofotómetro a 760 nm. La concentración de polifenoles fue expresada en equivalentes de ácido gálico en mg/mL. (García *et al.*, 2011, Martínez *et al.*, 2015).

Saponinas

Esta técnica se fundamenta en la separación por hidrólisis acida (anhídrido acético/ ácido sulfúrico al 16%) de carbohidratos y del aglicón presentes en la estructura de la saponina.

Para realizar la curva de calibración se utilizó como solución estándar sapogenina (20 mg/mL). Las absorbancias se leyeron a 485 nm en un



espectrofotómetro. Las concentraciones de saponinas fueron expresadas en equivalentes de saponina en mg/mL (Ramos, Paz y Ortiz, 2014).

Taninos

En la cuantificación de taninos se empleó un método indirecto, utilizando una solución estandar de ácido tánico (0.1 mg/ mL) (Dardon y Duran, 2011).

Método Folin Ciocalteu, se fundamenta en la oxidación de los fenoles en medio básico, mezcla de complejos de ácidos fosfotungstácico y fosfomolibdico presentando una coloración azul característica, que puede ser detectada espectrofotométricamente. Este método determina la totalidad de los grupos fenólicos libres y la totalidad de fenoles solubles como: taninos hidrolizables y taninos condensados (Dardon y Duran, 2011). El método no discrimina entre taninos y compuestos fenólicos diferentes a los taninos u otras moléculas fácilmente oxidantes. La polivinilpirrolidona (PVPP) al ser un polímero insoluble en medio acuoso enlaza a todos los taninos dejando en solución los fenoles que no son taninos. Una vez obtenida la concentración de polifenoles se le resta la concentración de fenoles simples, la concentración de los taninos se obtiene por diferencia de concentración de fenoles totales (Dardon y Duran, 2011).

Las absorbancias fueron leídas en un espectrofotómetro a 725 nm. Se calcularon las concentraciones de fenoles totales expresada en mg/mL de ácido tánico y las concentraciones de taninos fueron expresadas como equivalentes de ácido tánico en mg/mL.

7.4 Diseño experimental

Se trabajó con un lote de 60 ratones hembras de la cepa CD₁, del bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, los cuales se mantuvieron *ad libitum*. De esta forma los procedimientos de experimentación fueron desarrollados bajo la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio).

7.4.1 Inducción de carcinoma

Se utilizaron 60 ratones hembras con una edad de 2 meses. Divididos en 10 grupos con 6 ratones cada grupo, de los cuales 24 fueron inducidos con DMBA durante un periodo de 90 días. El DMBA fue administrado vía oral durante 3 meses, en una única dosis de 5 mg/ 55 g de peso ratón, diluido en aceite de olivo (Cuadro 6 y Figura 22). Se realizaron observaciones diariamente y palpaciones en todo el ratón cada 8 días, registrando la aparición de tumores.



Cuadro 6. Diseño experimental.

Grupo	Características del tratamiento
Grupo 1	Control negativo Animales sin inducción de cáncer, ni tratamiento.
Grupo 2	Vehículo Se les administró vía oral una dosis única de 50 μL de aceite de olivo, el mismo día de inducción de cáncer.
Grupo 3	Extracto flor acuoso Se les administró diariamente vía oral 25 μL del extracto acuoso de flor a una concentración de 0.24×10^{-5} g durante 15 días.
Grupo 4	Extracto hoja acuoso Se les administró diariamente vía oral 25 μL del extracto acuoso de hoja a una concentración de 0.56×10^{-5} g durante días.
Grupo 5	Extracto raíz acuoso Se les administró diariamente vía oral 25 μL del extracto acuoso de raíz a una concentración de 0.61×10^{-5} durante 15 días.
Grupo 6	Extracto hoja hidroalcohólico Se les administró diariamente vía oral 25 μL del extracto hidroalcohólico de hoja a una concentración de 0.60×10^{-5} g durante 15 días.
Grupo 7	Control positivo Se les administró por única vez una dosis de 2.9 mg de DMBA diluido en 50 μL de aceite de olivo.
Grupo 8	Se les administró por única vez 50 μL de DMBA a una concentración de 3.09 mg diluido en aceite de olivo, posteriormente de 14 semanas, fueron tratados diariamente con extracto acuoso de hoja a una concentración de 0.56×10^{-5} g en 25 μL durante 15 días.
Grupo 9	Se les administró por una única vez 50 μL de DMBA a una concentración de 3.18 mg diluido en aceite de olivo, posteriormente de 14 semanas, fueron tratados diariamente con extracto acuoso de raíz a una concentración de 0.61×10^{-5} g en 25 μL , durante 15 días.
Grupo 10	Se les administró por una única vez 50 μL de DMBA a una concentración de 3.36 mg diluido en aceite de olivo, posteriormente de 14 semanas, fueron tratados diariamente con extracto hidroalcohólico de hoja a una concentración de 0.60×10^{-5} g en 25 μL durante 15 días.



Figura 22. Inducción de cáncer con DMBA en ratones CD₁.

7.4.2 Tratamiento con extractos *Plantago major* en ratones

Concluido el tiempo de inducción de cáncer de mama con DMBA fueron tratados con los extractos acuosos e hidroalcohólicos de *Plantago major* (Figura 23). El tratamiento se administró diariamente vía oral considerando la dosis empleada por la comunidad (5 g en 1 litro) durante 15 días ver cuadro 6.



Figura 23. Administración del tratamiento con los extractos de *Plantago major*.

7.5 Obtención de plasma y homogenado de hígado

Después de las 14 semanas (90 días) de inducción, los diez grupos de animales fueron sacrificados por decapitación, la sangre obtenida de cada ratón se guardó en tubos vacutainer con EDTA, estos fueron centrifugados a 3500 rpm durante 15 minutos y posteriormente, se separó el plasma el cual se preservó en hielo seco hasta el momento de su análisis.

Para la obtención del homogenado de hígado, se extrajo el hígado de los ratones estos se colocaron en cajas petrí por separado con solución fisiológica, en seguida se perfundieron con solución salina al 0.09 %. Posteriormente en morteros de porcelana fueron macerados con buffer (TRIS/pH 7.5) en una relación de 20 g de hígado por 100 mL de buffer (Figura 24). Por último, se filtraron y en seguida se centrifugaron durante 10 minutos a 3000 rpm, el sobrenadante fue preservado en hielo seco hasta el momento de su análisis.



Figura 24. Macerado de hígado en buffer (TRIS)

El plasma y homogenado de hígado fueron utilizados para la cuantificación de proteínas y evaluación de marcadores de estrés oxidante (óxido nítrico, lipoperoxidación lipídica y catalasa).

7.5.1 Extirpación de tumores

Los ratones fueron examinados detenidamente, localizando masas anormales los cuales fueron extirpados, para ser medidos y posteriormente pesados, almacenándolos en solución formol al 10 %.

7.6 Cuantificación de proteína en plasma e hígado

El Método Biuret permite determinar la presencia de proteína en una mezcla, mediante la formación de un complejo estable entre proteína y cobre. Este complejo presenta un color violeta característico que se puede observar a 310 y 540-560 nm, debido a la coordinación de un átomo de cobre con 4 átomos de nitrógeno. El método se fundamenta en la desprotonación de los grupos amida para formar enlaces con el cobre (II) o por el establecimiento de un enlace entre el metal y los pares de electrones libres de los átomos de oxígeno y nitrógeno del péptido (Figura 25) (Fernández y Galván, s/a).

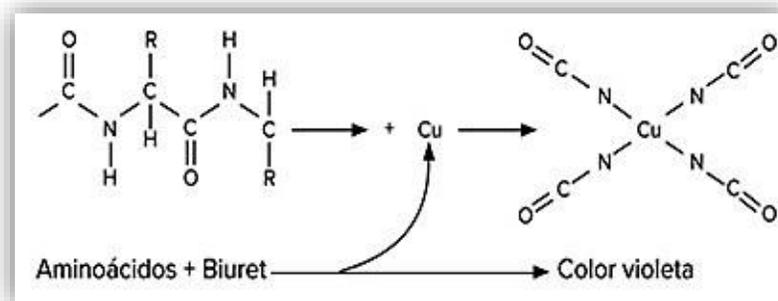


Figura 25. Reacción de Biuret con el péptido. Tomado de Sánchez *et al.*, 2014.

Se realizó una curva de calibración utilizando un patrón de albumina (10 mg/mL). En seguida se les incorporo 4 mL de reactivo Biuret estos fueron guardadas en total oscuridad durante 20 minutos. Posteriormente se leyeron en un espectrofotómetro a 545 nm. Las muestras fueron tratadas de la misma forma que la curva (Figura 26).



Figura 26. Curva de proteína, método de Biuret.

La concentración de proteínas por el Método de Biuret fue utilizada para registrar la concentración final de los marcadores de estrés oxidante por mg/mL de proteína.

7.7 Evaluación de marcadores de estrés oxidante

Cuantificación de nitritos en plasma y homogenado de hígado

7.7.1 Óxido Nítrico (NO)

Cuando existe una producción sostenida de NO debido a factores como activación de macrófagos o por la NOSmt (Sintetasa Óxido Nítrico mitocondrial) y la producción de $O_2^{\bullet-}$ generado por la mitocondria. Esta formación simultánea de hidroxilo y óxido nítrico produce peroxinitrito, un agente nitrante y un oxidante altamente fuerte capaz de inhibir importantes enzimas y afectar la integridad mitocondrial reaccionando con grupos $-SH$ de residuos de cisteína (s-nitrosilación) y grupos $-OH$ de residuos de tirosina (nitricación) (Saavedra *et al.*, 2004, Turrens, 2003,). La generación de peroxinitrito es descompuesta rápidamente en diferentes moléculas como el radical hidroxilo, nitratos y nitritos (Clapés *et al.*, 2012). La cuantificación de óxido nítrico es difícil en medios biológicos ya que su vida media es corta (6 a 10 segundos) y sus concentraciones son bajas, debido a esto, son detectados por reacción colorimétrica cuantificando sus metabolitos estables: nitrito (NO_2) y nitrato (NO_3) (Adarmes *et al.*, 2009).

Se empleó El método Griess; para la detección específica de nitrito y no nitrato. La reacción de Griess se fundamenta en la formación de un cromóforo por la reacción de sulfinilamida con nitrato en medio ácido, seguido de un acoplamiento con aminas bicíclicas tales como el N-1-(naftil) etilendiamina dihidrocloruro (Adarmes *et al.*, 2009).

Se realizó una curva de calibración de nitrito de sodio $NaNO_2$ 1 mM. En seguida se adiciono 1 mL de solución de sulfanilamida dejando en reposo 5 minutos, posteriormente se añadió 1 mL de solución NED, por segunda ocasión se dejaron en reposo durante 5 minutos, la absorbencia fue leída a 540 nm (Adarmes *et al.*, 2009). Las muestras de sangre y homogenado de hígado fueron tratadas igual que la curva patrón (Figura 27).



Figura 27. Curva de nitritos, método de Griess.



Cuantificación de catalasa en plasma e hígado

7.7.2 Catalasa

Los electrones que se escapan en la cadena respiratoria dan origen al $O_2^{\bullet-}$ el cual puede sufrir una dismutación formando así el peróxido de hidrógeno (Delgado *et al.*, 2010), causantes de graves daños. La enzima catalasa aumenta la velocidad de descomposición de estas sustancias (Aguilar y Durán, 2011), basándose en la propiedad catalítica, esta enzima rompe la dismutación del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno evitando la formación de especies reactivas de oxígeno (Figura 28) (Díaz, 2003).



Figura 28. Descomposición del peróxido de hidrógeno.

Método de Chance y Machley. Este método se fundamenta en el principio de la enzima, la cual se determina a través de la descomposición del H_2O_2 utilizando un espectro UV (Aebi, 1984). Se colocaron 3 mL de sustrato en una celda de cuarzo, con una micropipeta se añadió 25 μ L de muestra, en seguida se colocaron en un espectrofotómetro UV.

Para calcular la actividad de la catalasa se utilizó la ecuación:

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

Donde:

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

Cuantificación de malondialdehído en plasma e hígado

7.7.3 Lipoperoxidación lipídica

La peroxidación lipídica es resultado del daño que se ha generado en la membrana celular como consecuencia del ataque de radicales libres a los ácidos grasos poli-insaturados de fosfolípidos que componen la membrana celular, derivando una reacción en cadena que se inicia por la abstracción del hidrógeno o por la adición de un radical de oxígeno de un grupo metileno de un



ácido graso poli-insaturado, formando hidroperóxidos que son degradados rápidamente, estos hidroperóxidos dan como resultado a los aldehídos los cuales tienen una alta reactividad con moléculas como las proteínas y el ADN. Uno de estos aldehídos generados es el malondialdehído (CHO-CH₂-CHO) MDA. (Pérez y Pérez, 2000, Repetto *et al.*, 2012). En el último estado de peroxidación, los peróxidos son descompuestos a aldehídos como el malondialdehído, que es un cetoaldehído fisiológico producto de la descomposición de lípidos insaturados del metabolismo del ácido araquidónico.

El MDA es detectado por reacción colorimétrica con ácido tiobarbitúrico (Mañón *et al.*, 2016). Este método TBARS, implica la conversión oxidativa de ácidos grasos insaturados (hidroperoxidación o lipoperóxidos). La lipoperoxidación es medida mediante la producción de malondialdehído, que al reaccionar con el ácido tiobarbitúrico forma un complejo coloreado que se lee a 535 nm (Arroyo *et al.*, 2010). Para obtener la concentración final se empleó el coeficiente de extinción molar del malondialdehído, utilizando la ecuación:

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

Donde:

ϵ es el coeficiente de extinción molar del MDA a 532 nm (155 Mm⁻¹ cm⁻¹) y P es el grosor de la fotocelda (1 cm).

8. Análisis estadístico ANOVA

Los resultados fueron sometidos a un análisis estadístico con un nivel de confianza de $p > 0.05$ utilizando el programa IBM® SPSS® Statistics (Statistical Package for the Social Sciences), versión 25. Los datos se analizaron de la siguiente forma. Se formaron diez grupos con 6 datos cada uno. El grupo 1, control negativo (sin ningún tratamiento), grupo 2 (vehículo), grupo 3 tratamiento con extracto acuoso de flor, grupo 4 tratamiento con extracto acuoso de hoja, grupo 5 tratamiento con extracto acuoso de raíz, grupo 6 tratamiento con extracto hidroalcohólico de hoja, grupo 7 (control positivo) inducción con DMBA, grupo 8 inducido y tratado con extracto acuoso de hoja, grupo 9 inducido y tratado con extracto acuoso de raíz y grupo 10 inducido y tratado con extracto hidroalcohólico de hoja, todos estos con respecto a la concentración de proteínas, catalasa, óxido nítrico, lipoperoxidación lipídica, por separado. Para definir el procedimiento estadístico de análisis de varianza sea paramétrico o no paramétrico, se procedió a analizar la normalidad y homocedasticidad de los datos en cada uno de los diez grupos. Para finalmente definir como hipótesis nula la no existencia de diferencia significativa en cuanto al comportamiento promedio o de mediana entre los diez grupos.



Complementariamente, se aplicaron diagramas de caja a cada grupo para visualizar espacialmente el comportamiento de los datos.

9. Resultados

9.1 Información etnobotánica

La Comunidad de Limón Chiquito tiene una densidad poblacional de 958 habitantes, de ellas se seleccionaron 25 para aplicarles la entrevista etnobotánica (curanderos), 20 del género femenino y 5 del género masculino, con un rango de edad de los 27 a los 70 años.

Para realizar el estudio de *Plantago major* se tomaron puntos específicos de las entrevistas como uso medicinal, estructura de la planta comúnmente utilizada, dosis que se utiliza, observaciones durante su uso y, por último, si presenta efectos adversos durante o posterior a su uso (Cuadro 7).

Cuadro 7. Registro de información etnobotánica de *Plantago major*.

Nombre común	Llantén
Estructura de la planta comúnmente utilizada	Hoja
Uso	Tratamiento anticancerígeno, heridas, diabetes, riñones, cólicos (menstruación), inflamación y dolor estomacal.
Dosis utilizada	5 gramos en 1 litro de agua
Forma de empleo	Cocimiento (té), agua de tiempo y cataplasma
Tiempo de tratamiento	15 días o hasta total alivio (1 mes)

Como resultado de las 25 entrevistas realizadas, la estructura comúnmente utilizada es la hoja, sin embargo, solo en 2 de las entrevistas refieren que, si hay presencia de tallo y de flor también es útil para tratar afecciones, mientras que los frutos y la raíz no son utilizados por las personas.

La forma de administrar *Plantago major* es en té para tratar malestares como son dolor estomacal, inflamación estomacal, menstruación y cáncer, como agua de tiempo en afecciones como: riñones y diabetes, y en forma de cataplasma sobre heridas (Figura 29).

La dosis fue seleccionada acorde a las entrevistas etnobotánicas que refieren un puñado de hojas de *Plantago major*, empleando 5 g de hoja en 1 L de agua.

El tiempo de tratamiento es durante 15 días o más, hasta curar la afección (1 mes), no se reportan efectos secundarios durante o después de su uso.

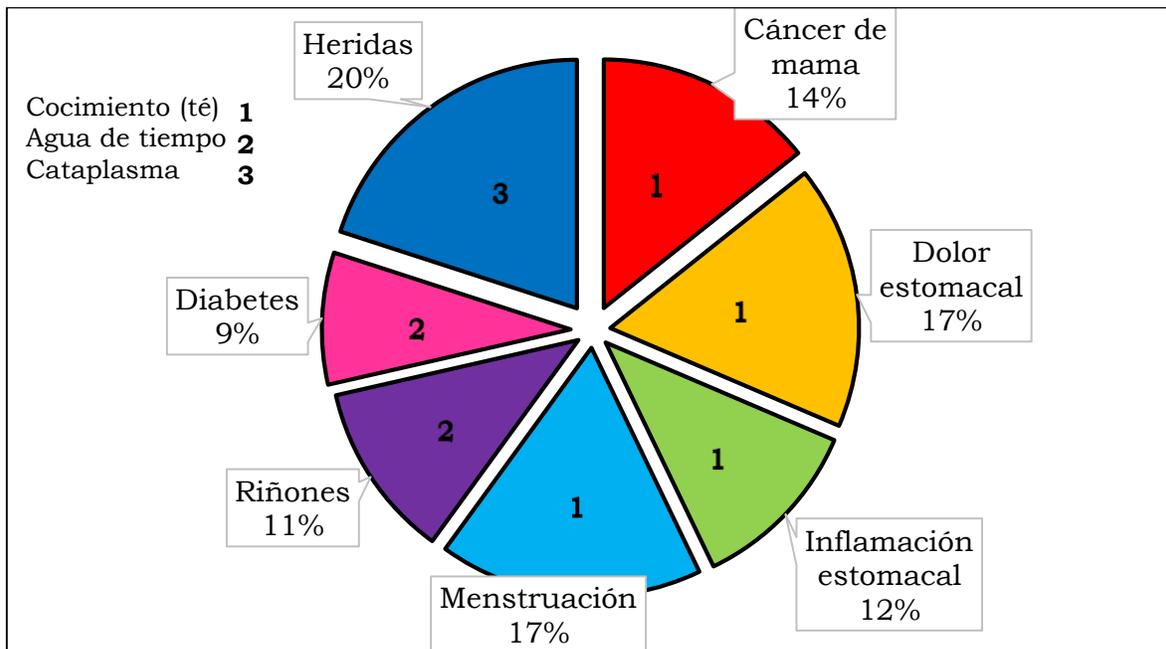


Figura 29. Uso medicinal de *Plantago major* para tratar diferentes afecciones.

9.1.2 Obtención de extractos de *Plantago major*

Los extractos secos de cada una de las estructuras de la planta se prepararon utilizando el material vegetal y el solvente en una proporción 1/10. (Nota solo cuando el material vegetal fue insuficiente se cambió esta relación) cuadro 8 y 9.

Cuadro 8. Gramos utilizados de *Plantago major* en extractos acuosos.

Estructura de la planta	Material vegetal (g)	Agua destilada (mL)
Flor	30	300
Hoja	100	1000
Raíz	20	500

Cuadro 9. Gramos utilizados de *Plantago major* en extractos hidroalcohólicos.

Estructura de la planta	Material vegetal (g)	Etanol : agua destilada (3:1 en mL)
Hoja	100	750:250
Raíz	20	375:125

De acuerdo a la cantidad de material vegetal utilizado para ambos extractos acuosos e hidroalcohólicos, el rendimiento obtenido se calculó con la siguiente ecuación:

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

Donde P; es el peso de extracto seco final (g) y m es el peso del material vegetal al inicio (g) (Tolosa y Cañizares, 2002).

En el cuadro 10 se muestra el rendimiento de cada extracto y en la figura 30 la coloración inicial de todas las muestras.

Cuadro 10. Rendimiento de los extractos acuosos e hidroalcohólicos de *Plantago major*.

Extracto acuoso	Rendimiento
Flor	0.780 %
Hoja	8.964 %
Raíz	1.9545 %
Extracto hidroalcohólico	
Hoja	9.6765 %
Raíz	3.452 %

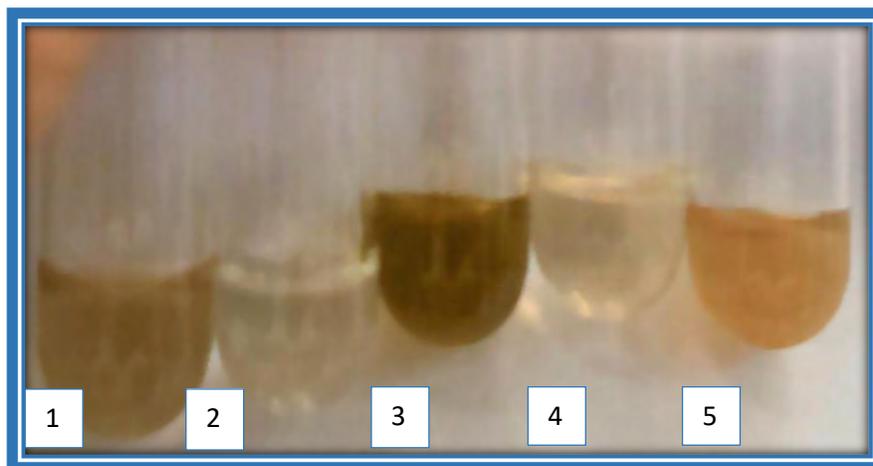


Figura 30. Color de los extractos acuosos e hidroalcohólicos de *Plantago major*. 1. Flor acuoso, 2. Hoja acuoso, 3. Hoja hidroalcohólico, 4. Raíz acuoso y 5. Raíz hidroalcohólico.

9.1.3 Cuantificación de azúcares totales de *Plantago major*

En la cuantificación de azúcares totales, la mayor concentración se obtuvo en el extracto acuoso de raíz con 78.932 μg , con una concentración de 58.651 μg el extracto hidroalcohólico de hoja, con una concentración de 39.213 μg el extracto acuoso de hoja, con una concentración de 22.808 μg el extracto hidroalcohólico de raíz y la menor concentración de azúcares totales fue para el extracto acuoso de hoja con 20.561 μg (Figura 31).

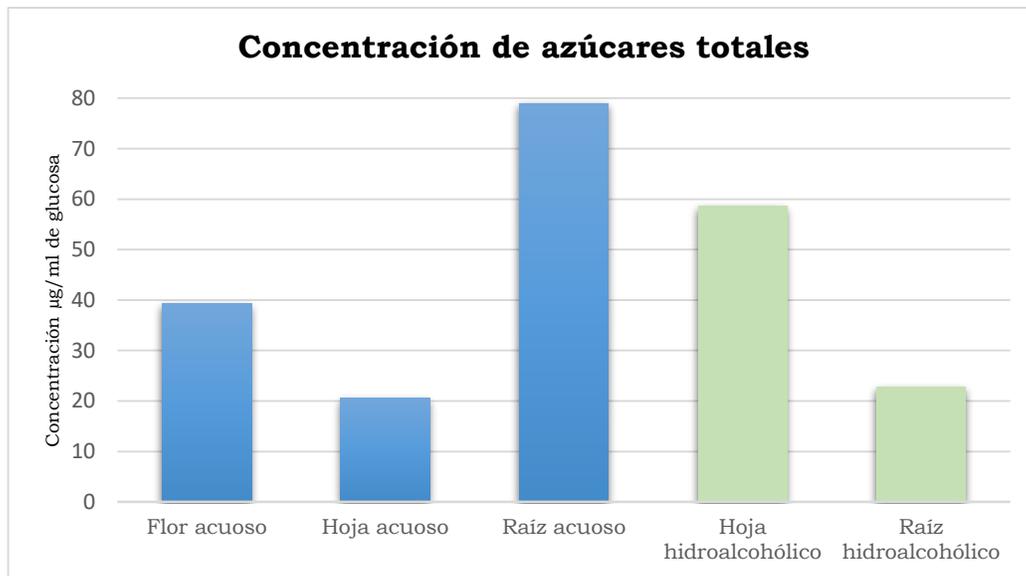


Figura 31. Concentración de azúcares totales en los extractos de *Plantago major*.

9.4 Identificación y cuantificación de grupos de metabolitos secundarios en extractos de *Plantago major*

El estudio fitoquímico demostró que los extractos acuosos presentaron metabolitos secundarios como alcaloides, cumarinas, glucósidos cardiotónicos, polifenoles, esteroides y saponinas. Sin embargo, no hubo presencia de flavonoides (Cuadro 11).



Cuadro 11. Identificación de metabolitos secundarios en extractos acuosos de *Plantago major*.

Metabolito secundario	Prueba	Extracto de flor	Extracto de hoja	Extracto de raíz
Alcaloides	Mayer	++	--	+
	Dragendorff	++	+	--
	Wagner	+	--	+
Cumarinas	Hidróxido de Sodio	++	++	++
Flavonoides	Shinoda	--	--	--
Glucósidos cardiotónicos	Baljet	++	+++	+
	Keller -Killiani	++	++	+
Polifenoles	Reactivo Folin Ciocalteau	+++	++	+++
Saponinas	Espuma	+	--	--
Esteroides	Lieberman	++	+	++
Taninos	Gelatina-sal	+	+	+

Presencia abundante +++, presencia moderada ++, presencia poca + y ausencia --

El análisis de los extractos hidroalcohólicos arrojó la presencia alcaloides, cumarinas, glucósidos cardiotónicos, polifenoles, saponinas y esteroides, no presentaron taninos. Sin embargo, tanto en extractos acuosos como hidroalcohólicos no hubo presencia de flavonoides (Cuadro 12).

Los extractos acuosos de *Plantago major* presentaron mayor arrastre de metabolitos secundarios que los extractos hidroalcohólicos.

Cuadro 12. Identificación de metabolitos secundarios en extractos hidroalcohólicos de *Plantago major*.

Metabolito secundario	Prueba	Extracto de hoja	Extracto de raíz
Alcaloides	Mayer	--	+
	Dragendorff	++	+
	Wagner	--	+
Cumarinas	Hidróxido de Sodio	+	++
Flavonoides	Shinoda	--	--
Glucósidos cardiotónicos	Baljet	+++	+
	Keller -Killiani	+++	+
Polifenoles	Reactivo Folin Ciocalteau	+++	--
Saponinas	Espuma	+	++
Esteroides	Liberman	+++	++
Taninos	Gelatina-sal	--	--

Presencia abundante +++, presencia moderada ++, presencia poca + y ausencia

Las identificaciones de los grupos de metabolitos secundarios fueron realizadas utilizando diferentes ensayos.

Alcaloides

En la figura 32 se observa un precipitado color crema-blanco que indica la presencia de alcaloides.

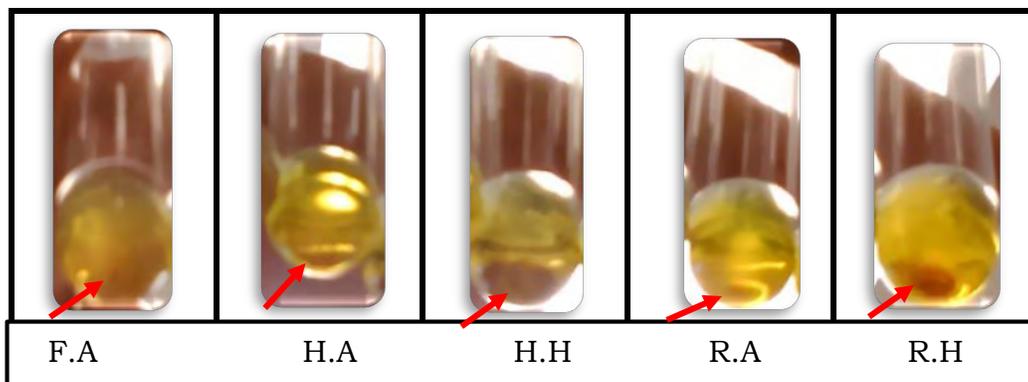


Figura 32. Alcaloides, prueba de Meyer 1er técnica. F.A flor acuoso, H.A hoja acuoso, H.H hoja hidroalcohólico, R.A raíz acuoso y R.H raíz hidroalcohólico.

En la figura 33 se observa un precipitado color naranja-rojizo, que indica la presencia de alcaloides.

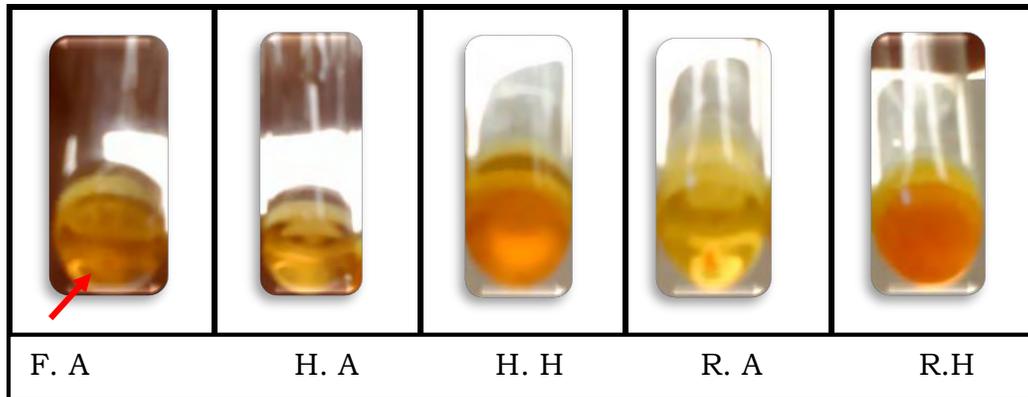


Figura 33. Alcaloides, prueba de Wagner 2da técnica. F.A flor acuoso, H.A hoja acuoso, H.H hoja hidroalcohólico, R.A raíz acuoso y R.H raíz hidroalcohólico.

En la figura 34 se observa un precipitado naranja-rojizo, que indica la presencia de alcaloides.

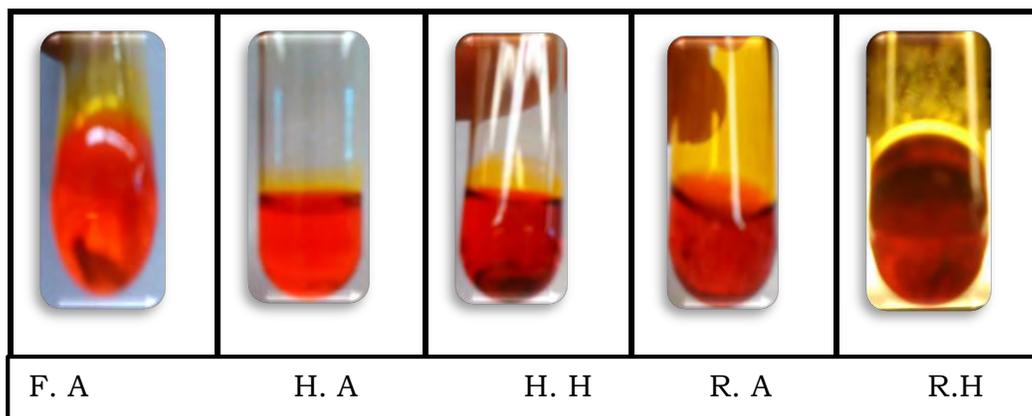


Figura 34. Alcaloides, prueba de Dragendorff 3ra técnica. F.A flor acuoso, H.A hoja acuoso, H.H hoja hidroalcohólico, R.A raíz acuoso y R.H raíz hidroalcohólico.

Cumarinas

En la figura 35 la prueba es positiva si al acidular la muestra, la coloración amarilla desaparece.

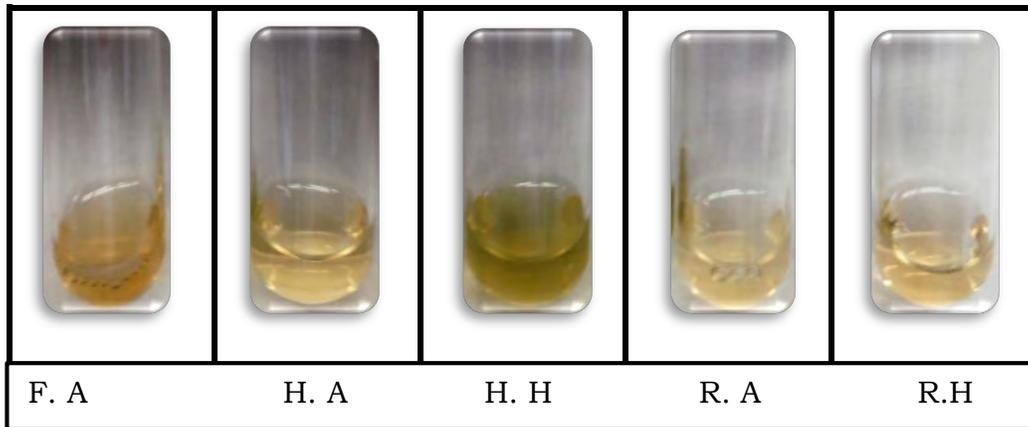


Figura 35. Cumarinas, reacción de hidróxido de sodio. F.A flor acuoso, H.A hoja acuoso, H.H hoja hidroalcohólico, R.A raíz acuoso y R.H raíz hidroalcohólico.

Flavonoides

En la figura 36 no se observa cambio de color, dando negativa la prueba de flavonoides.

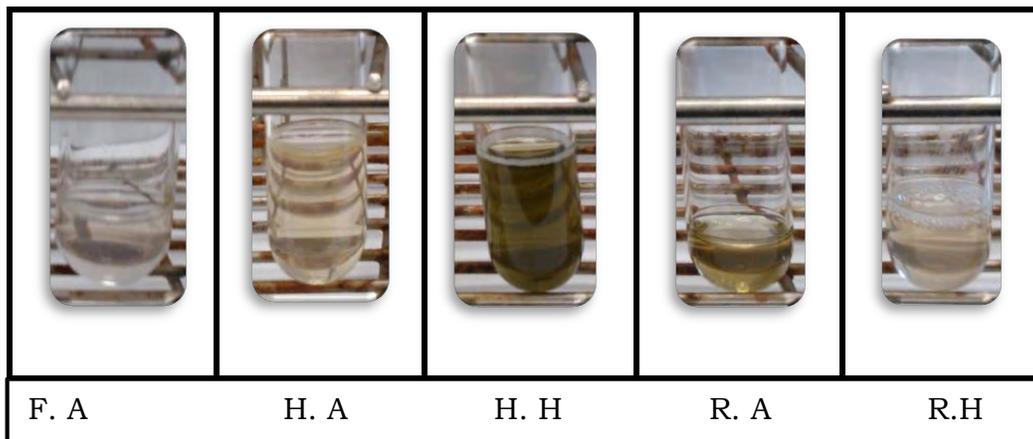


Figura 36. Flavonoides, reacción Shinoda. F.A flor acuoso, H.A hoja acuoso, H.H hoja hidroalcohólico, R.A raíz acuoso y R.H raíz hidroalcohólico.

Glucósidos cardiotónicos

En la figura 37 la prueba es positiva si existe la coloración de verde o café pardo.

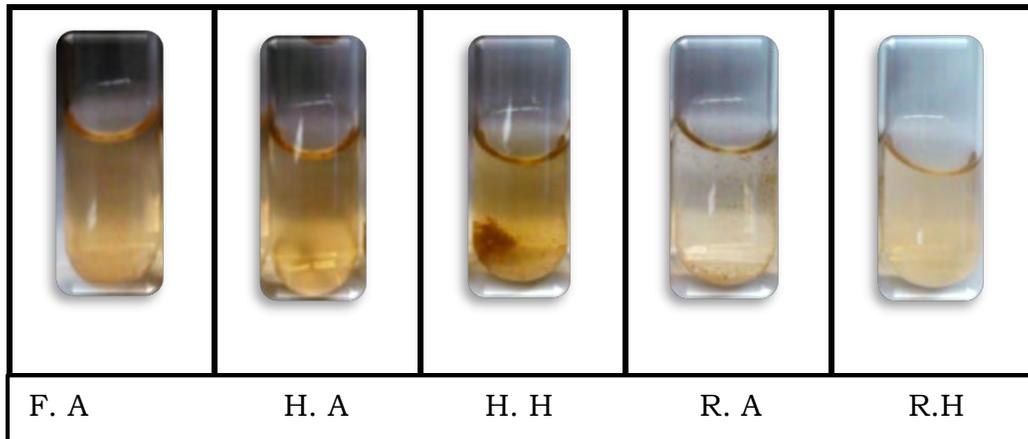


Figura 37. Glucósidos cardiotónicos, prueba Keller-killiani. F.A flor acuoso, H.A hoja acuoso, H.H hoja hidroalcohólico, R.A raíz acuoso y R.H raíz hidroalcohólico.

En la figura 38 se observa precipitado color rojo-naranja, por lo que se considera positiva la presencia de glucósidos cardiotónicos.

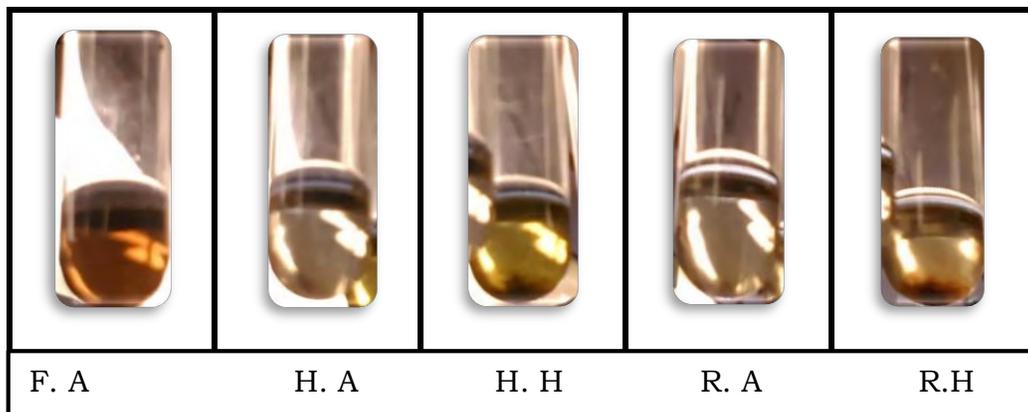


Figura 38. Glucósidos cardiotónicos, prueba Baljet. F.A flor acuoso, H.A hoja acuoso, H.H hoja hidroalcohólico, R.A raíz acuoso y R.H raíz hidroalcohólico.

Polifenoles

En la figura 39 se observa coloración azul turquesa, por lo que se considera presencia de polifenoles.

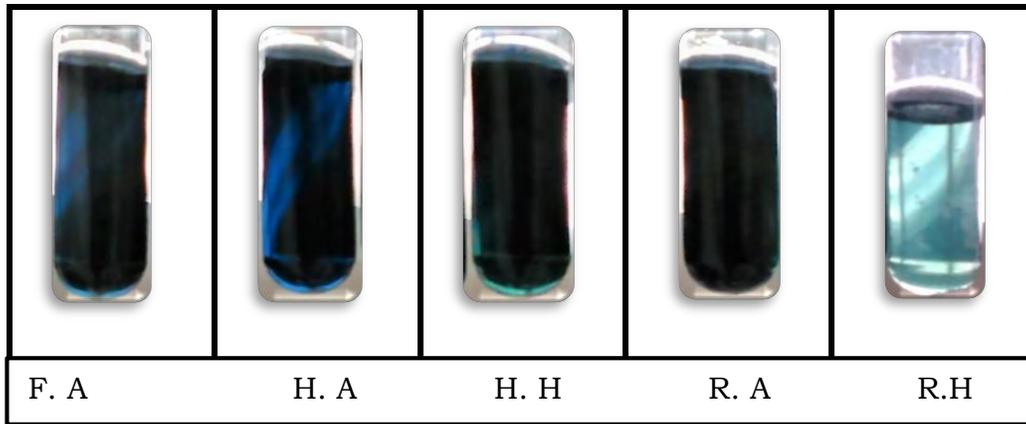


Figura 39. Polifenoles, reactivo Folin-Ciocalteu. F.A flor acuoso, H.A hoja acuoso, H.H hoja hidroalcohólico, R.A raíz acuoso y R.H raíz hidroalcohólico.

Saponinas

En la figura 40 se observa espuma estable, otorgando la presencia de saponinas

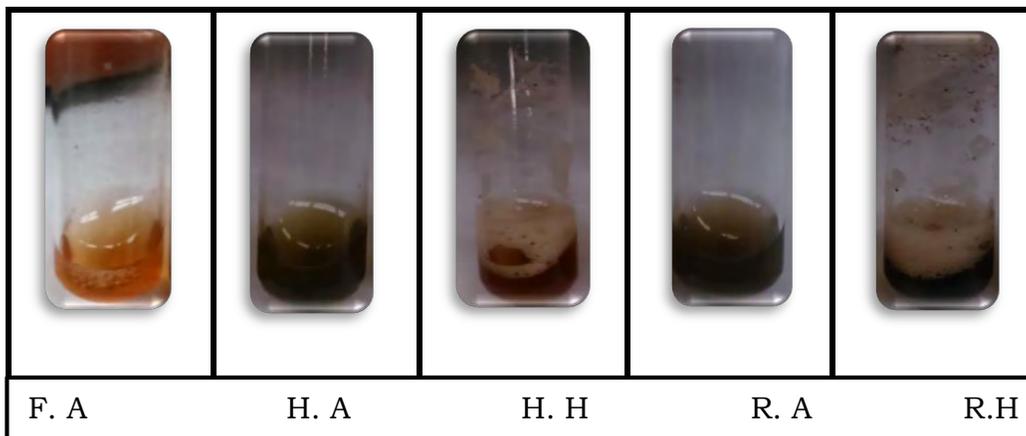


Figura 40. Saponinas, prueba de espuma. F.A flor acuoso, H.A hoja acuoso, H.H hoja hidroalcohólico, R.A raíz acuoso y R.H raíz hidroalcohólico.

Esteroides

En la figura 41 se observa una coloración azul-verde indicando la presencia del núcleo esteroideo.

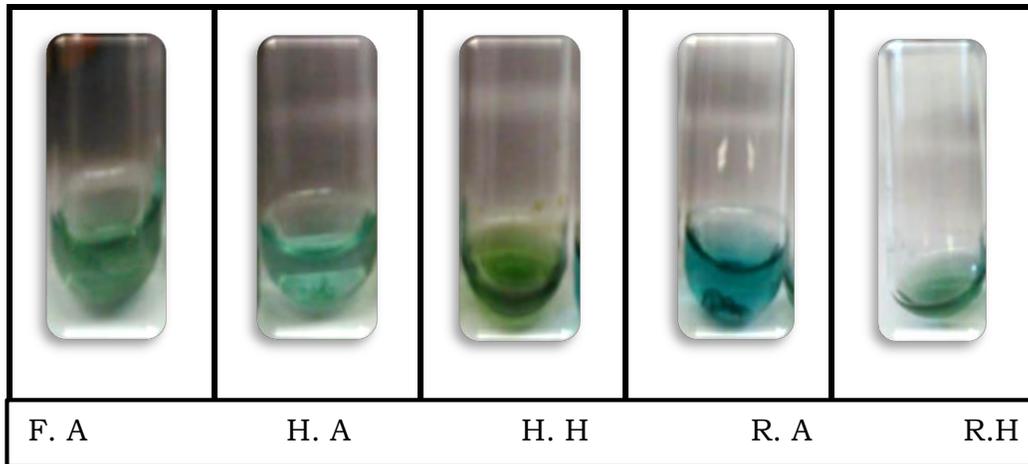


Figura 41. Saponinas, reactivo Liberman Burchard. F.A flor acuoso, H.A hoja acuoso, H.H hoja hidroalcohólico, R.A raíz acuoso y R.H raíz hidroalcohólico.

Taninos

En la figura 42 se observa un precipitado color blanco indicando la presencia de taninos.

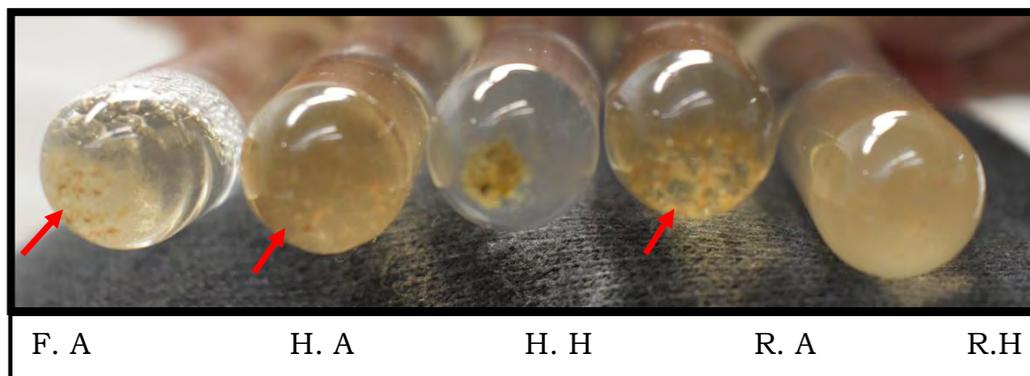


Figura 42. Taninos, prueba gelatina-sal. F.A flor acuoso, H.A hoja acuoso, H.H hoja hidroalcohólico, R.A raíz acuoso y R.H raíz hidroalcohólico.



Cada grupo de metabolito secundario identificado en los extractos acuosos e hidroalcohólicos de *Plantago major* fueron cuantificados. Para llevar a cabo la cuantificación se preparó una solución de 0.01 g/mL del extracto seco en agua, utilizando diferentes cantidades para cada ensayo.

En el cuadro 13 se muestran las concentraciones expresadas en ($\mu\text{g/mL}$) de cada metabolito secundario en cada extracto.

Metabolitos secundarios	Flor acuoso	Hoja acuoso	Hoja hidroalcohólico	Raíz acuoso	Raíz hidroalcohólico
Alcaloides (cafeína)	85.261	55.758	91.216	78.495	88.239
Cumarinas (umbelliferona)	7.629	2.543	3.000	3.236	3.236
Esteroides (colesterol)	317.05	438.84	1902.74	1707.44	2707.70
Glucósidos cardiotónicos (digoxina)	7.280	9.360	9.430	9.230	10.08
Polifenoles (ácido gálico)	15.417	11.548	11.646	17.607	8.7318
Saponinas (sapogenina)	6.122	8.571	5.969	11.581	10.357
Taninos (ácido tánico)	332.115	376.397	154.987	-----	-----

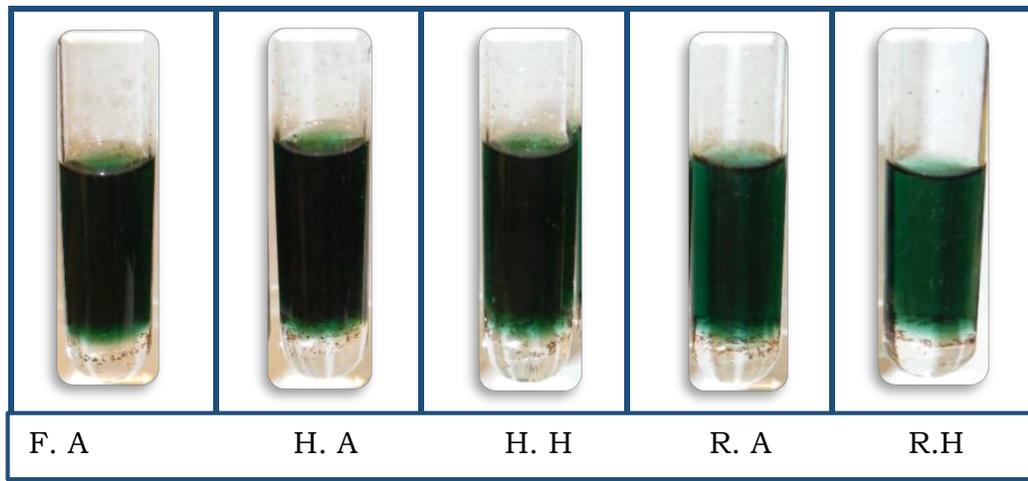
Cuadro 13. Concentraciones expresadas en $\mu\text{g/mL}$ de metabolitos secundarios en extractos de *Plantago major*.



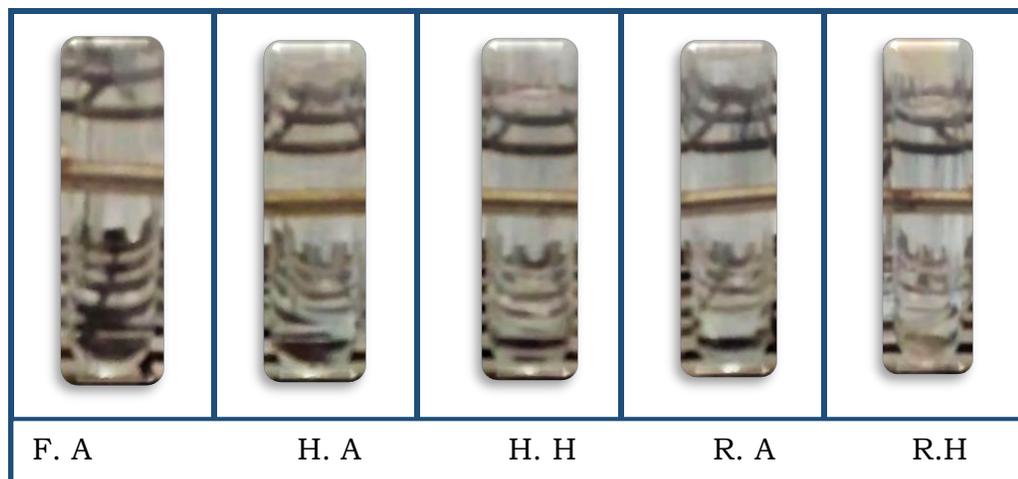
Las cuantificaciones de los metabolitos secundarios fueron realizadas utilizando diferentes métodos, la figura 43 muestra el cambio de coloración que obtuvo cada extracto de *Plantago major*.

Los tubos de ensayo están colocados en la siguiente forma: F.A (flor acuoso), H.A (hoja acuoso), H.H (hoja hidroalcohólico), R.A (raíz acuoso) y R.H (raíz hidroalcohólico).

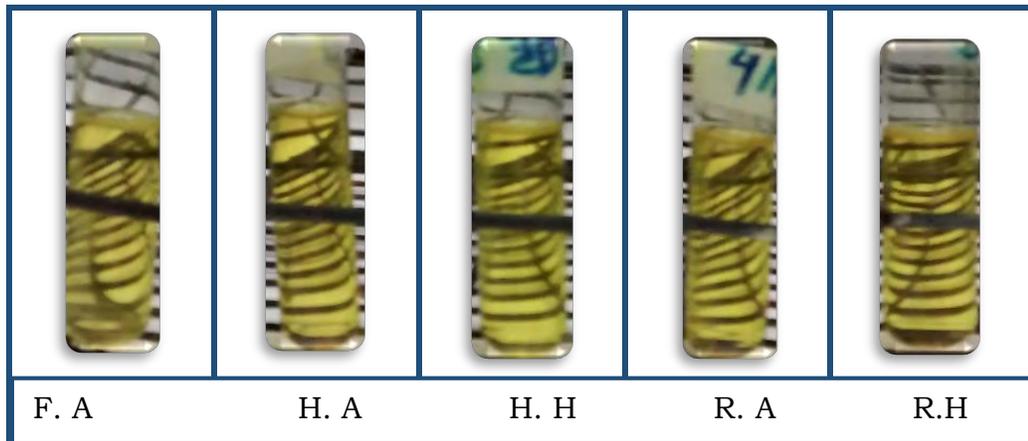
Alcaloides



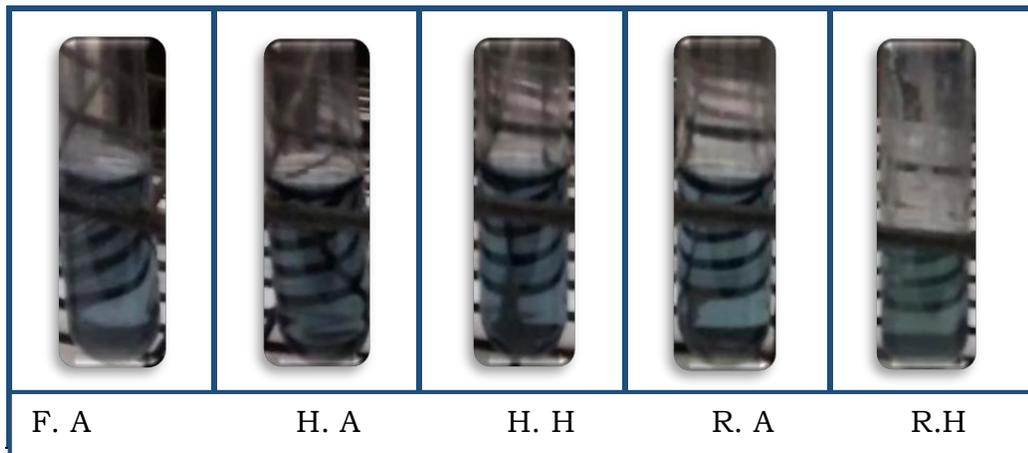
Cumarinas



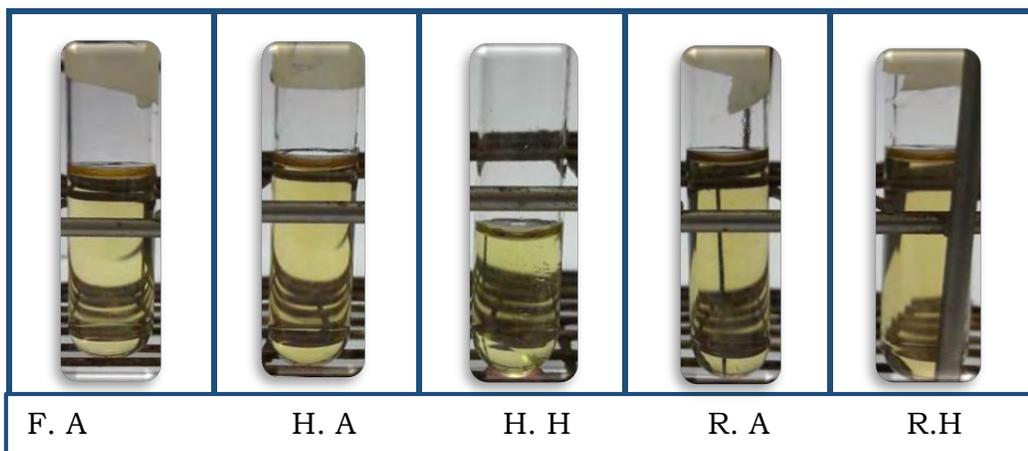
Glucósidos cardiotónicos



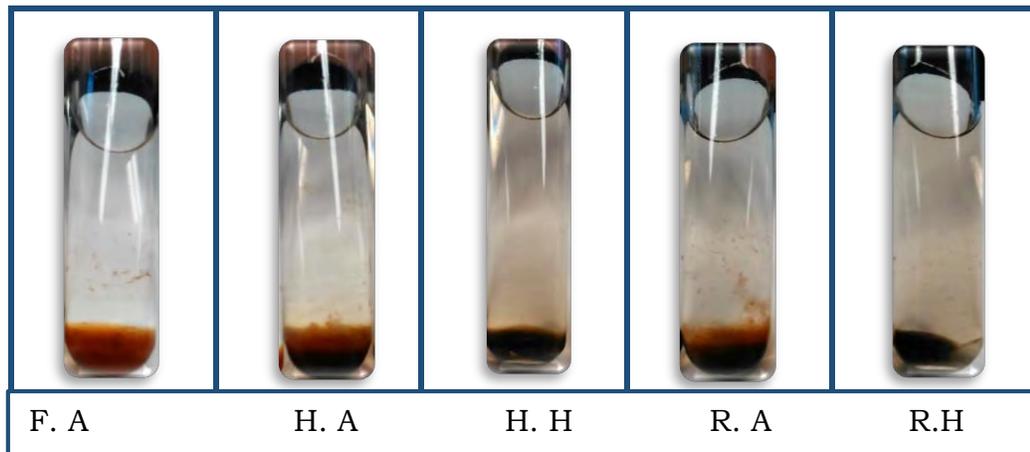
Polifenoles



Saponinas



Esteroides



Taninos

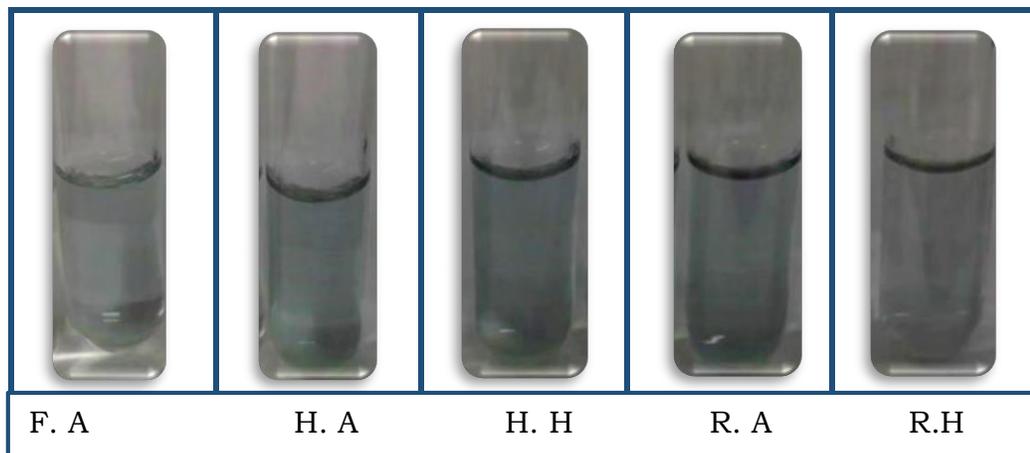


Figura 43. Cuantificación de metabolitos secundarios en extractos acuosos e hidroalcohólicos de *Plantago major*.

En la figura 44 se muestra la distribución y concentración de metabolitos secundarios en diferentes estructuras de *Plantago major*.

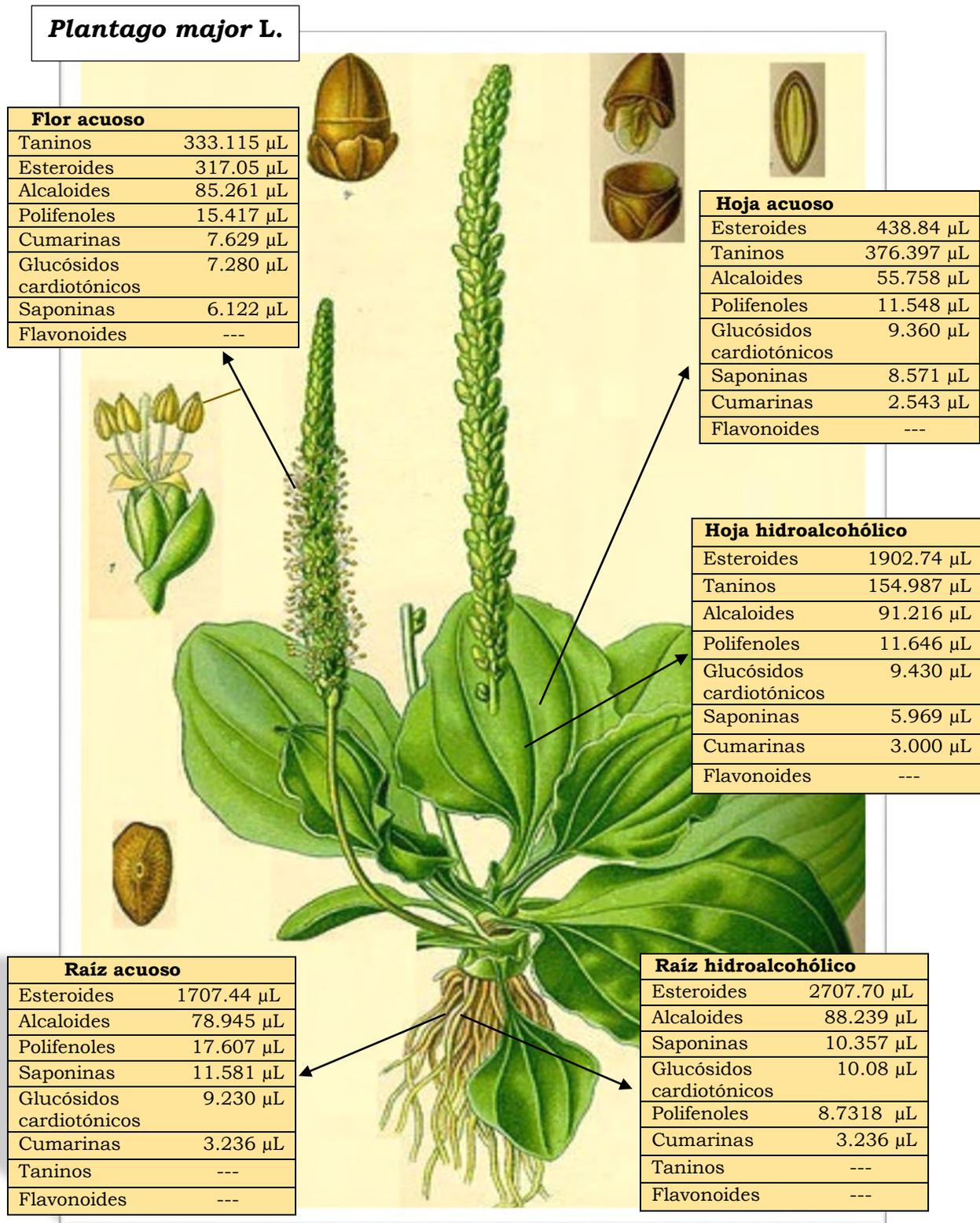


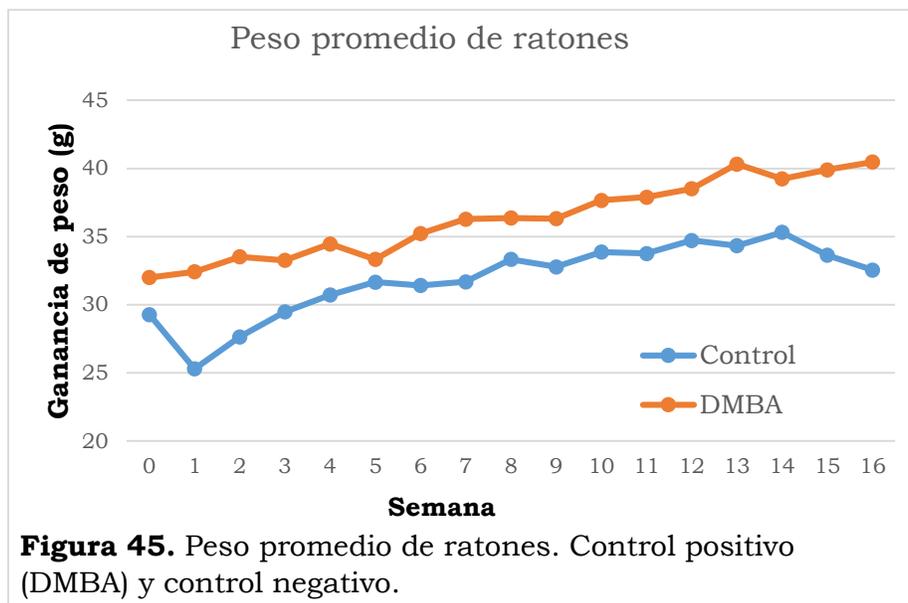
Figura 44. Metabolitos secundarios presentes en *Plantago major*.

9.5 Ganancia promedio de peso

El crecimiento de los animales de experimentación se evaluó mediante el peso corporal, realizando el pesaje de los ratones diariamente. Los datos se obtuvieron a partir del peso promedio de la semana 0-16.

De la semana 0-14 se realizó la inducción con DMBA y de la 15-16 se aplicó el tratamiento con extractos *Plantago major*.

En la figura 45 se observa una diferencia en peso de 5.5 gramos del control positivo (tratado con DMBA) respecto al control negativo.



El grupo inducido con DMBA y tratado con extracto hidroalcohólico de hoja manifestó la mayor ganancia en peso de todos los grupos (Figura 46).

En los grupos inducidos con DMBA y tratados con los distintos extractos (grupo 8, 9 y 10) se observó ganancia en peso, respecto al control positivo, lo que se atribuye al crecimiento anormal de tejido observado (Figura 46).

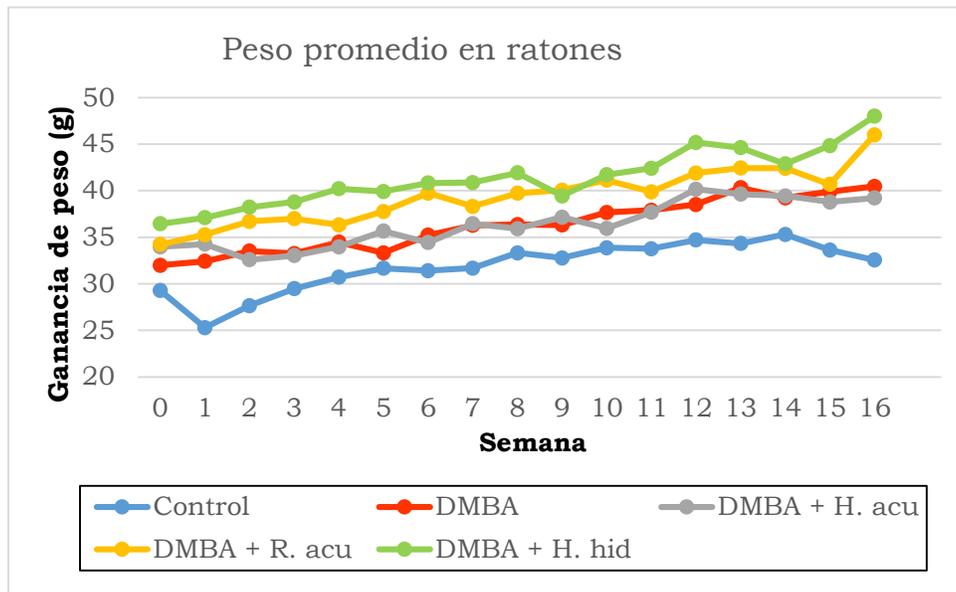


Figura 46. Relación de peso en ratones con diferentes tratamientos. Control negativo, control positivo (DMBA), grupos inducidos con DMBA y tratados con extractos de *Plantago major*. (H. acu: Hoja acuoso, R. acu: raíz acuoso y H. hid: hoja hidroalcohólico).

El grupo con DMBA y tratamiento con extracto acuoso de hoja presentó una ganancia en peso de 3.5 g, al diseccionar los ratones se observó la formación de tumores, uno de ellos situado en la mama superior izquierda (iniciación del cuello), midió 1.9 cm y peso 2 g, presentando tejido graso alrededor de su localización (Figura 47).



Figura 47. Crecimiento de tejido en ratón inducido con DMBA y tratado con extracto acuoso de hoja.

El grupo con DMBA y tratamiento con extracto acuoso de raíz mostró un aumento de peso promedio de 2.7 g, en este grupo solo un ratón presento un crecimiento de tejido que a simple vista era palpable, localizándose en la última mama inferior izquierda con un peso de 2.38 g y una longitud de 2.5 cm. Al momento de la disección, hubo presencia de tejido graso alrededor y de manera notoria, angiogénesis (Figura 48).



Figura 48. Crecimiento de tejido en ratón inducido con DMBA y tratado con extracto acuoso de raíz.

El grupo con DMBA y tratamiento con extracto hidroalcohólico de hoja presentó una ganancia en peso de 3.0 g. Se observa en uno de los ratones crecimiento de tejido en la primer mama superior izquierda, de 2 cm de longitud y peso de 2.9 g, palpable y evidente a simple vista, al momento de extirparlo se observó poca presencia de tejido graso y vascularización en todo el tumor (Figura 49).



Figura 49. Crecimiento de tejido en ratón inducido con DMBA y tratado con hidroalcohólico de hoja (1ro).

Otro ratón del grupo con DMBA y tratamiento hidroalcohólico de hoja presentó crecimiento de tejido evidente a simple vista por el gran tamaño, esta masa se localizó en la primer mama de la parte superior de lado izquierdo, con una longitud de 3.7 cm y un peso de 9.3 g, al momento de la disección, hubo abundante tejido graso y posible angiogénesis (Figura 50).



Figura 50. Crecimiento de tejido en ratón inducido con DMBA y tratado con hidroalcohólico de hoja (2do).

Un tercer ratón de este grupo con DMBA y tratamiento hidroalcohólico de hoja presentó crecimiento de tejido de gran tamaño localizado en la parte inferior (última mama izquierda), con un peso de 10 g y una longitud de 4 cm acompañado de abundante tejido graso y vascularización (Figura 51).

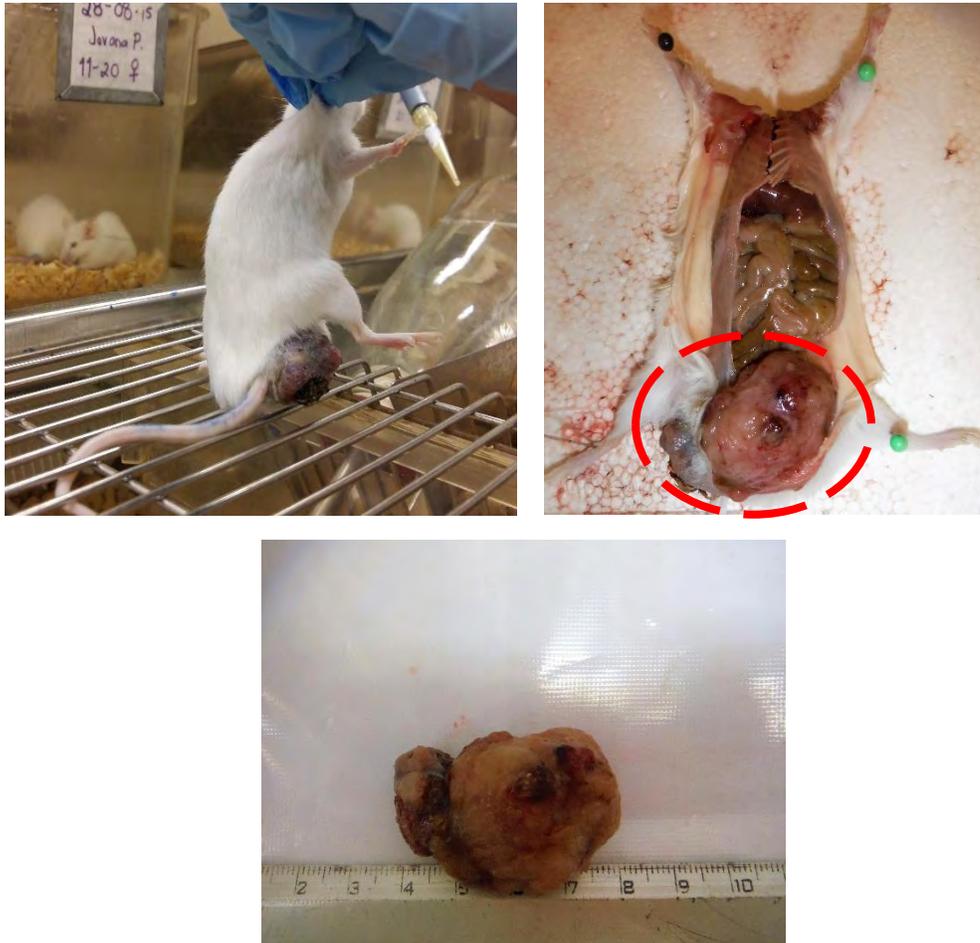


Figura 51. Crecimiento de tejido en ratón inducido con DMBA y tratado con hidroalcohólico de hoja (3er).

9.6 Evaluación de marcadores de estrés oxidante

Cuantificación de nitritos en plasma y homogenado de hígado

La concentración de nitritos en plasma mostró significancia estadística ($p > 0.05$) para dos de los grupos (flor acuoso y hoja hidroalcohólico) con respecto al grupo inducido con DMBA. Sin embargo, se observa que los grupos inducidos con DMBA y tratados con el extracto acuoso de hoja, seguido por el grupo tratado con extracto acuoso de raíz y, por último, el grupo tratado con extracto

hidroalcohólico de hoja muestran una concentración baja de nitritos (Figura 52).

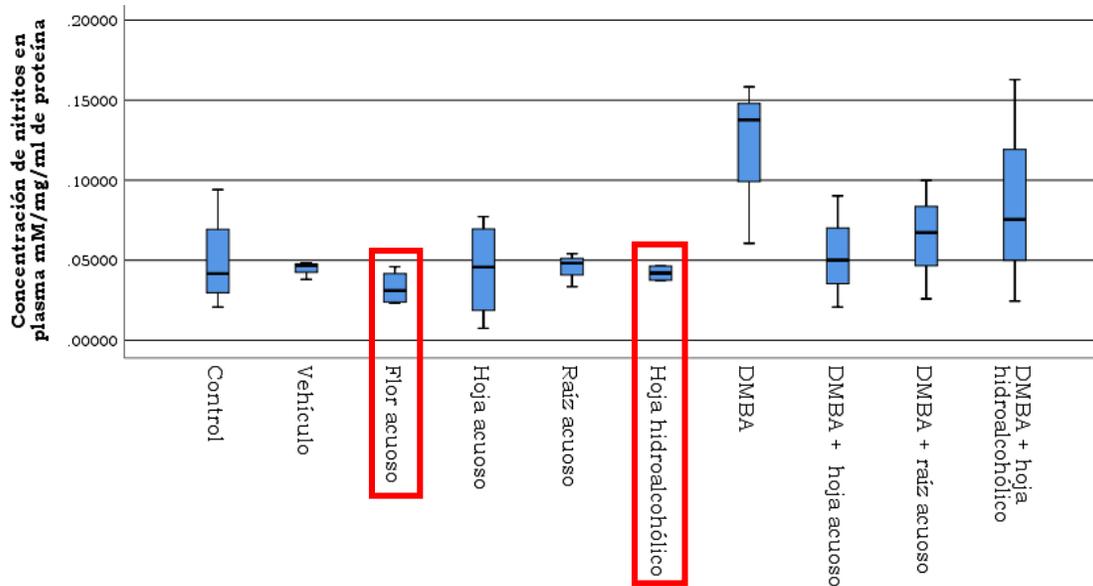


Figura 52. Cuantificación de nitritos en plasma. Concentración en mM/mg sobre concentración de proteína.

El análisis de nitritos en homogenado de hígado fue estadísticamente significativo ($p > 0.05$) para dos de los grupos. El grupo con tratamiento acuoso de raíz sin inductor (DMBA) y grupo con DMBA y tratamiento acuoso de hoja. Por otra parte, se puede observar que los grupos que solo tienen tratamiento (sin inducción con DMBA) acuoso de flor, acuoso de hoja, e hidroalcohólico de hoja muestran una concentración alta de nitritos, siendo hoja hidroalcohólico, el grupo con tratamiento que presenta una mayor concentración de nitritos, con respecto al grupo inducido con DMBA (Figura 53).

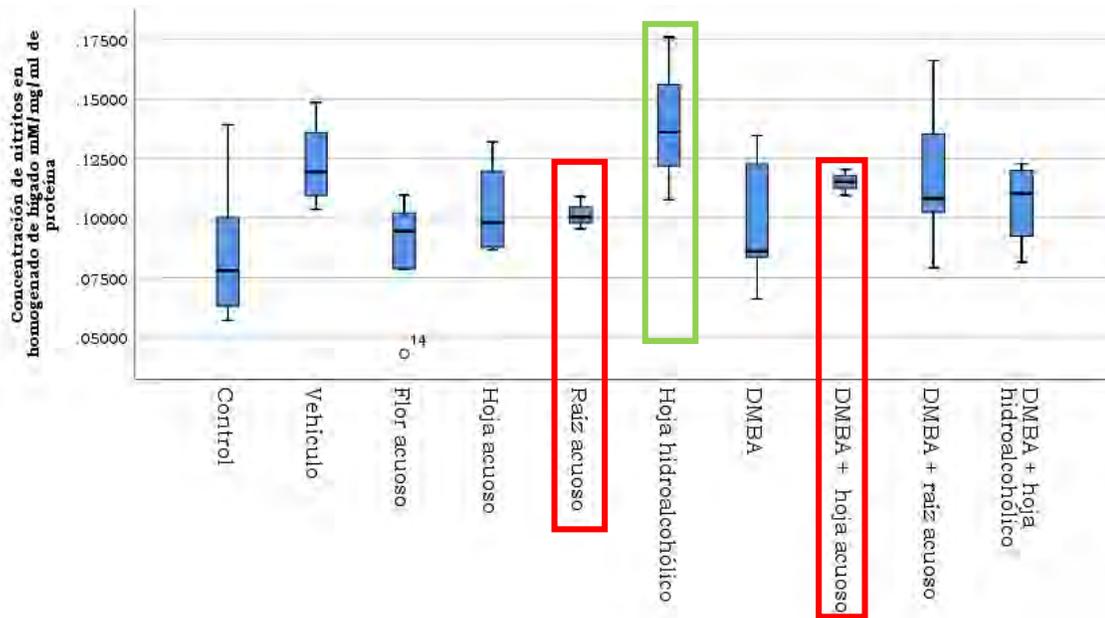


Figura 53. Concentración de nitritos en homogenado de hígado. Concentración en mM/mg sobre concentración de proteína.

Actividad de la enzima catalasa en plasma y homogenado de hígado

Las concentraciones de catalasa en plasma arrojan significancia estadística ($p > 0.05$) para tres de los grupos, el grupo con tratamiento acuoso de hoja, el grupo tratado con acuoso de raíz y el grupo con DMBA y tratamiento acuoso de hoja con respecto al grupo positivo (DMBA).

Por el contrario, el análisis muestra que el grupo inducido (DMBA) y tratado con hidroalcohólico de hoja presento una concentración alta de la actividad de catalasa, mientras que el grupo con DMBA y tratado con acuoso de raíz mantuvo los niveles similares respecto al control positivo, ambos grupos no presentaron significancia estadística (Figura 54).

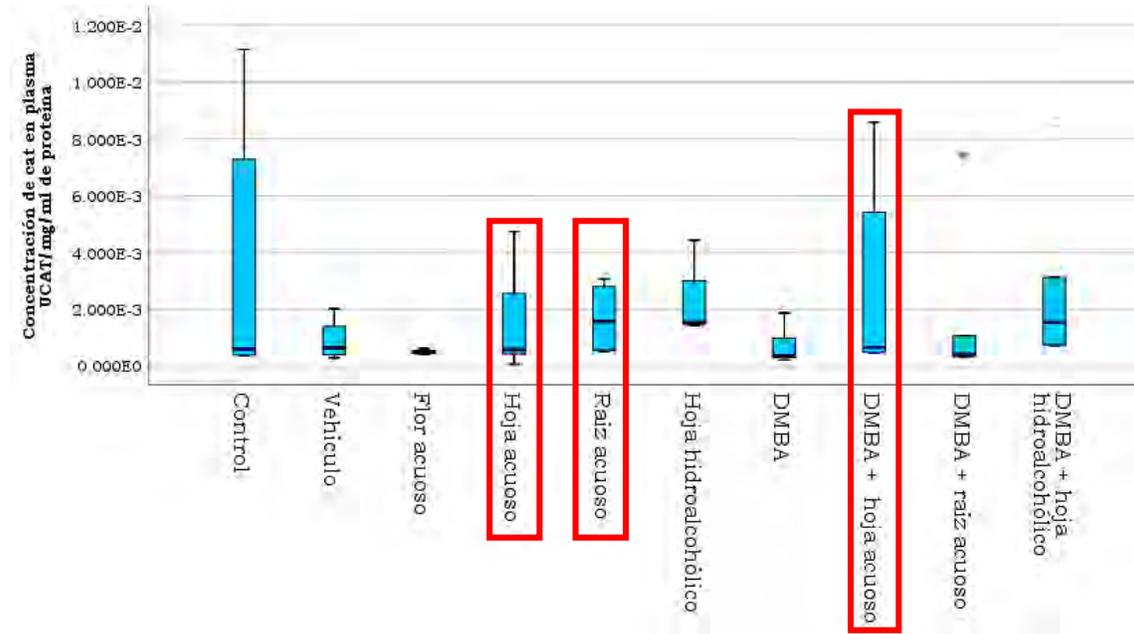


Figura 54. Concentración de la actividad de la catalasa en plasma. Actividad enzimática en UCAT/mg sobre concentración de proteína.

La figura 55, muestra la concentración de la catalasa en homogenado de hígado, se observa que solo dos grupos son estadísticamente significativos ($p > 0.05$) con respecto al control positivo (DMBA), el grupo tratado con extracto hidroalcohólico de hoja y el grupo con DMBA y tratado con acuoso de hoja.

Los grupos con DMBA y tratamiento de extracto acuoso de hoja, acuoso de raíz e hidroalcohólico de hoja muestran una concentración moderadamente alta con respecto al control positivo.

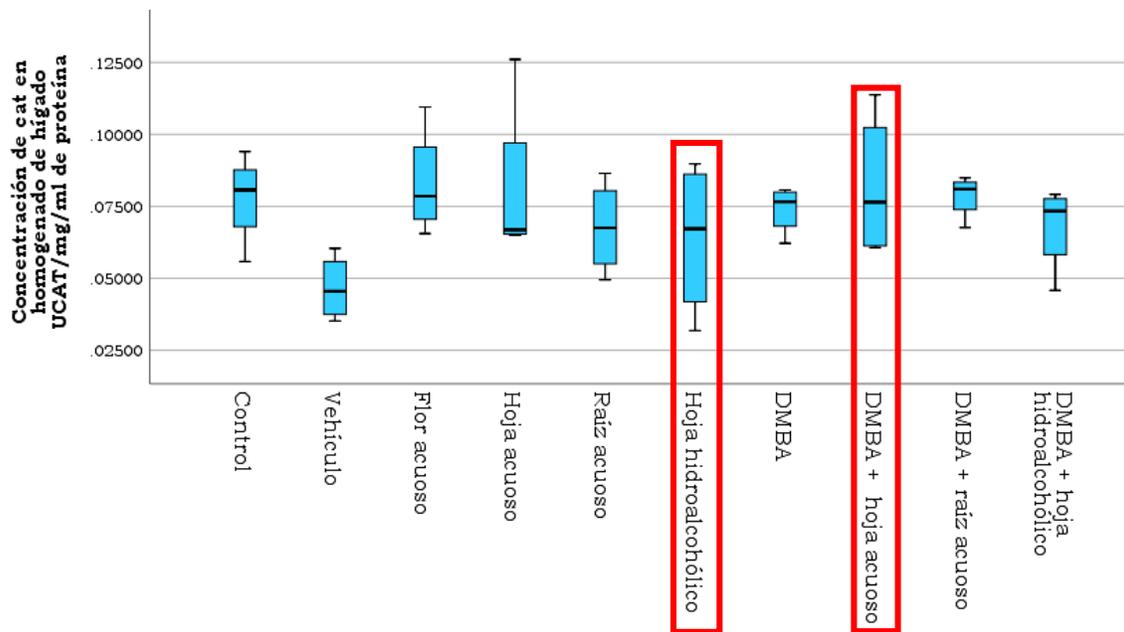


Figura 55. Actividad de catalasa en homogenado de hígado. Actividad enzimática en UCAT/mg sobre concentración de proteína.

Cuantificación de malondialdehído (MDA) en plasma y homogenado de hígado

El análisis en plasma solo mostró diferencia estadística ($p > 0.05$) para el grupo con tratamiento acuoso de raíz, se observa que los grupos con DMBA y tratamiento acuoso de hoja, acuoso de raíz e hidroalcohólico de hoja, muestran una concentración alta de malondialdehído con respecto al control positivo (DMBA) (Figura 56).

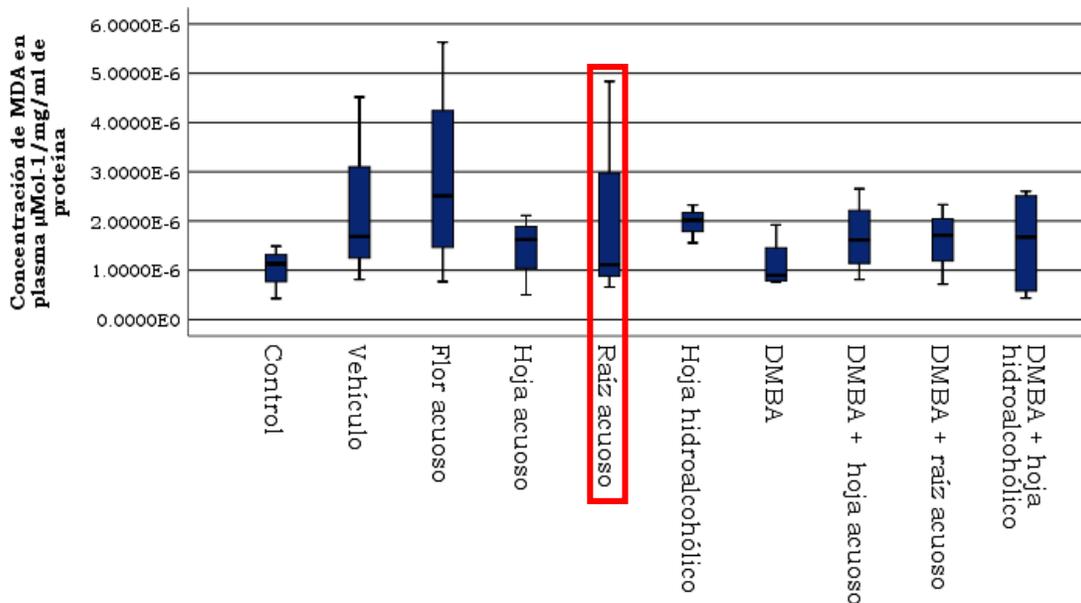


Figura 56. Cuantificación de molondialdehído en plasma. Concentración en $\mu\text{Mol-1/mg}$ sobre concentración de proteína.

Los resultados obtenidos en la cuantificación de malondialdehído en homogenado de hígado no fueron estadísticamente significativos para ninguno de los grupos. Sin embargo, los grupos inducidos con DMBA y tratados con extracto acuoso de raíz e hidroalcohólico de hoja muestran una concentración a la baja de malondialdehído con respecto al control positivo (DMBA) (Figura 57).

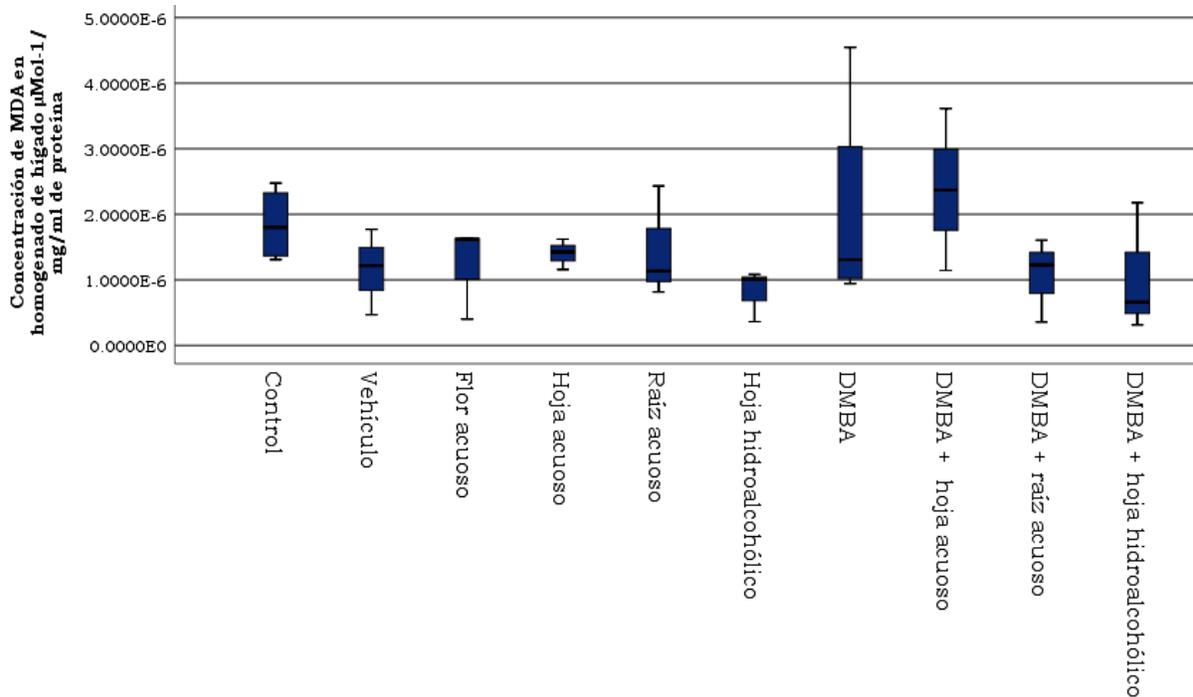


Figura 57. Concentraciones de malondialdehído en homogenado de hígado. Concentración en $\mu\text{Mol-1/mg}$ sobre concentración de proteína.



10. Discusión

Hoy en día el uso de las plantas tiene un papel importante en la medicina alternativa, existen diversos géneros de plantas que contienen compuestos químicos que les confieren múltiples efectos farmacológicos. Diversos estudios han reportado el uso terapéutico de la familia Plantaginaceae (Goncalves y Romano, 2016). Samuelsen (2000) documentó el uso de *Plantago major* en diversos padecimientos como son enfermedades de la piel, en órganos digestivos y respiratorios, problemas de circulación y reproducción, aliviar dolores y contra el cáncer. La medicina tradicional de la UNAM 2017, reporta el uso de *Plantago major* para tratar estas mismas enfermedades y otras más como padecimientos oculares, cicatrizante de heridas, afecciones respiratorias, detención de hemorragias, actividad antiinflamatoria y contra el cáncer, esta última reportada en solo dos estados de México, Puebla y Veracruz.

Acorde a estos reportes, nosotros encontramos que el uso etnobotánico de *Plantago major* realizado en la comunidad de Limón Chiquito, Veracruz, es para tratar síntomas menstruales, inflamación estomacal, dolor estomacal, heridas (inflamación o cicatrización), riñones, diabetes y cáncer de mama. De acuerdo a lo indicado por las entrevistas, se obtuvo la dosis, tiempo del tratamiento y forma de administración de *Plantago major*. La ingesta es en té, empleando una dosis de 5 g por litro de agua y utilizado comúnmente la hoja vegetal por las personas que lo ingieren, oportunamente estos datos fueron necesarios para realizar el estudio.

Diversas contribuciones han sido realizadas para conocer la composición química de *Plantago major*. En el 2017, Bahrain y colaboradores documentan la presencia de metabolitos secundarios como flavonoides, alcaloides, terpenoides, compuestos fenólicos, glucósidos iridoides y vitaminas, sin embargo, su estudio no documenta la presencia de otros grupos de metabolitos secundarios. Hasta ahora los estudios de flor y raíz de *Plantago major* son escasos, en este estudio identificamos la presencia abundante de polifenoles y en menor concentración alcaloides, cumarinas, glucósidos cardiotónicos y esteroides, seguida de saponinas y taninos en el extracto acuoso de flor. Caro (2013), documenta la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides y taninos en extracto acuoso de hoja, por el contrario, nosotros identificamos en el extracto acuoso de hoja la presencia abundante de glucósidos cardiotónicos, presencia moderada de cumarinas y polifenoles, y poca presencia de alcaloides, esteroides y taninos. Para el extracto acuoso de raíz hay presencia abundante de polifenoles, presencia moderada de cumarinas y esteroides y poca presencia de alcaloides, glucósidos cardiotónicos y taninos, estos dos últimos extractos no presentaron saponinas. Para el extracto hidroalcohólico de hoja hubo presencia abundante de glucósidos cardiotónicos, polifenoles y esteroides, presencia moderada de alcaloides y poca presencia de cumarinas y saponinas, no hubo presencia de taninos, y para el extracto hidroalcohólico de raíz hubo presencia moderada de cumarinas, saponinas y esteroides, poca presencia de



alcaloides y glucósidos cardiotónicos, no hubo presencia de polifenoles y taninos. Por lo que la contribución de este estudio está referida a la presencia de saponinas, saponinas esteroidales, glucósidos cardiotónicos y cumarinas en estructuras como flor y raíz en los diferentes extractos realizados de *Plantago major*.

Es importante resaltar que la presencia de flavonoides en *Plantago major*, ha sido reportada. Redrobán (2012), Caro (2013) y Ahmed *et al.*, (2015), documentaron el uso de diferentes pruebas de identificación como es cromatografía en capa fina, espectrofotometría y pruebas de coloración (Shinoda), en diferentes extractos (acuoso de hoja, hidroalcohólico de planta completa y metanólico de partes aéreas permitió la identificación de este metabolito, sin embargo en nuestro estudio, no logramos identificar flavonoides en ningún extracto utilizando la prueba Shinoda, considerando que el tipo de extracción pudo influir en este resultado, posiblemente a que su molécula se oxida con facilidad.

Las pruebas coloridas de identificación que indican ausencia de algún grupo de metabolito secundario no comprueban definitivamente la inexistencia de dicho grupo de metabolito, ya que se debe tener en cuenta la sensibilidad de la prueba para caracterizar pequeñas concentraciones de sustancia o interferencia de otros compuestos en la reacción de reconocimiento. Por otro lado, la ausencia de flavonoides también puede variar por factores climáticos y edáficos de una región, no solo afectando el crecimiento y desarrollo de la planta, si no también incidiendo en la biosíntesis de sus principios activos (Palacios, 2013). Aunque la procedencia de *Plantago major* es de clima cálido con radiaciones solares altas (4-4.9 kWh/m²), no encontramos la presencia de flavonoides, Garrido, Ortiz y Pozo (2013) mencionan que los flavonoides absorben radiación UV como mecanismo de protección de la planta en condiciones climáticas de extrema aridez y fuerte radiación solar. Aunque su contenido también puede variar debido a razones genéticas y ambientales (Schlaepfer y Mendoza, 2010).

En épocas recientes ha surgido el interés por la medicina alternativa. Las plantas han sido y seguirán siendo una alternativa en la búsqueda de nuevas estructuras químicas o compuestos que sirvan de base para el desarrollo de nuevos fármacos (Schlaepfer y Mendoza, 2010). El estudio etnobotánico permite conocer nuevas moléculas con potencial farmacológico, que sean factibles de utilizarse en distintos padecimientos (Schlaepfer y Mendoza, 2010). *Plantago major* puede ser una opción en la búsqueda de fármacos que ayuden a combatir enfermedades como es el cáncer de mama, sin olvidar que puede causar algunos problemas de salud si la dosis no es la adecuada.

En la cuantificación de azúcares totales de *Plantago major* por el método Fenol-Sulfúrico, se consideró que, las principales rutas de biosíntesis de los metabolitos secundarios derivan del metabolismo primario (Avalos y Pérez, 2009). De acuerdo al análisis fitoquímico la presencia de metabolitos secundarios en cada extracto de la planta tiene estrecha relación con la



concentración cualitativa de azúcares totales. Garro y Alvarenga (2009) reportan que los carbohidratos presentes en *Plantago major* son glucosa, fructuosa, ramnosa, xilosa, sacarosa y planteosa, esta última actuando como carbohidrato de reserva en la semilla y la rafinosa en hoja. En este estudio encontramos que la mayor concentración de azúcares se encuentra en el extracto acuoso de raíz, lo que concuerda con la concentración de polifenoles. Estos metabolitos provienen de la biosíntesis de la glucosa, compuesto formado por la ruta del ácido shikímico y la síntesis de los ácidos cinámicos (Quiñones, 2012).

El extracto hidroalcohólico de hoja presentó la mayor concentración de alcaloides (91.216 µg/mL) de todos extractos, este metabolito es derivado de la ruta del ácido shikímico y puede estar presente en toda la planta, acumulándose en las partes aéreas, mayormente en las hojas (Arango, 2008).

El extracto acuoso de flor tuvo una concentración de cumarinas de (7.629 µg/mL) este compuesto es derivado de la glucosa y sintetizado por la ruta del ácido cinámico (Correia, 2013).

La máxima concentración de saponinas (10.357 µg/mL) y saponinas esteroideas (2707.70 µg/mL) fue para el extracto hidroalcohólico de raíz, las saponinas son derivados de la glucosa y biosintetizadas por el ácido mevalónico (Marcano y Hasegawa, 2002). Esto también puede atribuirse al carácter monodesmosídico de las saponinas ya que poseen cadenas de azúcar en su estructura (Transito, 2001).

La mayor concentración de taninos (376.396 µg/mL) fue para el extracto acuoso de hoja, estos metabolitos son compuestos fenólicos derivados de la ruta del ácido shikímico. Alvares y Lock (1992), menciona que los taninos pueden estar presentes en todos los órganos vegetales. Cuando existe una concentración considerable de taninos suelen hallarse en determinadas partes como son las hojas.

Solo el 10% de las plantas superiores han sido analizadas farmacológicamente, algunas están estrechamente relacionadas en afecciones como el cáncer (Schlaepfer y Mendoza, 2010).

La inducción de cáncer mamario en nuestro estudio revelo la presencia de tumoraciones en distintas partes del ratón. Un 20 % de ratones mostró crecimiento de tejido, cabe señalar que las tumoraciones fueron de gran tamaño lo que concuerda con el mecanismo de inducción de DMBA. Este hecho se corrobora con los estudios realizados por Barros *et al.*, (2004) y Thompson y Adlakha (1991), donde mencionan que los tumores mamarios inducidos con DMBA no hacen metástasis, pero pueden llegar a ocasionar la muerte del huésped, al alcanzar un tamaño e invadir tejidos adyacentes. Cos (1986) reportó que la inducción de cáncer de mama en roedores (ratas hembras Sprague-Dawley), la dosis optima es 20 mg/100-130 g teniendo una incidencia aproximada del 100%, comenzando a ser agresivo debido a los efectos tóxicos del DMBA. Nuestro modelo utilizado evidenció una incidencia baja, sin



embargo, un estudio realizado por Abba y colaboradores en el 2016, documentan que la mayoría de las cepas de ratones son mucho más resistentes que las ratas a la inducción de carcinogénesis, pues estos requieren de dosis múltiples de DMBA para alcanzar una incidencia favorable.

Efecto de extractos acuosos e hidroalcohólicos en la concentración de nitritos en plasma

La concentración de nitritos en plasma disminuye en presencia de los extractos (hidroalcohólico de raíz y acuosos de hoja y raíz) esto puede ser atribuido a la cantidad de saponinas esteroidales cuantificadas en los extractos. El extracto acuoso de hoja obtuvo una concentración de 438.84 $\mu\text{g/mL}$, el extracto acuoso de raíz 1902.74 $\mu\text{g/mL}$ y el extracto hidroalcohólico de hoja presentó la mayor concentración de saponinas esteroidales 2707.70 $\mu\text{g/mL}$. Las saponinas están relacionadas con efectos antiinflamatorios, antivirales, antifúngicos, antibacteriales y anticancerígenos. Algunas saponinas (oleananos) han mostrado efecto antitumoral, presentando efectos quimiopreventivos y antimetástasicos. Se conoce que también presentan actividades inmunoestimulantes, como el crecimiento de linfocitos T humanos, promoviendo la apoptosis y desencadenando a las células a la autofagia (Bazile, Bertero y Nieto, 2014). Las saponinas esteroidales presentan actividad antitumoral contra el cáncer de colon, pulmón y mama (Fernández *et al.*, 2015). Es importante señalar que no existen reportes de presencia de saponinas para *Plantago major*, sin embargo, su actividad antiinflamatoria ha sido reportada (Goncalves y Romano, 2016).

Efecto de extractos acuosos e hidroalcohólicos en la concentración de nitritos en hígado

La concentración de óxido nítrico en hígado mostró un incremento en todos los grupos tratados con los extractos. Cabe resaltar que en el extracto hidroalcohólico de hoja se observa la máxima concentración de nitritos lo que concuerda con la segunda concentración de saponinas esteroidales más alta en los extractos (1902.74 $\mu\text{g/mL}$). De la misma forma, todos los grupos inducidos con DMBA y tratados con extracto de *Plantago major* (grupo 8, 9 y 10) evidenciaron mayor concentración de nitritos respecto al control positivo. El óxido nítrico es una molécula de señalización de suma importancia presente en los tejidos de los seres humanos, la síntesis de dicha molécula ayuda a diversos procesos como la vasodilatación, expresión de células musculares lisas vasculares, efecto antiagregante plaquetario y evita la adhesión leucocitaria local (Lee *et al.*, 2008). Cuando existe aumento en la generación de óxido nítrico, como en el caso de cáncer de mama, hay mayor riesgo debido a la alta incidencia de electrones desapareados que se están produciendo, capaces de reaccionar con el oxígeno molecular (O_2) generando oxidantes reactivos como el



dióxido de nitrógeno (NO_2) que puede desencadenar daño en la membrana (lipoperoxidación) y el trióxido de dinitrógeno (N_2O_3) que puede reaccionar con tioles o aminas, alterando proteínas y formando nitrosaminas carcinógenas, causando daño en las bases de ADN (Saavedra *et al.*, 2004).

Efecto de extractos acuosos e hidroalcohólicos en la actividad enzimática en plasma

En plasma, el análisis estadístico de la actividad de la catalasa mostró significancia estadística para tres de los grupos, el grupo tratado con extracto de hoja acuoso, el tratado con extracto de raíz acuoso y el grupo inducido (DMBA) y tratado con hoja acuoso con respecto al control positivo.

El efecto de los extractos en la actividad catalítica de la enzima, puede atribuirse a la presencia de taninos y/o polifenoles de *Plantago major*. La concentración de taninos fue la segunda más alta obtenida (332.115 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en acuoso de flor, 376.397 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en acuoso de hoja y 154.987 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en hidroalcohólico de hoja). Los taninos pueden neutralizar especies reactivas como el superóxido y el radical hidroxilo, ayudando a disminuir la peroxidación lipídica en la membrana celular (Vázquez *et al.*, 2012). Diversos estudios señalan que estos metabolitos son buenos secuestradores de radicales libres, inhibiendo la oxidación de tejidos, actuando mejor que la vitamina C, vitamina E y β -caroteno. *In vitro* neutralizan el radical hidroxilo actúan como inhibidores no competitivos de la enzima xantina oxidasa, esta enzima es una de las mayores generadoras de radicales libres en el metabolismo celular (Vázquez *et al.*, 2012). El peróxido de hidrógeno actúa como segundo mensajero en la transducción de señales para la activación, diferenciación y proliferación celular. En un ambiente con un nivel reducido de peróxido se estimula la proliferación, sin embargo, un ligero cambio hacia un ambiente oxidado induce apoptosis o necrosis celular (Maldonado *et al.*, 2010).

Efecto de extractos acuosos e hidroalcohólicos en la actividad enzimática en hígado

La actividad de catalasa en hígado se vio incrementada en los grupos inducidos con DMBA y tratados con extractos acuosos de hoja y raíz y hoja hidroalcohólico (Figura 57). Esta respuesta puede atribuirse a la presencia de compuestos cumarínicos, estos metabolitos presentan actividad anticancerígena y antioxidante, su efecto anticancerígeno se atribuye al anillo cumarínico que poseen, lo que les permite actuar como intercalantes en el ADN (Vidal, 2012). Algunos estudios en pacientes de cáncer avanzado muestran la actividad de las cumarinas como inmunoestimulantes y citotóxica (Vidal, 2012). Es importante resaltar que la actividad enzimática de catalasa también se incrementó con respecto al control en los grupos sin inducción, esto puede ser debido a la rápida metabolización de las cumarinas a nivel hepático (Vidal,



2012). Así mismo algunas cumarinas (anatoxinas) pueden ser tóxicas dependiendo de su concentración (Vidal, 2012). Por otro lado, el incremento en la actividad catalítica de la enzima en los grupos sin inducción con DMBA y tratados con extractos acuosos de hoja, flor y raíz y hoja hidroalcohólico, puede atribuirse a la presencia de alcaloides, estos metabolitos pueden causar daño en hígado a través de la generación de radicales libres (Pan American Health Organization, 1995).

Efecto de extractos acuosos e hidroalcohólicos en la peroxidación lipídica en plasma

La mayor concentración de malondialdehído se observó en respuesta al extracto acuoso de flor, este incremento correlaciona con la concentración de taninos presente en este extracto, esto puede deberse al efecto prooxidante de estos metabolitos, posiblemente por la oxidación de taninos (Vázquez *et al.*, 2012)

Los metabolitos secundarios exhiben diversos mecanismos de acción a nivel celular que pueden contrarrestar o aumentar el estrés oxidante actuando de diferente manera en los organismos (Fernández *et al.*, 2015). Los radicales libres oxidan los fosfolípidos de la membrana debido a que son extremadamente sensibles al ataque de radicales, el mecanismo por el cual los lípidos de membrana son dañados por estos radicales libres se denomina peroxidación lipídica. Este proceso produce generalmente hidroperóxidos, 4-hidroxinonenal (4-HNE) y aldehídos como el malondialdehído (MDA), descrito como el producto más mutágeno (González *et al.*, 2000).

Efecto de extractos acuosos e hidroalcohólicos en la peroxidación lipídica en hígado

La concentración de malondialdehído en hígado mostró una concentración baja en los grupos que fueron inducidos con DMBA y tratados con los extractos acuosos de hoja y raíz y de hoja hidroalcohólico respecto al control positivo. Esta respuesta favorable en un proceso de cáncer de mama en ratón correlaciona con la concentración de polifenoles en los extractos, estos metabolitos presentan alta capacidad antioxidante (Cuadro 14).

Las propiedades antioxidantes de los polifenoles justifican sus acciones vasodilatadoras, vasoprotectoras, antitrombóticas, antilipémicas, antiateroscleróticas, antiinflamatorias y antiapoptóticas (Quiñones y Aleixandre, 2012). La acción de los compuestos fenólicos está relacionada con su capacidad de quelar metales, ya sea manteniendo o incrementando su actividad catalítica (Porrás y López, 2009). Son capaces de neutralizar especies reactivas de oxígeno como superóxido, peróxido de hidrógeno y ácido hipocloroso, así como la inhibición de enzimas como la xantina oxidasa, la



nicotinamida-adenina dinucleotido fosfato (NADPH), generadoras de dichas especies (Quiñones y Aleixandre, 2012). Estudios realizados en animales y en ensayos clínicos demuestran que los polifenoles disminuyen los niveles de malondialdehído (Quiñones y Aleixandre, 2012).

Algunos estudios se han centrado en la biodisponibilidad de los polifenoles mediante estudios *in vivo* de su ingesta y excreción, muchos de estos son formados vía degradación por las enzimas de las bacterias presentes en el colon, para después ser metabolizadas en el hígado (Porras y López, 2009). La biodisponibilidad de los polifenoles depende de su estructura química y de las reacciones metabólicas que experimentan tras la ingestión de estos.

Los polifenoles interfieren en distintas etapas en el desarrollo de una neoplasia, protegiendo al ADN del daño oxidativo, inactivando los carcinógenos e inhibiendo los genes mutagénicos de la actividad de las enzimas encargadas de la activación de carcinógenos (Porras y López, 2009).

Ciertos productos finales como la degradación de peróxido de hidrógeno, nitritos y malondialdehído son respuesta de la interacción de ERO y ERN con macromoléculas como el ADN, proteínas, lípidos y antioxidantes, dando prueba de la existencia de especies reactivas en las células (Mañón *et al.*, 2016). En consecuencia, los radicales libres suscitan interés por su papel dual que ejercen en los sistemas biológicos y en el desarrollo de ciertas enfermedades. La exposición constante a fuentes generadoras de radicales libres que desencadenan un desajuste en el organismo producen estrés oxidante que, a su vez, puede generar serios problemas a nivel celular, como es el cáncer de mama (Viñas *et al.*, 2012). Hoy en día los metabolitos secundarios tienen varios matices, muchos de ellos actúan como mecanismos de defensa presentando actividad antibacteriana, antioxidante, anticancerígena, entre otras (Almaraz *et al.*, 2006). Siendo un factor importante el aporte correcto nutricional que se ve afectado en personas que padecen cáncer, provocando un déficit de vitaminas y antioxidantes que compensen la producción de radicales libres (Viñas *et al.*, 2012). Estudios epidemiológicos señalan una menor incidencia tumoral en poblaciones que consumen alimentos ricos en antioxidantes (Maldonado *et al.*, 2010).



11. Conclusiones

- La entrevista etnobotánica realizada en Limón Chiquito, Veracruz, precisa el uso de *Plantago major* para tratar diferentes afecciones otorgando a la hoja propiedades medicinales.
- Cumarinas, glucósidos cardiotónicos, saponinas, saponinas esteroidales y taninos son los grupos de metabolitos secundarios presentes en estructuras como flor y raíz de *Plantago major*. Que no han sido documentados.
- No hubo presencia de flavonoides en *Plantago major*, a pesar de que las fuentes consultadas refieren lo contrario.
- El grupo de saponias esteroidales manifestaron la concentración más alta de metabolitos secundarios cuantificados en *Plantago major*, como segundo lugar los taninos y en tercer lugar los alcaloides.
- Se obtuvo una incidencia del 20 % de masas anormales de células en ratones (CD₁) inducidos con DMBA.
- *P. major* (extracto de hoja hidroalcohólico, raíz y hoja acuoso) redujo la concentración de nitritos en plasma.
- *P. major* (extracto hoja acuoso e hidroalcohólico) elevo la actividad catalítica de catalasa en plasma e hígado.
- *P. major* (extracto de hoja hidroalcohólico y raíz acuosa) redujo la concentración de malondialdehído en hígado.
- *Plantago major* es una herbácea que tiene moléculas con propiedades antioxidantes como polifenoles, cumarinas, taninos, saponinas y saponinas esteroidales que participan en la regulación de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno durante un proceso inducido de cáncer de mama.



12. Referencias

- Abba, M., Zhong, Y., Lee, J., Kil, H., Lu, Y., Takata, Y., Simper S., Gaddis, S., Shen, J., & Aldaz, M. (2016). DMBA induced mouse mammary tumors display high incidence of activating *Pik3ca*^{H1047} and loss of function *Pten* mutations. *Oncotarget*. Vol. 7(39). 64289-64294.
- Abrego, C. & Honles, J. (2012). *Identificación, cuantificación y determinación de la actividad citotóxica de los glucósidos cardiotónicos procedentes de las raíces y flores de Plumeria rubra (flor de mayo), Stemmadenia donell-smithii (cojon de puerco) y Thevetia ahouia (cojon de costa de hojas largas) de la familia apocynaceae.* (Tesis de licenciatura). Universidad del Salvador. Facultad de Química y Farmacia. San Salvador, El salvador. 110-111,131-142.
- Adarmes, H., Solís, P., Müller, A. & Galleguillos, M. (2009). Determinación de nitrito como metabolito estable del óxido nítrico en el líquido sinovial de articulación metacarpofalángica equina. *Medica Veterinaria*. (41). 255-259.
- Aebi, H. (1984). Catalase *in Vitro*. Methodos in enzymology. *ELSEVIER*. Vol. 105. 121-126.
- Aguilar, L. & Durán, C. (2011). Química recreativa con agua oxigenada. *Revista Eureka sobre Enseñanza y Divulgación de las Ciencias*. (8). 226-253.
- Ahmed, M., Abd, E., Mashaly, A., Mohamed, E., Abu, Z. & Deweeb, R. (2015). Phytotoxicity of three *Plantago* species on germination and seedling growth of hairy beggarticks (*Bidens pilosa* L.). *Egyptan Journal of basic and applied Sciences*. (2). 303-309.
- Almaraz, N., Ávila, J., Delgado, A., Naranjo, N. & Herrera, J. (2006). El metabolismo secundario de las plantas, un nuevo concepto. Recuperado de <http://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/123456789/8292/1/METABOLISMO%20SECUNDARIO-ALMARAZ.pdf>
- Álvarez, A. & Lock, O. (1992). Taninos. *Revista de Química*. Vol. 6(1). 47-57.
- Álvarez, R. (2016). Ruta del ácido shikímico, Recuperado de <https://es.slideshare.net/xiuhts/ruta-del-acido-shikimico-59143234>
- Amaringo, F., Hormaza, A. & Arias, M. (2011). Thevetin B: glucósido cardiotónico predominante en *Thevetia peruviana*. *Scientia et Technica Año XVI*. (49). 209-302.
- Anaya, A. & Espinosa, F. (2006). La química que entreteje a los seres vivos. *Ciencias*. (83). 4-12.
- Arango, J. (2008). *Alcaloides y compuestos nitrogenados*. (Tesis licenciatura) Universidad de Antioquia, Medellín. 4-6.
- Archer, S. (1993). Measurement of nitric oxide in biological models. The FASEB (Federation on American Societies for Experimental Biology) *Journal*. Vol.7 (2). 349-351.
- Arroyo, J., Bonilla, P., Ráez, E., Barreda, A. & Huamán, O. (2010). Efecto quimioprotector de *Bidens pilosa* en el cáncer de mama inducido en ratas. *Facultad de Medicina*. Vol.71(3) 153-159.
- Ávalos, A. & Pérez, C. (2009). Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). *Serie Fisiología Vegetal*. Vol. 2(3) p.119-122. Recuperado de https://eprints.ucm.es/9603/1/Metabolismo_secundario_de_plantas.pdf



- Bahrain, M., Taher M., Mutalabisim, F., Shahreen, M., Abdul, M., Wan, S., Sengupta, P. & Susanti. D. (2017). Chemical constituents and medical benefits of *Plantago major*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. (96).348-369.
- Barbosa, B., Bressan, J., Zulet, M. & Martínez, J. (2008). Influencia de la dieta sobre marcadores plasmáticos de estrés oxidativo en humanos. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. Vol. 31(3). 259-277.
- Barja, G. (1997). Radicales libres y antioxidantes. Recuperado de <http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/view/367/384>.
- Barros, C., Muranaka E., Jo, L., Pelizon, H., Iriya, K., Giocondo, G. & Pinotti, J. (2004). Induction of experimental mammary carcinogenesis in rats with 7,12-dimetilbenz(a)antraceno. *Hosp. Clín. Fac. Sau Paulo*. Vol. 59(5). 257-260.
- Bazile, D., Bertero, D. & Nieto, C. (2014). Cap.III. Jacobo Trois. Estado del arte de la Quinoa en el mundo 2013. *Saponinas*. (pp. 317-327.) Montpellier, Francia. FAO.
- Benezzer, M., Castro, E. & García E. (2008). La producción de especies reactivas de oxígeno durante la expresión de la resistencia a enfermedades en plantas. *Revista mexicana de fitopatología*. Vol. 26(1). 56-58.
- Blanco, B., Saborío, A. & Garro, G. (2008). Descripción anatómica, propiedades medicinales y uso potencial de *Plantago major* (llantén mayor). *Tecnología en Marcha*. Vol. 21(2). 17-24.
- Bravo, M. & Jiménez, G. (2011). *Estimación del periodo de conservación de plantas medicinales en fundas de papel a través de la cuantificación de compuestos fenólicos*. (Tesis de licenciatura). Universidad de Cuenca. Ecuador. 52,65-68.
- Brown, S. & Bicknel, R. (2001). Hypoxia and oxidative stress in breast cancer, Oxidative stress: its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer. *Breast cancer*. Vol. 3(5). 323-325.
- Cadahia, E. (1995). *Estudio de la composición tánica de madera, corteza y hojas de Eucalyptus camaldulensis, E. Globulus y E.Rudis*. (Tesis doctoral). Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. Madrid. (25), 76-77.
- Cárdena, J., Bargalló, E., Erazo, A., Maafs, E. & Poitevin, A. (2013). Consenso mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario. Recuperado de <http://incan-mexico.org/incan/docs/docencia/cmama.pdf>.
- Caro, D. (2013). *Evaluación in vivo del efecto ansiolítico de los extractos acuosos obtenidos del Plantago major L. (llantén) y de la Mentha viridis L. (yerbabuena)*. (Tesis licenciatura). Universidad de Cartagena. Cartagena de Indias
- Carulla J. & Pabón L. M. (2004). Un sistema in vitro para evaluar los efectos de los taninos en la degradación de la proteína bajo condiciones ruminales y abomasales. *Taninos en la Nutrición de Rumiantes en Colombia* (pp. 15-16) Colombia. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Carvajal, L., Hata, Y., Sierra, N. & Rueda, D. (2009). Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de cupatá (*Strychnos schultesiana krukoff*). *Revista Colombiana Forestal*. Vol. 12. 161-170.



- Carvalho, A. & Seferin, L. (2004). Determinación de cumarina en extracto fluido y tintura de guaco por espectrofotometría derivada de primer orden. *Revista Brasileña de ciencias farmacéuticas*. Vol. 4(4). 481-485.
- Castañeda, B., Manrique R., Ibáñez, L., Fujita, A. & Barnett, M. (2008). Estudio fitoquímico y farmacológico de 4 plantas con efecto hipoglicemiante. *Cultura*. Vol. 8(1). 33-41.
- Castro, L., Ortega, A. & Lozada, J. (2015). Modificaciones enzimáticas de compuestos fenólicos. *Temas selectos de ingeniería y alimentos*. Vol. 9(1). 5-11.
- Castro, M. & Gonzáles, A. (2008). Papel ecológico de los metabolitos secundarios. Lacandonia. *Revista de Ciencias de la UNICACH*. Vol. 2(1). 123-128.
- Clapés, S., Rojo, D., Suarez, G., Fernández, T., Rodríguez, O., Pérez, C., de la Rosa, M., Rodríguez, A. & Acosta, T. (2012). Marcadores de estrés oxidativo en gestantes con adiposidad y su relación con la salud de los recién nacido. *Cuba Salud*. (10). 1-13.
- Constanza, L. & Muñoz, M. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Ciencias Biomédicas*. Vol. 10(18). 215-223.
- Correia, M. (2013). *Cumarinas: versatilidad estructural y aplicaciones en Química Farmacéutica*. (Tesis doctoral). Universidad de Santiago de Compostela. Porto, Portugal.
- Cortés, J., Aguilera, A., Higareda, A., Beltrám, E. & Pardo, M. (2009). Inducción de cáncer en rata wistar (*Rattus Norvegicus*) mediante el uso de Dimetilbenzo(a) antraceno. *Revista TREMENS*. Vol. 1(1). 11-17.
- Cos, S. (1986). *Estudio experimental sobre la influencia de las hormonas pineales en la génesis y desarrollo de tumores mamarios hormonodependientes*. (Tesis doctoral). Universidad de Santander. Bogotá, Colombia.
- Costa, I. (2014). *Caracterización y validación morfológica y molecular de los tumores mamarios experimentales*. (Tesis doctoral) Universidad Autónoma de Barcelona, España. 39-41.
- Cruz, C. y 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*. Vol. 33(8). 361-387.
- Cruz, J. (2007). *Más de 100 plantas medicinales*. (1ra edición). Las Palmas de Gran Canaria, España. (pp. 28-29). Grupo ANAYA S.A
- Dardon, V. & Duran M. (2011). *Cuantificación espectrofotométrica de taninos y análisis bromatológico proximal de cuatro diferentes mezclas de forrajes a base de gramíneas y leguminosas*. (Tesis de licenciatura). Universidad del Salvador. San Salvador, El Salvador.
- Delgado, L., Betanzos, G. & Sumaya, M., (2010). Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. *Investigación y Ciencia*. (50).10-15.
- Delporte, C. (2010). Farmacognosia. *Facultad de ciencias Químicas y Farmacéuticas*. Universidad de Chile. 27-28,32-35.
- Díaz, A. (2003). La estructura de las catalasas. Vol. 22(2). 77.
- Domínguez, X. (1973). Métodos de investigación fitoquímica. México. Limusa.
- Elejalde, I. (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *Anales de Medicina Interna (Madrid)* Vol. 18(6). 326-335.



- Enríquez, A., Prieto, E., De los Ríos, E. & Ruiz, Reyes, G. (2008). Estudio farmacognóstico y fitoquímico del rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe “jengibre” de la ciudad de Chanchamayo, Región Junín. Perú. *Revista Médica Vallejiana*. Vol. 5(1). 51-63.
- Fernández, M., Hernández, I. & Regueira, S. (2015). Bioactivos marinos en el tratamiento del cáncer. *Rev. Electrónica* Vol. 40(7). 3-18.
- Fernández, M., Llanos, A. & Baños, E. (2013). Inmunoterapia activa para el cáncer de mama. Sevilla: Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía.
- Frijhoff, J., Winyard, P., Zarkovic, N., Davies, S., Stocker, R., Cheng, D., Annie, R., Louse, E., Oettrich, J., Ruskovska, T., Cipak, Gasparovic A., Cuadrado, A., Weber, D., Poulsen, E., Grune, T., Schmidt, H. & Ghezzi, P. (2015). Clinical relevance of biomarkers of oxidative stress. *Antioxidants & Redox Signaling*. Vol. 23(14). 1114-1163.
- Gandur, N. (2009). Manual de enfermería Oncológica. Instituto Nacional del Cáncer. (7). Recuperado de http://www.msal.gov.ar/images/stories/bes/graficos/0000000011cnt-08-manual%20enfermeria_08-03.pdf
- García, R., De la Rosa, A., Herrera, B., González, A., López, J., González, G., Ruiz, S. & Álvarez, E. (2011). Cuantificación de polifenoles y capacidad antioxidante en duraznos comercializados en Ciudad Juárez, México. *Tecnociencia Chihuahua*. Vol. 5(2). 67-73.
- Garín, A., Aldezabal, A. & García, R. (1996). Implicaciones nutritivas del contenido en taninos de varias especies leñosas. Actas de la XXXVI científica de la Sociedad Española para el Estudio de los Pastos (SEEP). 293-298.
- Garrido, G., Ortiz, M. & Pozo, P. (2013). Fenoles y flavonoides totales y actividad antioxidante de extractos de hojas de *Lampaya medicinalis* F. Phil. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy*. Vol. 1(1). 31-37.
- Garro, G. y Alvarenga, S. (2009). Optimización de un protocolo para el cultivo *in vitro* y la propagación masiva del llantén (*Plantago major*). *Tecnología en marcha*. Vol. 22(3). 25-33.
- Gilead, F., Dorcas, J., Abdullahi, S., Aliyu, M. & Peace, M. (2016). Oxidative stress and carcinogenesis: potential of phytochemicals in breast cancer therapy. *Nutrition and Cancer*. 1-10.
- Goncalves, S. & Romano, A. (2016). The medicinal potential of plants from the genus *Plantago* (Plantaginaceae). *Industrial Crops and Products*. (83). 213-226.
- González, J. & Ugalde, C. (2012). La glándula mamaria, embriología, histología, anatomía y una de sus principales patologías, el cáncer de mama. *Revista médica de Costa Rica y Centroamérica* LXIX. (612). 315-319.
- González, M., Betancourt, M. & Ortiz, R. (2000). Daño oxidativo y antioxidantes. *Bioquímica*. Vol. 25(1). 3-8.
- Guzmán, K., Morales, K., Hernández, A., Gómez, E., García, F. & Sánchez, S. (2012). Carcinoma ductal infiltrante, el tipo de cáncer de mama más común. *MedPub Journals*. Vol. 8(1). 1-7.



- Haddadian, K., Haddadian, K. & Zahmatkash, M. (2014). A review of *Plantago* plant. *Indian Journal of Traditional Knowledge*. Vol. 13(4). 681-685.
- Hernández, X. E. (2001). El concepto de etnobotánica en La etnobotánica: tres puntos de vista y una perspectiva (pp. 5-8). Chapingo, México.
- Hussan, F., Haryani, R., Osman, R., Mohd, M., Kamaruddin, N. & Othman, F. (2015). *Plantago major* treatment enhanced innate antioxidant activity in experimental acetaminophen toxicity. *Asian Pacific Journal Biomed*. Vol. 5(9). 728-735.
- Jaume, O. (2012). Anatomía patología genera. (pp. 446). Recuperado de [://books.google.com.mx/books?id=3QGtBAAAQBAJ&pg=PA446&dq=dimetilbenzantraceno&hl=es-419&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=dimetilbenzantraceno&f=false](http://books.google.com.mx/books?id=3QGtBAAAQBAJ&pg=PA446&dq=dimetilbenzantraceno&hl=es-419&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=dimetilbenzantraceno&f=false)
- Jyoti, V., Gupta, K. & Alok, M., (2017). Pharmacological activities of miraculous plant *Plantago major* L. a review. *International Journal of Chemical and Physical Sciences*. Vol. 6(3). 26-34.
- Korc, I., Bidegain, M. & Martell, M. (1995). Radicales libres, bioquímica y sistemas antioxidantes, implicancia en la patología neonatal. *Revista Médica Uruguay*. (11). 121-126.
- Lee, V., Mijangos, J., Barragán, J., Duarte, J., Espinosa, R., Díaz, M. & Sánchez, G. (2008). Óxido nítrico: metabolismo e implicaciones clínicas. *Medicina Interna de México*. Vol. 24(6). 397-403.
- Lobato, A., Gómez, A., Badal, J., Hernández, C. & Díaz, V. (2008). Cuantificación de flavonoides, taninos y esteroides en plantas medicinales de uso tradicional en Tabasco. Recuperado de <http://www.archivos.ujat.mx/dip/divulgacion%20y%20video%20cinetifico%202008/DACB/ELobatoG%202.pdf>
- Maldonado, O., Jiménez, E., Guapillo, M., Ceballos, G. & Méndez, E. (2010). Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico degenerativas. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*. Recuperado de <http://www.medigraphic.com/pdfs/veracruzana/muv-2010/muv102e.pdf>
- Mañón, W., Garrido, G. & Núñez, A. (2016). Biomarcadores del estrés oxidativo en la terapia antioxidante. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy*. Vol. 4(2). 62-83.
- Marcano, D. & Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica orgánica*. (2da ed.). Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Caracas. Universidad Central de Venezuela.
- Marroquín, N. (2014). Farmacognosia II. Guatemala. Recuperado de <http://www.muplam.org/wpcontent/uploads/2014/11/Plantago-major-Llant%C3%A9n.pdf>
- Martínez, E., Fernández A. & Fuentes, A. (2015). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin Ciocalteu. Universidad Politécnica de Valencia. Recuperado de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/52056/Garcia%20Mart%C3%ADnez%20et%20al.pdf?sequence=1>.
- Martínez, J., Torres, P. & Juárez, M. (2011). El Glutathión y su asociación con las enfermedades neurodegenerativas, la esquizofrenia, el envejecimiento y la isquemia cerebral. *Medigraphic*. Vol. 30(2). 56-67.



- Matés, M., Pérez, C. & Núñez, I. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*. Vol. 32(8). 595-603.
- Medina, M. (2011). Lo signos distintivos del cáncer. *Encuentros en la Biología*. Vol. 4(135). s/p.
- Mohar, A., Bargalló, E., Ramírez, T., Lara, F. & Beltrán, A. (2009). Recursos disponibles para el tratamiento del cáncer de mama en México. *Salud Pública de México*. Vol. 51. 263-268.
- Montoro, A., Sebastiá, N., Rodrigo, R., Hervás, D., Nacher, O. A., Martí, L., Jambrina, E., Sarrias, A., Pérez, J., García, T., Gras, P., Villaescusa, I., Soriano, M. & León, Z. (2014). Evaluación de la radio-sensibilidad del personal sanitario en procedimientos de tratamiento o diagnóstico médico con radiaciones. *Seguridad y medio ambiente*. (134). 16,18.
- Nazarizadeh, A., Mikaili, P., Moloudizargari, M., Aghajanshakeri, S. & Javaherypour, S. (2013). Therapeutic uses and pharmacological properties of *Plantago major* L. and its active constituents. *Journal of Basic and Applied Scientific Research*. Vol. 3(9). Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/256494446_Therapeutic_Uses_and_Pharmacological_Properties_of_Plantago_major_L_and_its_Active_Constituents
- NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Orantes, E. (2008). *Tamizaje fitoquímico de la especie vegetal guatemalteca Quararibea yunckeri Standley Subsp. izabalensis W.S. Alverson ex Véliz (Bombacaceae)*. (Tesis de licenciatura). Universidad de San Carlos. Guatemala.
- Oropeza, M. (2012). *Alcaloides totales y actividad antioxidante de extractos metanólicos de hojas de Ipomoea murucoides (casahuate)*. (Tesis licenciatura). Universidad Tecnológica de la Mixteca. Huajuapán de León, Oaxaca, México.
- Oto, G., Ekin, S., Ozdemir, H., Deir, H., Yasar, S., Levent, A., Berber, I. & Kaki, B. (2011). *Plantago major* protective effects on antioxidant status after administration of 7,12-dimethylbenz (a) anthracene in rats. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. Vol. 12. 531-535.
- Palacios, P. (2013). Texto digital de farmacognosia y fitoquímica. Chimbote. Perú. 36,46,48,65-67,77-79. Recuperado de https://issuu.com/leono/docs/farmacognosia_y_fitoqu_mica_tf
- Pardo, M. & Gómez, E. (2003). Etnobotánica: aprovechamiento tradicional de plantas y patrimonio cultural. *Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal*. Vol. 60(1). 171-172.
- Parhizgar, S., Hosseinian, S., Mousa, H., Mohammad S., Alireza E., Reza Mi., Zohreh E. & Abolfazl K. (2016). Renoprotective effect of *Plantago major* against nephrotoxicity and oxidative stress induced by cisplatin. *Iranian Journal of Kidney Diseases*. Vol. 10. 182-187.
- Passaglia, A., Cestari, N., Jacques, N., Martins, C. & Machado, C. (2017). Sunlight damage to cellular DNA: focus on oxidatively generated lesions. *Free Radical Biology and Medicine*. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.029>.



- Pereira S., Vega, D., Saavedra, M. & Morales, G. (2009). Tamizaje fitoquímico de los extractos alcohólico, etéreo y acuoso de las hojas de la *Trichilia hirta* L. *Revista Química Viva*. (3). 192-198.
- Pérez, P. & Pérez, J. (2000). Métodos para medir el daño oxidativo. *Revista Cubana Médica Militar*. Vol. 29(3) p.195-196.
- Pérez, S., Sandoval, A. & Tapia, H. (2009). Factores de riesgo para cáncer de mama. Revisión de la literatura: Rol potencial de enfermería. *Revista Enfermería Universitaria ENEO-UNAM*. Vol. 6(3). 21-26.
- Porras, A. & López, A. (2009). Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de alimentos* 3. 1. 121-134.
- Quiñones, M. & Aleixandre A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*. Vol. 27(1). 76-85.
- Quirós, J., Jiménez, Y., Jiménez E., Mongue, M. & Salazar, L. (2010). Carcinomas invasores triples negativos de la glándula mamaria: incidencia y características clínico patológicos. *Acta Médica Costarricense*. Vol. 52(2). 90-95.
- Ramos, E., Paz J. & Ortiz G. (2014). *Determinación del contenido de hierro, saponinas y porfirinas en Cassia grandis L., procedente de Masaya, Chinandega y Jalapa durante el periodo mayo 2013, abril del 2014*. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua Unan-León. León, Nicaragua.
- Redrobán, K. (2012). *Comprobación del efecto cicatrizante de los extractos hidroalcohólicos de berro (Nasturtium officinale) y llantén (Plantago major) en ratones (Mus musculus)*. (Tesis licenciatura). Escuela Superior politécnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador.
- Repetto M., Semprine J. & Boveris A. (2012). Lipid peroxidation: chemical mechanism, biological implications and analytical determination. *In Tech*. 3-24.
- Ringuelet, J. & Viña, S. (2013). *Productos naturales vegetales*. (1ra edición). La Plata. Buenos Aires, Argentina. 18-29. Universidad de la Plata.
- Rivas, C., Orandy, M. & Verde, M. (2016). *Investigación de plantas de importancia médica*. 1ra Ed. México. OmniaScience.
- Rodríguez, J., López, O. & Gil, J. (2008). Método para la cuantificación de cumarina en extracto seco a partir de extractos de *Justicia pectoralis* Jacq. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. Vol. 13. 1-6.
- Rodríguez, T., Peña, M., Gómez, N., Santisteban, Y. & Hernández, M. (2015). Estrés oxidativo: genética, dieta y desarrollo de enfermedades. *Correo Científico Médico*. Vol. 19(4). 690-700.
- Rojas, L., Jaramillo, C. & Lemus M. (2015). *Métodos analíticos para la determinación de metabolitos secundarios*. Universidad Técnica de Machala, Ecuador. Ed. UTMACH.
- Rzedowski, G., de Rzedowski, J., Pilger, R. & Rahn, K. (2005). *Flora fanerogámica del Valle de México*. 2ª, ed., Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán. 719-723.



- Saavedra, A., Calderón, E., Sierra, E., Cortés, C., Gaona, F. & Clemente, M. (2004). Papel patofisiológico del óxido nítrico mitocondrial. *Mensaje Bioquímico*. Vol. 28. 32-38.
- Samuelsen, B. (2000). The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. a review. *Journal of Ethnopharmacology*. (71). 1-21.
- Sánchez, C. (2013). Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: fisiopatología del cáncer. *Medica Clínica Las Condes*. Vol. 24(4). 552-563.
- Sánchez, M., Osorio S., Vargas A. & Mendoza V. (2004). Propuesta de un constructo para evaluar integralmente el estrés oxidativo. *Bioquímica*. Vol. 29(3). 81-89.
- Sánchez, S., Flores, L., Gurrola, C. & Chávez H. (2014). Manual de prácticas de laboratorio de bioquímica. Recuperado de https://www.google.com.mx/search?q=reaccion+de+biuret&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiDkdGhII_dAhUGWq0KHZPUBTUQ_AUICigB&biw=1366&bih=619#imgrc=sNjAbKESM5PjNM
- Scandalios, G. (1993). Molecular Biology of free radical scavenging Systems. Current communications in Cell and Molecular Biology. Recuperado de [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/0014-5793\(93\)81216-M/pdf](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/0014-5793(93)81216-M/pdf).
- Schlaepfer, L. & Mendoza, J. (2010). Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. Vol. 41(4). 18-23.
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnologías de productos fitoterapéuticos*. (1ra edición). Bogotá, Colombia. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo. 98.
- Sierra, M., Guzmán, A., Olivares, I., Torres, Y. & Hicks, J. (2004). Participación de las especies reactivas del oxígeno en las enfermedades pulmonares. *Revista del Instituto Nacional de enfermedades respiratorias*. Vol. 17(2). 135-148. Recuperado de <http://www.medigraphic.com/pdfs/iner/in-2004/in042j.pdf>
- Toledo, M. (2015). *Estudio fitoquímico, evaluación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de la corteza de Triumfetta semitriloba jacq. (moteccepo) y análisis de parámetros reológicos del mucílago*. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
- Tolosa, L. & Cañizares, E. (2002). Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. *Pharmaceutica*. Vol. 43(1-2). 187-404.
- Tomás, F. (2003). Los polifenoles de los alimentos y la salud. Alimentación, *Nutrición y Salud*. Vol. 10(2). 41-53.
- Thompson, J. & Adlakha, H. (1991). Dose-responsive Induction of mamary Gland Carcinomas by the intraperitoneal injection of 1-Methyl-1-nitrosaura. *The Journal of Cancer*. (51). 3411-3415.
- Tránsito, L. (2001). Saponósidos. Fitoterapia. Recuperado de <http://www.dfarmacia.com>
- Tránsito, L. (2004). Flavonoides. *Fitoterapia*. Vol. 21(4). 108-113.
- Turrens, F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Physiological Society*. Vol. 552(2). 332-341.



- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, J. & Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*. (266). 39-40.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, T., Mazur, M. & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 39. 45-56.
- Valle, P. & Lucas, B. (2000). Toxicología de alimentos. Instituto Nacional de Salud Pública. Centro Nacional de Salud Ambiental. CDMX, México. 77-80.
- Vanaclocha, B. & Cañigueral, S. (2003). *Fitoterapia*. (4ta ed.). Barcelona, España. (pp.38-39). MASSON, S.A.
- Vázquez, A., Álvarez, E., López, J., Wall, A. & De la Rosa, A. (2012). Taninos hidrolizables y condensados: naturaleza química, ventajas y desventajas de su consumo. *TECNOCIENCIA Chihuahua*. Vol. 6(2). 89-91.
- Venereo, J. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana Medicina Militar* Vol. 31(2). 126-133.
- Vera, A. (2003). *La etnobotánica en la salud: estudio de plantas medicinales en el Municipio de Cuézala*. (Tesis de licenciatura). Universidad de las Américas Puebla. México, Puebla.
- Vidal, J. (2012). Organocatalizadores disfuncionales basados en líquidos iónicos para la síntesis de heterociclos en reacciones compatibles con la química verde. Instituto de Tecnología Química. Valencia.
- Vinagre, L. (2015). Anatomía quirúrgica de la mama. Guía clínica de Cirugía de la mama. (pp. 27.35.) Recuperado de http://www.aecirujanos.es/images/stories/recursos/publicaciones/publicados_aec/2015/capitulo1_guia_cirugia_mama.pdf.
- Viñas, G., Puig, T. & Porta, R. (2012). Estrés oxidativo en pacientes con cáncer: dos caras de una misma moneda. *Medicina Clínica*. Vol. 4. 171-173.
- Young, S. & Woodside, V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical pathology*. (54). 176-186.

Referencias de páginas web.

- Características relevantes de alcaloides. (s/a). *Alcaloides*. Recuperado de <https://portal.uah.es/portal/page/portal/.../LECCIÓN%2010-%20ALCALOIDES.pdf>
- Asociación Española Contra el Cáncer. (2014). *Cáncer de mama. Factores de riesgo*. Recuperado de <https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/cancer-mama/factores-riesgo-cancer-mama>
- Carapia, L. y Vidal, F. Instituto Nacional de Ecología (INECOL), (2017). *Etnobotánica: el estudio de la relación de las plantas con el hombre*. Recuperado de <http://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/bienesmuebles-inmuebles/17-ciencia-hoy/373-etnobotanica-el-estudio-de-la-relacion-de-las-plantas-con-el-hombre>
- Francois, J. Group Figaro CCM Benchmark. (2014). *Areola, anatomía. Definición*. Recuperado de <https://salud.ccm.net/faq/12615-areola-anatomia-definicion>
- Golgeon Group Inc., (2017). *Demonstrative Medical illustrations. Ductal carcinoma*. Recuperado de https://www.anatomyexhibits.com/downloads/12199_02x/



- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2016). *Estadística a propósito del día mundial contra el cáncer. Datos Nacionales*. Recuperado de http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2016/cancer2016_0.pdf
- Instituto Nacional del Cáncer (2017). *El cáncer. Tratamiento del cáncer. Tipos de tratamiento. Como se administra la inmunoterapia*. Recuperado de <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/inmunoterapia#5>
- Instituto Nacional del Cáncer (2017). *Tipos de tratamiento*. Recuperado de <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos>
- Instituto Nacional del Cáncer. (2015). *El cáncer. Tratamiento del cáncer. Medicina complementaria*. Recuperado de <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/mca>
- Instituto Nacional del Cáncer. (2017). *Diccionario del cáncer*. Recuperado de http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2016/cancer2016_0.pdf
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2018). *Cáncer de mama: prevención y control*. Recuperado de <http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2018). *Cáncer. Datos y cifras sobre el cáncer*. Recuperado de <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2017). *Cáncer. Tratamiento del cáncer. Programas del tratamiento del cáncer*. Recuperado de <https://www.who.int/cancer/treatment/es/>
- Pan American Health Organization (PAHO). (1995). *World Health. Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas. Alcaloides derivados de la pirrolidina; guía para la salud y la seguridad*. Recuperado de <http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/31244/9275370540-spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Secretaría de Salud (2013-2018). *Programa de acción específico prevención y control del cáncer de la mujer. Cáncer de mama. Introducción*. Recuperado de <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/cancer-de-mama-introduccion>
- Secretaría de Salud. (2009). *Guía de Práctica Clínica Diagnóstico y tratamiento del cáncer de mama en segundo y tercer nivel de atención*. Recuperado de http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/232_IMSS_09_Ca_Mama_2oN/GRR_IMSS_232_09.pdf
- Secretaría de Salud. (2015). *Información estadística. Estadísticas de cáncer de mama y cáncer cérvico uterino*. Recuperado de <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/informacion-estadistica>
- SIGMA-ALDRICH (2017). *D3254 Sigma. 7,12-Dimetilbenzo (a) antraceno (DMBA)*. Recuperado de <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d3254?lang=es®ion=MX>
- Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). (2017). *Cáncer de mama. Hormonoterapia*. Recuperado de <https://www.seom.org/es/guia-actualizada-de-tratamientos/que-es-y-como-funciona-la-hormonoterapia?showall=1>
- Torres, L. (2018). Blog de Biología. *Desarrollo embrionario. Lactancia materna*. Recuperado de <http://www.blogdebiologia.com/lactancia-materna.html>



Vibrans, H. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). (2009). *Plantaginaceae. Plantago major* L. *Llantén mayor*. Recuperado de <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/plantaginaceae/plantago-major/fichas/ficha.htm>



Anexo 1.

Entrevista Etnobotánica

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Unidad Multidisciplinaria de Investigación, L7 P.A. Terapia Molecular



Plantago major L.

Nombre del entrevistado:

1. ¿Con que nombre se conoce la planta?
2. ¿Uso medicinal que usted le da a la planta?
3. ¿Cómo supo del uso de dicha planta?
4. ¿Qué parte de la planta utiliza? ¿su uso es solo o combinada?
5. ¿Qué forma de preparación le da a la planta?
6. ¿Cómo fue la aplicación?
7. ¿Tiene algún efecto adverso el uso de la planta?
8. ¿Cómo inicio y progreso su padecimiento?
9. ¿Cuánto duró el tratamiento con la planta y con qué frecuencia?
10. ¿Cuáles fueron sus observaciones más importantes durante el tratamiento?
11. ¿Presento molestia alguna durante el uso?
12. ¿Observo nuevas lesiones al término del tratamiento?
13. ¿Además de utilizar la planta, tenía otro tratamiento? ¿Cuál era el tratamiento?