



Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Actividad antioxidante de *Asclepias curassavica* L.,  
en un modelo de cáncer

TESIS

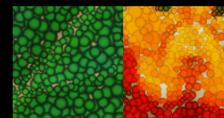
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

PRESENTA

HERNÁNDEZ RAMÍREZ PEDRO

M. en C. Catalina Machuca Rodríguez

Director





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.

# **Actividad antioxidante de *Asclepias curassavica* L., en un modelo de cáncer**

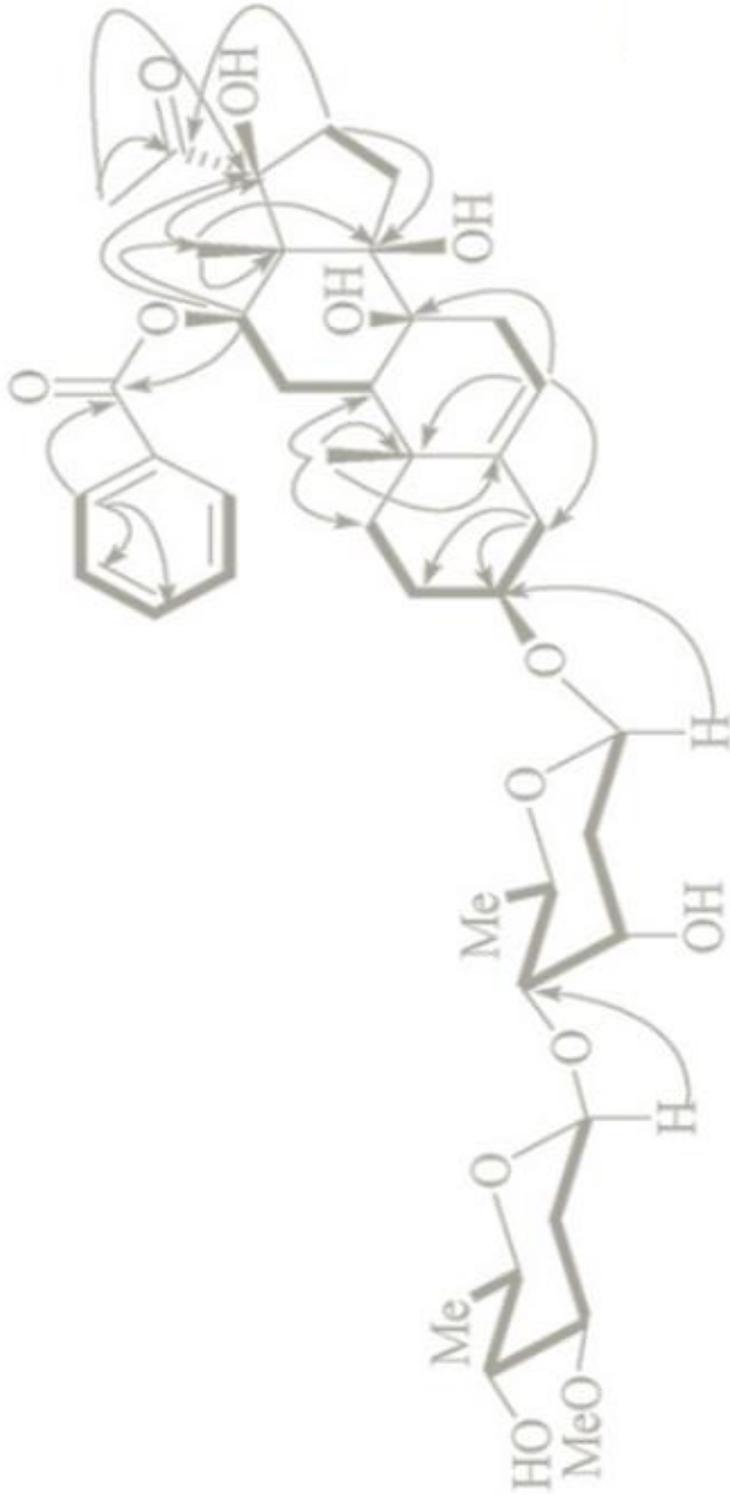


**Universidad Nacional Autónoma de México**

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

**MÉXICO**

JUNIO DE 2013



# TESIS PROFESIONAL

HERNÁNDEZ RAMÍREZ PEDRO  
Licenciatura en Biología  
Terapia molecular, Biología del Desarrollo

M. en C. Catalina Machuca Rodríguez  
Director

**CONTENIDO**

<i>Resumen</i>	6
<b>I. Introducción</b>	7
1.1 Radicales libres	8
1.1.1 Óxido nítrico	9
1.2 Daño celular mediado por radicales libres	10
1.3 Mecanismos antioxidantes	11
1.3.1 Catalasa	12
1.4 Radicales libres y cáncer	13
1.5 Papel de los radicales libres en las etapas de la carcinogénesis	13
1.6 Acción de los radicales libres en diferentes tipos de cáncer	14
1.7 Terapia antioxidante	14
1.8 Familia Apocynaceae	15
1.8.1 Género <i>Asclepias</i>	15
1.8.2 Clasificación Cladista de <i>A. curassavica</i>	15
1.8.2.1 Sinónimos	15
1.8.2.2 Nombres comunes	16
1.8.2.3 Descripción morfológica	16
1.8.2.4 Hábitat	16
1.8.2.5 Ecología	16
1.8.2.6 Distribución en México	16
1.8.2.7 Estudios etnobotánicos	17
1.8.2.8 Estudios químicos	17
1.8.2.9 Estudios farmacológicos, toxicológicos y citotóxicos	17
<b>II. Justificación</b>	18
<b>III. Hipótesis</b>	18
<b>IV. Objetivos</b>	18
<b>V. Materiales y métodos</b>	19
5.1 Localidad de colecta	19
5.2 Recopilación de información etnofarmacológica	19
5.3 Procesamiento del material vegetal	19
5.4 Obtención del extracto hidroalcohólico	19
5.5 Identificación de metabolitos secundarios	19

5.5.1 Alcaloides	19
5.5.2 Naftoquinonas y antraquinonas	21
5.5.3 Esteroides y triterpenos libres	21
5.5.4 Flavonoides	21
5.5.5 Taninos	22
5.5.6 Saponinas	22
5.5.7 Glicósidos cardiotónicos	22
5.5.8 Cumarinas	22
5.5.9 Lactonas sesquiterpénicas	23
5.6 Inducción de carcinomas a modelos experimentales	23
5.7 Tratamiento con extractos hidroalcohólicos	23
5.8 Obtención de plasma	23
5.9 Cuantificación de óxido nítrico por el método de Griess	23
5.10 Cuantificación de proteína total por el método de Biuret	23
5.11 Actividad de catalasa por el método de Chance y Machley	24
5.12 Análisis estadístico	24
<b>VI. Resultados</b>	<b>25</b>
6.1 Registro etnofarmacológico de <i>A. curassavica</i>	25
6.2 Análisis fitoquímico de los extractos hidroalcohólicos de <i>A. curassavica</i>	25
6.3 Efecto de los extractos hidroalcohólicos de <i>A. curassavica</i> sobre los niveles de óxido nítrico	26
6.4 Efecto de los extractos hidroalcohólicos de <i>A. curassavica</i> en la actividad de catalasa	28
<b>VII. Discusión</b>	<b>30</b>
<b>VIII. Conclusión</b>	<b>36</b>
<b>IX. Agradecimientos</b>	<b>37</b>
<b>X. Referencias</b>	<b>38</b>
<b>XI. Anexo</b>	<b>41</b>

## Resumen

*A. curassavica* (Apocynaceae), es una herbácea utilizada en la medicina tradicional como antiinflamatoria, anestésica, dermatológica, emética y antitumoral. Entre las sustancias bioactivas que caracterizan a esta especie se encuentran los alcaloides derivados de la 2-metoxi-pirazina y glicósidos cardiotónicos como calotropina, calactina, asclepina, curassavicina y calotoxina. Éstos últimos han presentado actividades citotóxicas en líneas celulares A549, K562, MCF-7, MDA-MB-231, HepG2, SiHa y Raji. En base en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue analizar fitoquímicamente un extracto hidroalcohólico (70:30) de *A. curassavica* mediante métodos colorimétricos; así como su actividad antioxidante en un modelo murino de cáncer inducido con óxido de níquel (NiO). El análisis fitoquímico consistió en una serie de reacciones específicas para cada metabolito secundario (glicósidos cardiotónicos (Baljet, Lieberman y Keller), alcaloides (Dragendorf y Mayer), taninos (gelatina-sal), flavonoides (Shinoda), saponinas (espuma), cumarinas (Hidroxamato férrico), antroquinonas (Bornträger), esteroides y triterpenos libres (Lieberman) y lactonas sesquiterpénicas (Lieberman e Hidroxamato férrico)). La actividad antioxidante fue analizada in vivo administrando 35 y 20 mg/kg de extracto durante nueve días, evaluando parámetros de estrés oxidativo como óxido nítrico (NO) y el sistema antioxidante de catalasa (CAT). Se identificó la presencia de alcaloides, flavonoides, glicósidos cardiotónicos, cumarinas, lactonas sesquiterpénicas, esteroides y triterpenos libres. Los resultados indican que el tratamiento con extractos de *A. curassavica* disminuyen significativamente la concentración de óxido nítrico plasmático, siendo mayor para el grupo tratado con el extracto de flor (18.65  $\mu\text{M}$ ). Con respecto a la actividad de catalasa se observó un incremento de 0.000036 UCat/mg proteína en el grupo tratado con el extracto hidroalcohólico de tallo. En condiciones experimentales se demostró que el extracto hidroalcohólico *A. curassavica* ejerce un efecto antioxidante en un modelo murino de cáncer inducido con NiO.

## I.- INTRODUCCIÓN

Un radical libre (RL) es una molécula o átomo que contiene un electrón desapareado en su órbita externa, lo que le imprime una inestabilidad y reactividad. Estos RL pueden formarse a través de tres biomecanismos; transferencia electrónica, pérdida de un protón de la molécula y ruptura homolítica de un enlace covalente. Su vida media es de nanosegundos a milisegundos, tiempo necesario para captar un electrón de las biomoléculas, con el fin de lograr su estabilidad electroquímica.<sup>1,2</sup> Una vez que el radical ha conseguido sustraer el electrón que necesita, la molécula estable que lo pierde se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así, una reacción en cadena.<sup>3</sup> Debido a que estas especies reactivas no poseen receptores específicos, tienen una capacidad de agresión indiscriminada sobre los sistemas biológicos celulares como proteínas, fosfolípidos de membrana celular, ácidos nucleicos (ADN) y lipoproteínas de baja densidad.<sup>4</sup>

Productos de nuestro metabolismo celular son biogenerados en mitocondrias, lisosomas, peroxisomas, membrana nuclear, citoplasma y retículo endoplásmico, entre los que destacan distintos tipos de radicales libres, como las Especies Reactivas de Oxígeno (ERO:  $O_2^-$ ,  $O_2^{-2}$ ,  $HO_2$ ,  $\cdot OH$ ), Nitrógeno (ERN:  $\cdot NO$ ,  $NO^+$ ,  $NO^-$ ,  $ONOO^-$ ,  $ClOH$ ), entre otros.<sup>2,5,6</sup> Existen factores físicos (radiaciones ionizantes) y químicos (contaminación ambiental, medicamentos, aditivos químicos en alimentos procesados y algunos xenobióticos como pesticidas, herbicidas y fungicidas)<sup>7</sup>, que contribuyen a la generación de más radicales libres. En condiciones fisiológicas normales, el organismo mantiene un complejo sistema antioxidante, como el glutatión, las vitaminas C y E, así como enzimáticos (catalasa, superóxido dismutasa y peroxidasa).<sup>2,8</sup> Cuando existe un desequilibrio entre prooxidantes y antioxidantes, se establece una situación conocida como estrés oxidativo (EO), que puede dar lugar a un daño celular. El cual puede agravarse, por un aumento en precursores de radicales libres, catálisis prooxidante, reducción de sistemas antioxidantes o combinación de todos ellos, dando como resultado patologías como el cáncer, diabetes y alteraciones cardiovasculares.<sup>9</sup>

Particularmente la asociación entre radicales libres y cáncer es compleja y paradójica, ya que ha sido demostrado que estas especies químicas pueden inducir varios tipos de cáncer;<sup>10</sup> pero al mismo tiempo, estas células transformadas generan más radicales que las células normales. El sistema antioxidante de la tioredoxina está amplificado en las células malignas, así como la estimulación de la progresión del ciclo celular por factores de crecimiento o por mutaciones que puede activar el receptor de la tirosin-cinasa que involucra la generación e incremento de los radicales libres.<sup>11</sup>

Estudios corroboran la reducción del riesgo de padecer algún tipo de cáncer con la ingesta de antioxidantes. Por otro lado, las investigaciones recientes que analizan el efecto de los antioxidantes una vez diagnosticado el cáncer y su posterior tratamiento oncológico son poco relevantes. Sin embargo, algunos compuestos extraídos de las plantas han generado esperanzas para un futuro enfoque de terapia antioxidante. En este sentido es importante potencializar el conocimiento de la medicina tradicional y su aplicación clínica.

En este trabajo se analizó fitoquímicamente un extracto hidroalcohólico de *A. curassavica*, mediante métodos colorimétricos; así como su actividad antioxidante en un modelo de cáncer inducido con NiO.

## 1.1 Radicales libres

Generalmente son reconocidos dos grupos de radicales libres, las Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) y Especies Reactivas de Nitrógeno (ERN), ambas definidas por su capacidad prooxidante, la cual está determinada por factores como: reactividad, especificidad, selectividad y difusibilidad. El primer grupo está fundamentado en el oxígeno, gas indispensable para los organismos aeróbicos, dado su participación en procesos celulares para la generación de energía, pero a su vez es potencialmente tóxico para todos los seres vivos al formarse especies reactivas de éste por factores endógenos y exógenos. Las ERO son biogeneradas en distintos tipos celulares como: fagocitos, macrófagos, neutrófilos y fibroblastos, particularmente en compartimentos como el citosol, membrana plasmática, retículo endoplásmico, peroxisomas y en la membrana interna mitocondrial.<sup>12,13,14</sup> Ésta última es la fuente más importante de formación de especies químicas de oxígeno, tras el proceso de transporte de electrones, mediado por enzimas de la familia NOX, la oxidasa NADPH o NOX<sub>2</sub>.<sup>15</sup> Lo cual ocurre cuando un pequeño porcentaje del oxígeno (<5%) es reducido de manera incompleta por acción del complejo citocromo-oxidasa, al aceptar un menor número de electrones, originando las ERO,<sup>2,5</sup> que son representadas por el anión superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido ( $O_2^{2-}$ ), perhidroxilo ( $HO_2^{\cdot}$ ) y el hidroxilo ( $^{\cdot}OH$ ) y no radical, como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), oxígeno singulete ( $^1O_2$ ), ozono ( $O_3$ ) y ácido hipocloroso (ClOH) (Fig. 1).<sup>2,5,6</sup>

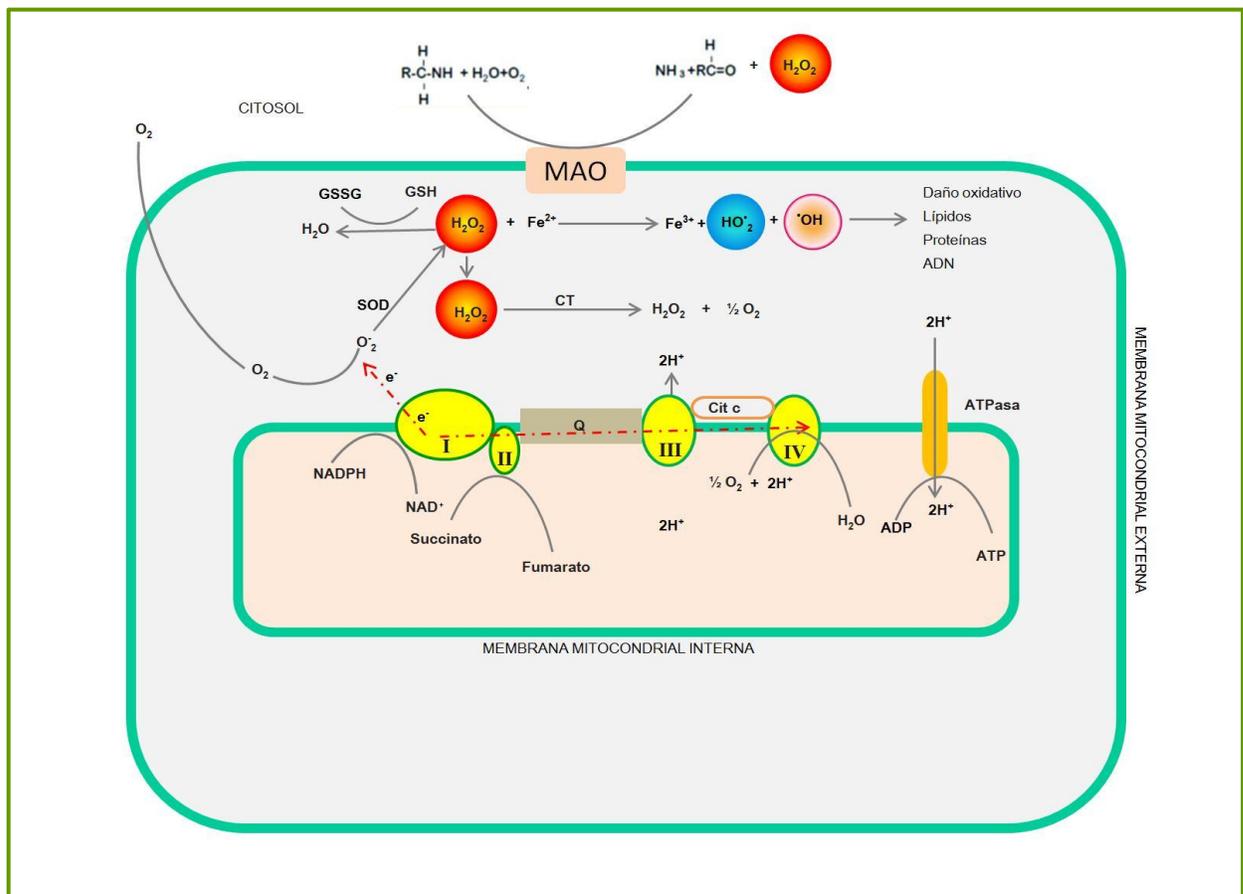


Fig. 1. La cadena de transporte de electrones mitocondrial es considerada la mayor fuente de formación de radicales libres. Cerca del 5 al 10% del oxígeno, incorpora electrones procedentes de los transportadores de la cadena respiratoria, responsable de la formación del anión  $O_2^-$  y  $HO_2^{\cdot}$ , que por acción de la superóxido dismutasa (SOD) se origina una especie más reactiva, el  $H_2O_2$ , que en presencia de metales de transición en estado reducido como  $Fe^{3+}$  (II), Cu (I), Co (II) y Ni (II), es transformada en otra mucho más reactiva: el  $^{\cdot}OH$ , a través de la reacción de Haber-Weiss o Fenton.

Por otra parte, el representante más sobresaliente de las ERN es el óxido nítrico ( $\dot{\text{N}}\text{O}$ ), que es producido por organismos superiores al ser oxidada una de las terminales de los átomos de nitrógeno-guanidino de la L-arginina, proceso que se encuentra catalizado por la enzima Sintasa de Óxido Nítrico (SON) (Fig. 2).<sup>15</sup> Bajo ciertas condiciones el  $\dot{\text{N}}\text{O}$  puede originar otros radicales como: el catión nitrosonium ( $\text{NO}^+$ ), anión nitroxilo ( $\text{NO}^-$ ), dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2$ ) y peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ).<sup>2,5,6</sup>

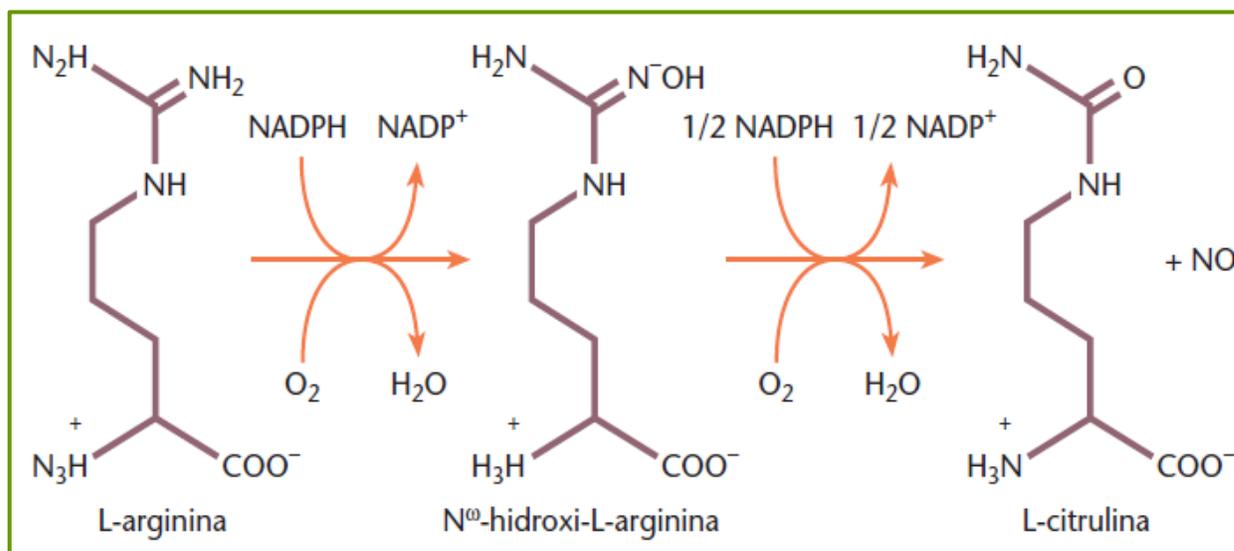


Fig. 2. Reacción general de la óxido nítrico sintasa (NOS), que cataliza la oxidación del amino guanidino de la L-arginina generando óxido nítrico y L-citrulina, con la formación del intermediario  $\text{N}^w$ -Hidroxi-L-arginina.

### 1.1.1 Óxido nítrico (NO)

El NO es un gas incoloro escasamente soluble en agua (<2 mmol), bajo condiciones de 25 °C, 1 atm de presión y humedad ambiente presenta una vida media de 3.8 a 6.2 s. Se caracteriza por presentar un electrón no apareado en su capa de valencia externa, lo que lo convierte en una molécula paramagnética con naturaleza de radical libre que participa en procesos fisiológicos y patológicos. Es producido en las células por tres isoformas de la óxido nítrico sintasa (tipo I, dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ ; tipo II, no regulada por  $\text{Ca}^{2+}$ ; y tipo III, dependiente del sistema  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina), actuando como activador de la guanilato ciclasa la cual incrementa la concentración del guanosin monofosfato cíclico (GMPc), facilitando así la transmisión neuronal, promoviendo la relajación vascular, inhibiendo la proliferación de células de músculo liso vascular, la agregación y adherencia de plaquetas y leucocitos. Las concentraciones en un organismo vivo se encuentran entre 10 nM a 1  $\mu\text{M}$ .

El NO puede ser cuantificado a partir de sus metabolitos estables como  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$ , a través de métodos directos (cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplada a detectores electroquímicos, resonancia electrónica paramagnética quimioluminiscencia) y por métodos indirectos (espectrometría de masas, espectrometría de UV-Vis y métodos electrométricos). Sin embargo la técnica más utilizada es la detección colorimétrica con el reactivo de Griess. Esta reacción involucra la formación de un cromóforo mediante la diazoación de la sulfanilamida con ácido nitroso, seguida por la unión de una amina bicíclica (Fig. 3).

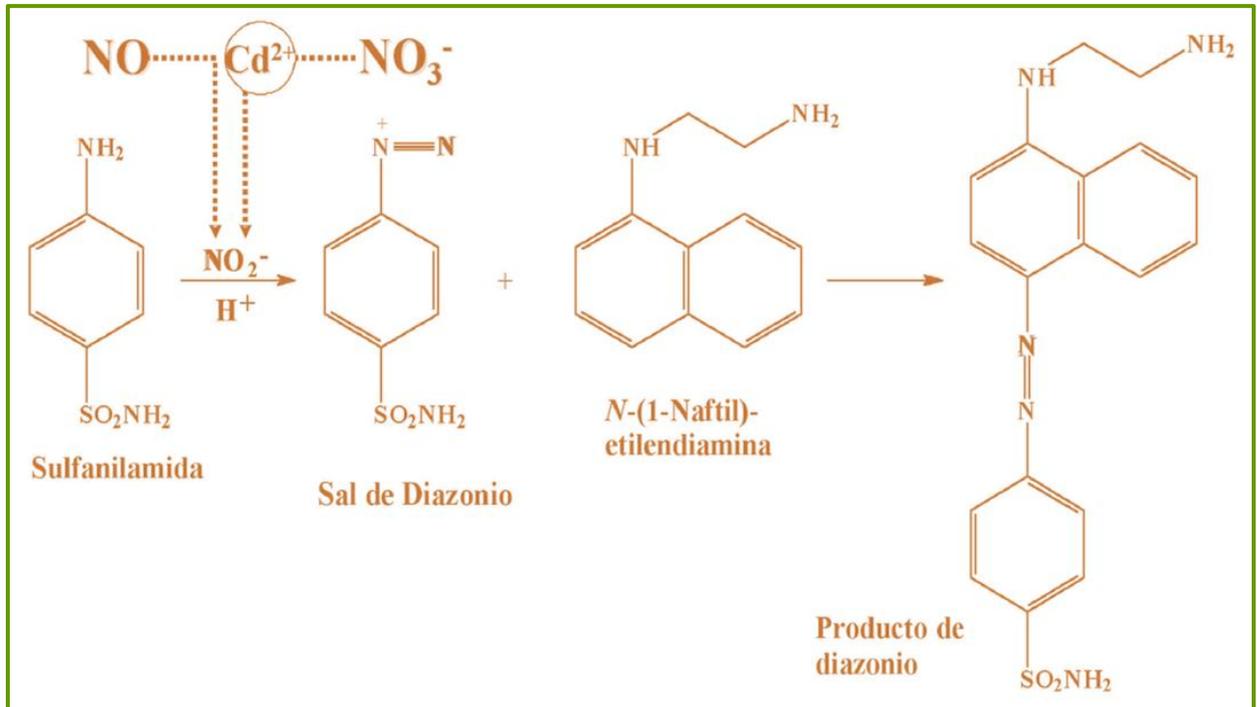


Fig. 3. Reacción de Griess para la detección de  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$ .

## 1.2 Daño celular mediado por radicales libres

Si bien es cierto que los radicales libres son mediadores fisiológicos fundamentales, particularmente como vías de señalización, regulación del tono vascular, transducción de señales intracelulares incluyendo el receptor de antígenos de linfocitos, mantenimiento del sistema REDOX, antiagregante plaquetario, neurotransmisor, contra infecciones bacterianas, entre otros, también constituyen un riesgo, especialmente para las células y biomoléculas, como los ácidos nucleicos, proteínas, polisacáridos y lípidos (Fig. 4).<sup>2,16,17</sup>

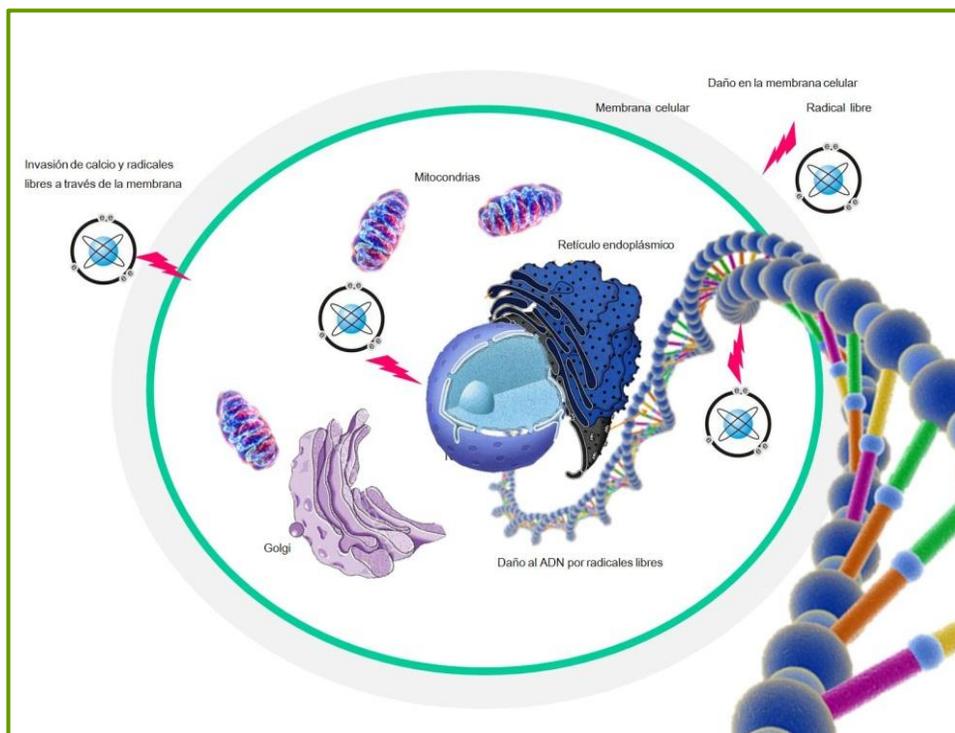


Fig. 4. El daño celular es ejercido principalmente por la peroxidación de lípidos de la membrana, permitiendo el paso de radicales libres y calcio, el cual genera daño mitocondrial, liberando al medio intracelular más radicales libres, los cuales provocan una reacción en cadena, oxidando a su paso proteínas, carbohidratos, lípidos de membrana (mitocondrial, nuclear y de retículo) incluso el propio DNA.

Dentro de las ERO, el radical  $O_2^-$  reacciona con menor eficacia pero su acción es notablemente más específica y selectiva, afectando a enzimas como la xantina-oxidasa, aldehído oxidasa, grupos tioles, ácido ascórbico, y generando procesos citotóxicos y lesiones por reperfusión tras un periodo de isquemia.<sup>2,12</sup> Para el caso del  $O_2^{2-}$ , éste ocasiona daños estructurales y mutaciones en el ADN. El  $HO_2^{\cdot}$  es altamente reactivo frente a moléculas de importancia biológica, siendo el precursor de la peroxidación lipídica (Fig. 4). Sin embargo, es casi inexistente a pH fisiológico. Por otro lado el radical hidroxilo, tiene un espectro amplio de reactividad sobre aminoácidos fisiológicos, como la tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina, metionina y la cisteína,<sup>18</sup> esta oxidación puede generar un cambio conformacional de la proteína y como consecuencia la pérdida o modificación de su función biológica, la cual es irreversible y puede conducir a la desnaturalización de la proteína.<sup>19</sup>

En las enzimas, puede impedir su actividad catalizadora y en los polisacáridos, cuya función es estructural, ocasiona su despolimerización, lo que da lugar a procesos degenerativos. Un caso especial es el del ácido hialurónico, polisacárido, cuya función reside en mantener la viscosidad del fluido sinovial. La exposición a agentes oxidantes, sobre todo al radical superóxido, provoca su fragmentación, lo que conduce a la desestabilización del tejido conectivo y a la pérdida de viscosidad, alteración que ocurre en la artritis reumatoide.<sup>20,21,22</sup> Los lípidos, especialmente aquellos que contienen ácidos grasos poli-insaturados son especialmente susceptibles a desarrollar procesos de oxidación no controlados. El resultado es la pérdida de la flexibilidad y de las funciones secretoras, así como la pérdida de los gradientes iónicos a ambos lados de la membrana.<sup>23</sup> El radical  $ONOO^{\cdot}$ , es un potente oxidante, aún más citotóxico que el  $^{\cdot}NO$ , que estimula procesos inflamatorios, entre ellos la expresión de moléculas de adhesión, IL 8 y NF-Kb.<sup>24</sup>

### 1.3 Mecanismos antioxidantes

Los organismos aeróbicos poseen complejos sistemas antioxidantes que permiten la neutralización de los radicales libres, a través de dos mecanismos, la estequiométrica y la catalítica. Estos pueden agruparse según su naturaleza química y modo de acción en dos grupos: enzimáticos y no enzimáticos (preventivos y secuestradores) (Tabla 1) y (Fig. 5).<sup>2,5,6</sup>

Tabla 1. Naturaleza química y modo de acción de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos.

<b>Enzimáticos</b>	Forman la primera línea de defensa celular frente a especies reactivas de oxígeno	
Mecanismo de acción: catalítico	específicas, degradándolas a moléculas menos reactivas	
Clasificación	Modo de acción	Biogeneración
Superóxido dismutasa (SOD)	$O_2^- \longrightarrow H_2O_2$	Mitocondria (Mn-SOD), Citosol (Cu-Zn-SOD)
Catalasa (CAT)	$H_2O_2 \longrightarrow H_2O$	Interior de glóbulos rojos
Glutatión peroxidasa (GPx)	$H_2O_2 \longrightarrow H_2O$	Citosol, membranas celulares
<b>No enzimáticos</b>		
Preventivos	Secuestran los iniciadores del proceso oxidativo como los metales de transición (Fe (II), Cu	
Mecanismo de acción: estequiométrico	(I), Co (II) y Ni (II))	
Clasificación	Modo de acción	Biogeneración
Tranferrina y lactoferrina	Quelantes	Citosol, membranas celulares
Ceruloplasmina	Quelantes	Plasma
Secuestradores	Inhiben la cadena de iniciación de reacciones de radicales libres o rompen la cadena de propagación de la misma	
Mecanismo de acción: estequiométrico		
Clasificación	Modo de acción	Biogeneración
$\beta$ -carotenos	Recicladores	Metabolismo de plantas
Vitamina C	Recicladores	Frutas y verduras
Bilirrubina	Inhibe peroxidación	Metabolismo de grupos hemo

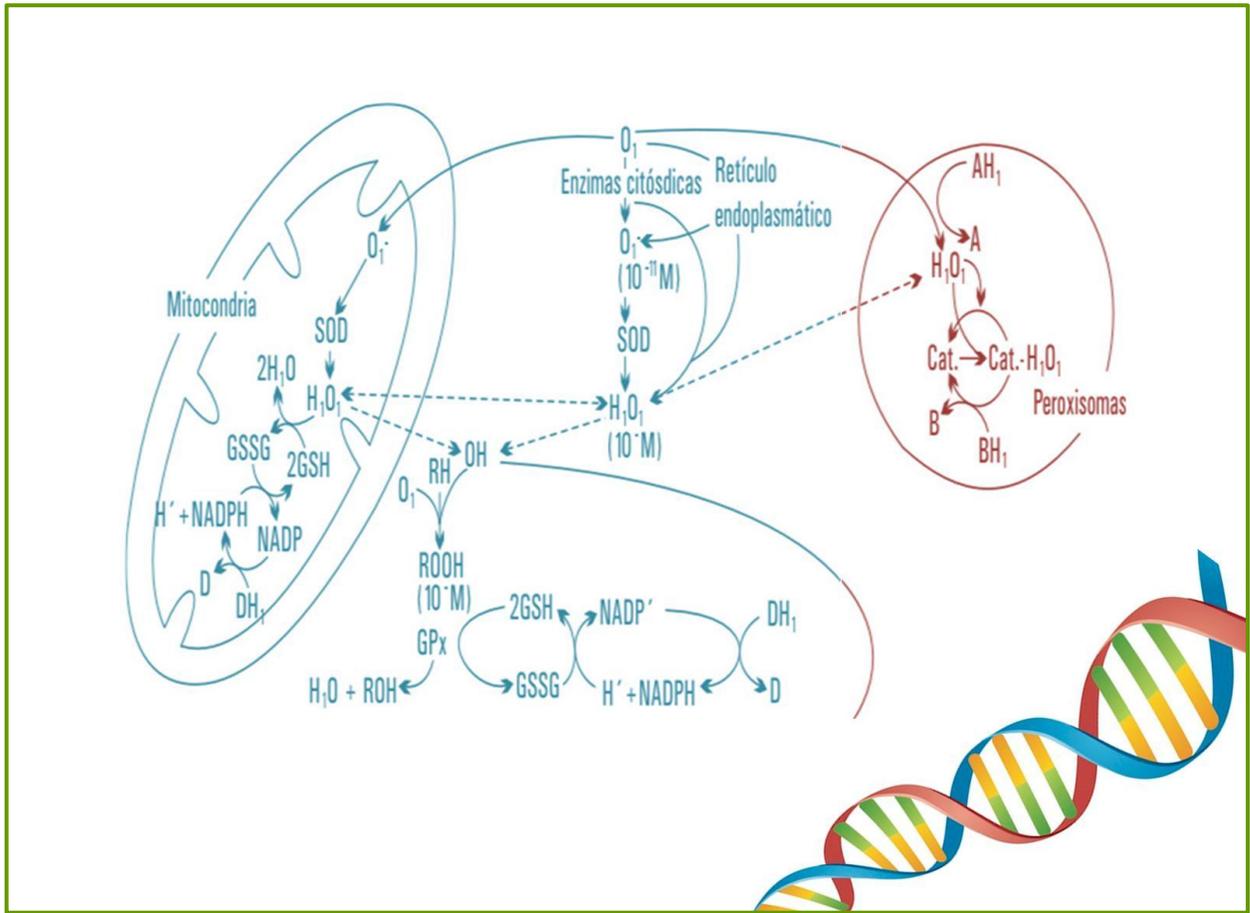


Fig. 5. Radicales libres, complejos antioxidantes y daño celular.

### 1.3.1 Catalasa (CAT)

La catalasa se encuentra en altas concentraciones en hígado y riñón, a nivel de mitocondrias, peroxisomas y citosol. Se caracteriza por estar involucrada en la protección frente a la acción destructiva del  $H_2O_2$  producto del metabolismo celular, la radiación ionizante y dismutación del radical superóxido. Proceso que ocurre por la descomposición celular del  $H_2O_2$  en agua y oxígeno (Fig. 6). Actualmente han sido identificados tres grupos Mn-catalasas, catalasas-peroxidasas y catalasas monofuncionales, éste último, con un peso aproximado de 250,000 daltones, se presenta en la mayoría de los organismos aeróbicos.



Fig. 6. Descomposición del peróxido de hidrogeno mediada por catalasa.

## 1.4 Radicales libres y cáncer

La asociación entre radicales libres y cáncer es compleja y paradójica, ha sido demostrada que estas especies químicas pueden inducir varios tipos de cáncer, pero al mismo tiempo las células transformadas generan más radicales que las células normales<sup>10</sup> Además, el sistema antioxidante de la tioredoxina se encuentra amplificado en éstas células malignas; aunado a ello, se encuentra la progresión del ciclo celular por medio de factores de crecimiento o mutaciones que pueden activar el receptor de la tirosin-cinasa, generando así más especies reactivas.<sup>11</sup> Algunos sistemas antioxidantes como la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión, alfatocoferoles y betacarotenos pueden limitar los efectos del estrés oxidativo, aunque estos sistemas pueden ser rápidamente acaparados por elevadas cantidades de RL.<sup>26,27</sup> Diversos agentes quimioterapéuticos, como la doxorubicina o bleomicina, pueden ser selectivamente tóxicos para las células tumorales debido al incremento del estrés oxidativo llevando a las células altamente estresadas a su límite y muerte.

Generalmente, los radicales libres tienen como blanco la molécula de ADN (Tabla 2), particularmente los grupos nucleofílicos de la desoxirribosa y bases nitrogenadas, lo que conlleva a la pérdida de la homeostasis celular, ocasionando una de las enfermedades con alta morbilidad y mortalidad como el cáncer.<sup>25</sup>

Tabla 2. Daño oxidativo al ADN mediado por radicales libres.

Daño oxidativo al ADN	Acción de radicales libres
1.- Modificación de bases	El radical $\cdot\text{OH}$ genera más de 20 modificaciones en bases nitrogenadas, la más frecuente es la 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OH-dG) que tiene un potencial altamente mutagénico al igual que la 5-hidroximetil-2-desoxiuridina
2.- Depuración de bases	Ocurre gracias al radical $\cdot\text{OH}$ y $\text{H}_2\text{O}_2$ , particularmente en el enlace glicosídico, generando sitiosapurínicos o apirimídicos (AP)
3.- Ruptura de una cadena	Estas se producen por escisión del enlace fosfodiéster, frecuentemente por ataque de radicales libres a la porción desoxirribosa del esqueleto del ADN
4.- Mutaciones	Generadas por ERO, lo que ocasiona el incremento de la velocidad de mutagénesis endógena
5.- Activación de oncogenes e inactivación de genes supresores	Producidas por el $\text{H}_2\text{O}_2$ , $\text{O}_2^{\cdot-}$ y $\text{O}_3$ , modificando la proliferación celular

## 1.5 Papel de los radicales libres en las etapas de la carcinogénesis

El cáncer se desarrolla como un proceso microevolutivo que requiere de la acumulación de múltiple eventos, actualmente se hace referencia sobre los radicales libres que influyen en cada una de las etapas de la carcinogénesis (Tabla 3).<sup>25</sup>

Tabla 3. Participación de los radicales libres en las etapas de la carcinogénesis.

<b>Iniciación tumoral</b>
Esta etapa requiere en primera instancia, de la modificación permanente del material genético de una célula. A continuación se enumeran los mecanismos de daño, inducidos sobre el ADN por estrés oxidativo: Como primer paso se encuentra la formación del $\cdot\text{OH}$ , generado por la interacción del $\text{H}_2\text{O}_2$ con el hierro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) o cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ), la cual reacciona con el ADN, a esto se suma el incremento de ( $\text{Ca}^{2+}$ ) libre, que activa las endonucleasas que fragmentan finalmente el material genético.
<b>Promoción tumoral</b>
Las ERO, estimulan la expansión de clones celulares mutados, mediante la modulación temporal de genes relacionados con la proliferación y muerte celular, inducen un incremento notable del $\text{Ca}^{2+}$ citosólico, movilizándolo desde las reservas intracelulares e incrementando su flujo desde el medio extracelular. <sup>22</sup> El efecto del $\text{Ca}^{2+}$ puede tener lugar por vía directa induciendo proto-oncogenes como <i>c-fos</i> . Además de ejercer efectos directos sobre la regulación de la actividad de factores transcripcionales como el factor NF- $\kappa\text{B}$ que tiene bajo su control una gran variedad de genes.
<b>Progresión tumoral</b>
Es ocasionada por lesiones adicionales de las ERO al ADN, incrementando su inestabilidad genómica, acompañado de una disminución de enzimas antioxidantes. Por otro lado se encuentran los leucocitos activados, que pueden originar un proceso inflamatorio crónico que lejos de conducir a la eliminación del tumor, incrementa la progresión tumoral, además de neutrófilos y eosinófilos que desempeñan un papel potencial en la carcinogénesis. Esta etapa puede agravarse según la especie reactiva involucrada, presencia de carcinógenos y la posición del ciclo celular por el que transcurre la célula en el momento del ataque oxidativo.

## 1.6 Acción de los radicales libres en varios tipos de cáncer

Tabla 4. Acción de los radicales libres en varios tipos de cáncer.

Cáncer	Acción
AGS, Gástrico	Inducen la expresión de uPAR (activador del receptor uroquinasa de plasminógeno) vía Erk-1/2 y AP-1, estimulando su capacidad invasiva. <sup>28</sup> Aumento de 8-oxo-dG
Próstata	Mutan p53, asociadas a una sobreexpresión de Bcl-2. <sup>29</sup> Aumento de 8-oxo-dG <sup>2,32,33</sup>
Mama	Acumulación de mutaciones en BRCA1/2. <sup>30</sup> Aumento de 8-oxo-dG <sup>32,33</sup>
Colorectal	Alteraciones moleculares en genes supresores de tumores, como el 5q (APC y MCC), el 17p (p53), el 18q (DCC) y el 22q. <sup>31</sup>
Pulmón	Aumento de 8-oxo-dG <sup>32,33</sup>
Ovario	Aumento de 8-oxo-dG <sup>32,33</sup>
Leucemia linfóide	Aumento de peroxidación (MDA y 8-oxo-dG) <sup>34</sup>

## 1.7 Terapia antioxidante

Estudios corroboran la reducción del riesgo de padecer algún tipo de cáncer con la ingesta de antioxidantes proporcionados por alimentos ricos en vitaminas o suplementos vitamínicos. Por otro lado, las investigaciones recientes que analizan el efecto de los antioxidantes una vez diagnosticado el cáncer y su posterior tratamiento oncológico son poco relevantes (Tabla 5 y 6). Sin embargo, algunos compuestos extraídos de las plantas han generado esperanzas para un futuro enfoque de terapia antioxidante. En este sentido es importante potencializar el conocimiento de la medicina tradicional y su aplicación clínica. Así como considerar otros aspectos como la farmacodinámica, farmacocinética, desbalance oxidativo, fallos en el sistema antioxidante, entre otros.

Tabla 5. Ensayos clínicos de quimioterapia en combinación con agentes antioxidantes.

Control	Localización	No	Tratamiento	Agente antioxidante	Resultados	Referencias
Si	Hematológicas	36	PoliQT	Alfatocoferol, betacaroteno, ácido ascórbico	Menor toxicidad. No diferencias en recidivas ni SG	35
No	Pulmón	18	PoliQT± RT	Alfatocoferol, betacaroteno, ácido ascórbico	Menor SG	36
No	Mama	32	Quimioterapia, RT, cirugía	Vitamina C, E, β-caroteno, CoQ, Se, ácidos grasos	Mejor respuesta tumoral	37
No	Varias	21	PoliQT	Alfatocoferol	No diferencias en la actividad antitumoral	38
Si	Cabeza y cuello	20	PoliQT + RT	Betacaroteno	No diferencias en remisiones	39
Si	Vejiga urinaria	65	Inmunoterapia	Complejo polivitamínico	Disminución recurrencia. No diferencias en SV	40
Si	Mama	90	Quimioterapia	Complejo polivitamínico y minerales	No diferencias en SLE ni en SG	41
Si	Pulmón	136	Quimioterapia	Polivitaminas	No diferencias en TR ni SG	42

PoliQT: poliquimioterapia; RT: radioterapia; SG: supervivencia global; SLE: supervivencia libre de enfermedad; SV: supervivencia; TR: tasa de respuesta.

Tabla 6. Estudios aleatorizados en pacientes tratados con radioterapia externa y agentes antioxidantes.

Control	Localización	No	Agente antioxidante	Resultados	Referencias
Si	Cabeza y cuello	540	Alfatocoferol y betacaroteno	Menos toxicidad. No diferencias en calidad de vida. Mas recurrencias	43
Si	Cabeza y cuello	44	Alfatocoferol	Disminución mucositis. No diferencias en SG	44
Si	Pulmón	66	Alfatocoferol y pentoxifilina	Mayor SLP y SG	45
Si	Glioblastoma	30	Melatonina	Mayor SV a un año	46
No	Metástasis cerebrales	126	Melatonina	No diferencias en SG	47

SG: supervivencia global; SLP: supervivencia libre de progresión; SV: supervivencia.

## 1.8 Familia Apocynaceae

La familia Apocynaceae incluye más de 2000 especies clasificadas en 280 géneros distribuidos en regiones tropicales y sub-tropicales. Incluye plantas anuales o perennes, principalmente hierbas erectas o trepadoras y con menos frecuencia árboles y arbustos. La mayoría de sus integrantes están provistos de laticíferos constituidos por células individuales o ramificadas que producen látex lechoso, rojizo (*Aspidosperma*) o transparente (*Thenardia*), el cual contiene glicósidos y alcaloides que pueden ser muy tóxicos (*Asclepias*).<sup>48</sup>

### 1.8.1 Género *Asclepias*

El género *Asclepias* se encuentra incluido dentro de la familia Apocynaceae, es un género Americano con alrededor de 150 especies, 68 de éstas se distribuyen en México. Son herbáceas o arbustos que poseen un sistema desarrollado de células laticíferas; tallos glabros, hojas opuestas, raramente alternas o verticiladas. Las flores se encuentran dispuestas en inflorescencias; presentan corolas rotadas o campanuladas; un ginostegio formado por estambres fusionados al gineceo; corola estaminal de cinco lóbulos. Fruto generalmente un folículo glabro o pubescente.<sup>49</sup>

Las especies del género *Asclepias* se distribuyen en todo el país, siendo San Luis Potosí el estado con más de 23, seguido de Oaxaca con 21, Michoacán y Veracruz con 20, y los estados con menor número de especies son Campeche, Tabasco y Yucatán con dos. La mayor parte de éstas se localiza en el Bosque de Pino-encino con 34 especies, Bosques de Encinos con 25, Bosque Tropical Caducifolio con 20 y Bosque de Pinos con 19; en Pastizal y Vegetación secundaria con 17, Matorral Xerófilo y Bosque Mesófilo de Montaña con 15, con solo siete representantes en la Vegetación riparia y dos en el Bosque Tropical Perennifolio y Subperennifolio.<sup>50</sup>

Estudios químicos de este género reportan presencia de glicósidos cardiotónicos (cardenólidos) y diversos tipos de alcaloides derivados del indol, piridina o de la fenantroindolizidina, así como flavonoides y ocasionalmente taninos.<sup>51</sup> Probablemente estos compuestos les confieren sus propiedades medicinales y tóxicas.

### 1.8.2. Clasificación Cladista de *A. curassavica*<sup>175</sup>

División: Embriophyta

Clase: Equisetopsida C. Agardh.

Subclase: Magnoliidae Novák. ex Takht.

Superorden: Asteranae Takht.

Orden: Gentianales Juss. ex Bercht & J. Presl.

Familia: Apocynaceae Juss.

Género: *Asclepias* L.

Especie: *curassavica* L.

#### 1.8.2.1 Sinónimos

*Asclepias bicolor* Moench; *Asclepias siryaca* Blanco

### 1.8.2.2 Nombres comunes

*A. curassavica* es conocida comúnmente como adelfilla, burladora, calderona, cancerillo, cerillo, chilillo, chilillo venenoso, cinco llagas, cojón de gato, cominos rústicos, contrayerba, cresta de gallo, flor de tigre, hierba de la culebra, hierba del sapo, hierba María, hoja delgada, la señorita, Pablito, pericón, ponchiluite, ponchiuis, revienta muelas, rompe muelas, saca espinas, salvilla, San Pablillo, Santa Rosa, soldaditos, soldadillo, solimán, venenillo, vevenillo, víbora, viborona; Chiapas: pameyat, pameyat warnal, tzajal-chú momol (Tzeltal), spama yat, xpamal yat, yich vakax (Tzotzil); Nayarit: temuy (Cora); Oaxaca: ita ya a, yuk paxapaa, yuku xatu; Puebla: tesuchi-potei (Otomí); Puebla: papuyut, pinatawart; Veracruz: misíum, nacuy, papayut; Yucatán: anal, anal win, chac anal, chak anal, x-canlol (Maya) anal k'aak', anal-xiw, anal pool kuuts, anal poolts'ut'uk, chaak pool kuuts, chacanal, chilillo xiw, cuchillo xiw, nichiyuc, xensul; Chiapas: pojov vomol; San Luis Potosí: punchix huítz (Tenek); Quintana Roo: x-anal (Maya).<sup>52</sup>

### 1.8.2.3 Descripción morfológica

Es una herbácea que mide entre 50 cm a 1.6 m de altura, posee un sistema desarrollado de células laticíferas en tallos, presentan hojas alargadas, flores pequeñas formando inflorescencias en forma de sombrillas de color amarillo y rojo-naranja, frutos de 5 a 7 cm de largo y semillas provistas de pelos sedosos (Fig. 7).<sup>53</sup>



Fig. 7. A; *Asclepias curassavica*, B; inflorescencia, C; frutos y D; semillas.

### 1.8.2.4 Hábitat

Es originaria de Sudamérica. Habita en climas cálido, semicálido, seco y templado, desde el nivel del mar hasta los 1900 msnm. Observada en terrenos baldíos, cerca de casas, orilla de caminos y riachuelos, asociado a borde de Manglar, Bosque Tropical Caducifolio, Subcaducifolio, Subperennifolio y Perennifolio, Matorral Xerófilo, Pastizal Inducido, Bosque Mesófilo de Montaña, de Encino, Pino y Mixto de Encino-Pino.<sup>52,53</sup>

### 1.8.2.5 Ecología

Es una planta proveedora de alimento a varias especies de mariposas, particularmente a *Danaus erippus*. Sus orugas se alimentan de sus hojas y frutos, mientras que los adultos liban de sus flores. Además de presentar poblaciones de pulgones amarillos como plaga quienes se alimentan de tallos, hojas e incluso de frutos, la cual puede deberse a condiciones ambientales poco adecuadas como la cantidad de luz, sin embargo estas pueden tener un control biológico a partir de insectos y arañas.<sup>54,55,56</sup>

### 1.8.2.6 Distribución en México

*A. curassavica* se distribuye en Aguascalientes, Baja California, Baja California Sur, Campeche, Chiapas, Chihuahua, Colima, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán, Zacatecas.<sup>52,53</sup>

### 1.8.2.7 Estudios etnobotánicos

Tabla 7. Estudios etnobotánicos de *A. curassavica*.

Usos	Partes utilizadas	Aplicaciones	Referencias
Medicinal	Látex	Estornutatorio	49, 52-79
Tóxico	Hoja	Laxante	
	Semilla	Purgante	
	Flor	Emético	
	Yema	Anestésico	
	Raíz	Dermatológico	
	Toda la planta	Vermífugo	
		Antiviperino	
		Asma	
		Anti-inflamatorio	
		Anti-hemorroides	
		Oftalmológico	
		Cicatrizante	
		Gonorrea	
		Cáncer	

### 1.8.2.8 Estudios químicos

Tabla 8. Estudios químicos de *A. curassavica*.

	Referencias
Aislamiento e identificación de calotropogenina	80
Compuestos relacionados con cardiotónicos	81
Vacuolas ricas en gránulos politerpénicos	82, 83
Polisacáridos y carbón orgánico en hojas y semillas	84
Resinoide de tipo galatoxina, alcaloides y glicósidos cardiotónicos	84-87
Purificación y propiedades moleculares de fosfatasa del látex	88
Aislamiento de enzima $\beta$ -D-fucosidasa del látex	89
Aislamiento de endopeptidasas (Asclepain I y II) del látex	90-92
Glicósidos esteroidales de raíz	93
Cardenolidos y glicósidos esteroidales en partes aéreas	59, 94-100
Aislamiento e identificación de glicósidos cardiotónicos en semillas	101

### 1.8.2.9 Estudios farmacológicos, toxicológicos y citotóxicos

Tabla 9. Estudios farmacológicos, toxicológicos y citotóxicos de *A. curassavica*.

	Referencias
Extracto etanólico inhibe el crecimiento de <i>Clostridium histolyticum</i> y <i>Escherichia coli</i>	102
Extracto metanólico y hexánico de hojas y tallos, resultaron antifúngicos para <i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Trichophyton rubrum</i>	103
Actividad citotóxica de calotropina y otros cardenolidos, en células A 549, MCF-7, MDA-MB-231 y HepG2	98
Actividad citotóxica de calotropina, en células K562, a través de la activación de caspasas	104
Actividad citotóxica de cardenolidos y glicósidos cardiotónicos, en células HepG2 y Raji	105
Actividad citotóxica de extracto metanólico de raíz, en células HeLa y SiHa	106
Cisteínas proteasas del látex, presentan actividad pro-coagulante	107
$\beta$ -sitosterol, potencial quimiopreventivo contra ERO, en un modelo de cáncer de colon In vitro e In vivo	108
Extractos de hexano, acetato de etilo y metanol, presentaron actividad antifúngica en: <i>Trichophyton rubrum</i> , <i>Epidermophyton floccosum</i> , <i>Trichophyton simii</i> , <i>Curvularia lunata</i> , <i>Magnaporthe grisea</i> , <i>Scopulariopsis sp</i>	109
Nematodiasis gastrointestinal en ovinos en pastoreo	110
En animales domésticos provoca diarrea líquida, salivación, parálisis muscular, anorexia y edema submaxilar	111-115

## II.- JUSTIFICACIÓN

En la década pasada el cáncer ha sido la principal causa de muerte en el mundo, ocupando México el tercer lugar en el Nuevo Mundo. Según estimaciones de la Unión Internacional contra el Cáncer, cada año se suman más de 128,000 casos tan solo en nuestro país. Dentro de los cánceres con mayor incidencia a nivel nacional se encuentra el de próstata, mama, cérvix, pulmón y estómago. Más grave aún es el hecho de que dos de cada tres nuevos casos en nuestro país corresponden al sexo femenino. Como se ha descrito con anterioridad, esta patología se ha relacionado con un estrés oxidativo persistente, entendido como la continua pérdida del balance entre las ERO y ERN, y los complejos sistemas antioxidantes. Para su tratamiento han sido empleados agentes citotóxicos (vincristina, vinblastina, taxol y camptotecina) y tratamientos como la radioterapia, los cuales no son selectivos y afectan tanto a las células cancerígenas como a las normales, además de generar mayor cantidad de RL ocasionando efectos adversos. Ante este panorama, desde principios de los años cincuenta se realizaron grandes esfuerzos a nivel mundial para encontrar fitofármacos que disminuyan la incidencia de esta enfermedad, o en su caso generar actividades anticancerígenas una vez diagnosticado el cáncer, los cuales han dado lugar al aislamiento de productos naturales como antioxidantes y antiinflamatorios, con actividades relevantes. En este sentido las plantas han sido las fuentes de productos bioactivos debido a la complejidad y variedad de su metabolismo secundario. Sin embargo, se estima que el 90% de las plantas no han sido objeto de estudios fitoquímicos y biológicos. Por ello, la presente investigación está encaminada al estudio de fitofármacos de *A. curassavica*, validando algunos de sus efectos antioxidantes, antiinflamatorios y antineoplásicos en modelos de ratón.

## III.- HIPÓTESIS

El extracto hidroalcohólico de *A. curassavica*, estimula la respuesta antioxidante por mecanismos estequiométricos y catalíticos.

## IV.- OBJETIVOS

### General

- Evaluar la actividad antioxidante en un modelo murino de cáncer tratado con un extracto hidroalcohólico de tallo, hoja y flor de *A. curassavica*

### Específicos

- Registrar el contexto etnofarmacológico de *A. curassavica*
- Analizar fitoquímicamente el extracto hidroalcohólico de tallo, hoja y flor de *A. curassavica*
- Determinar el efecto del extracto hidroalcohólico de tallo, hoja y flor de *A. curassavica* sobre la concentración plasmática de óxido nítrico
- Evaluar el efecto del extracto hidroalcohólico de tallo, hoja y flor de *A. curassavica* sobre la actividad de catalasa en plasma

## V.- MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Localidad de colecta

*A. curassavica*, fue colectado el mes de febrero del año 2012, en el Ejido Limón Chiquito, Cazones de Herrera, Veracruz (20°40'38" N y 97°16'30" O, a 8 msnm). La especie fue identificada a través de la Flora Fanerogámica del Valle de México<sup>176,177</sup> y cotejada en el Herbario FEZA, UNAM.

### 5.2 Registro de información etnofarmacológica

La información etnofarmacológica se obtuvo al realizar una entrevista (Anexo 1), dirigida exclusivamente a los habitantes del lugar de colecta que han utilizado la planta.

### 5.3 Procesamiento del material vegetal

Los tallos, hojas y flores de *A. curassavica* fueron sometidos a un lavado exhaustivo con agua destilada por separado. Posteriormente fueron triturados en un molino de mano.

### 5.4 Obtención del extracto hidroalcohólico

Cada 100 g de material fresco y molido de las partes aéreas de *A. curassavica* se sometieron a una maceración con 300 mL de una mezcla CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH:H<sub>2</sub>O (70:30) (Dibar, grado RL) en frascos ámbar por 24 horas. Posteriormente el extracto hidroalcohólico se filtró al vacío (Papel Whatman No. 4), y se concentró a temperatura ambiente en una campana de extracción.

### 5.5 Identificación de metabolitos secundarios

#### 5.5.1 Alcaloides

Los alcaloides, con excepción de los alcaloides de amonio cuaternario y N-óxidos de amina, son solubles en solventes orgánicos poco polares como el cloroformo y mezclas de éste, las cuales forman sales solubles en agua en presencia de ácidos minerales diluidos como el HCl al 5 %. Esta propiedad ácido-base se utilizó para su purificación a partir de extractos totales. Después de este proceso se realizaron pruebas de precipitación en medio ácido, utilizando sales de metales pesados como el reactivo de Dragendorff (Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O (J.T. Baker, grado RA) al 8.5% en C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (J.T. Baker, grado RA) y 8% de KI (Meyer, grado RA), mezclar con 200 mL de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>, posteriormente aforar a 1L) y el reactivo de Mayer ( 2.2% de HgCl<sub>2</sub> (J.T. Baker, grado RA) en KI al 25%, mezclar, y aforar a 1L).

Estas reacciones de precipitación se basan en un intercambio del anión del reactivo en acción, que reemplaza a los aniones pequeños de las sales de los alcaloides. Estos principios activos poseen un grupo amino que les confiere propiedades alcalinas que al ser llevados a un medio ácido se protonan e interaccionan electrostáticamente con aniones específicos de cada reacción.<sup>133,134</sup> El reactivo de Dragendorff genera un precipitado naranja debido a la geometría octaédrica y una carga de -2 del bismuto que interacciona con dos moléculas de alcaloides protonados. Por el contrario la reacción de Mayer presenta como metal de coordinación al mercurio (Hg<sup>2+</sup>) que da un precipitado blanco-amarillento. En la figura 8 se describe el procedimiento de purificación de los alcaloides.

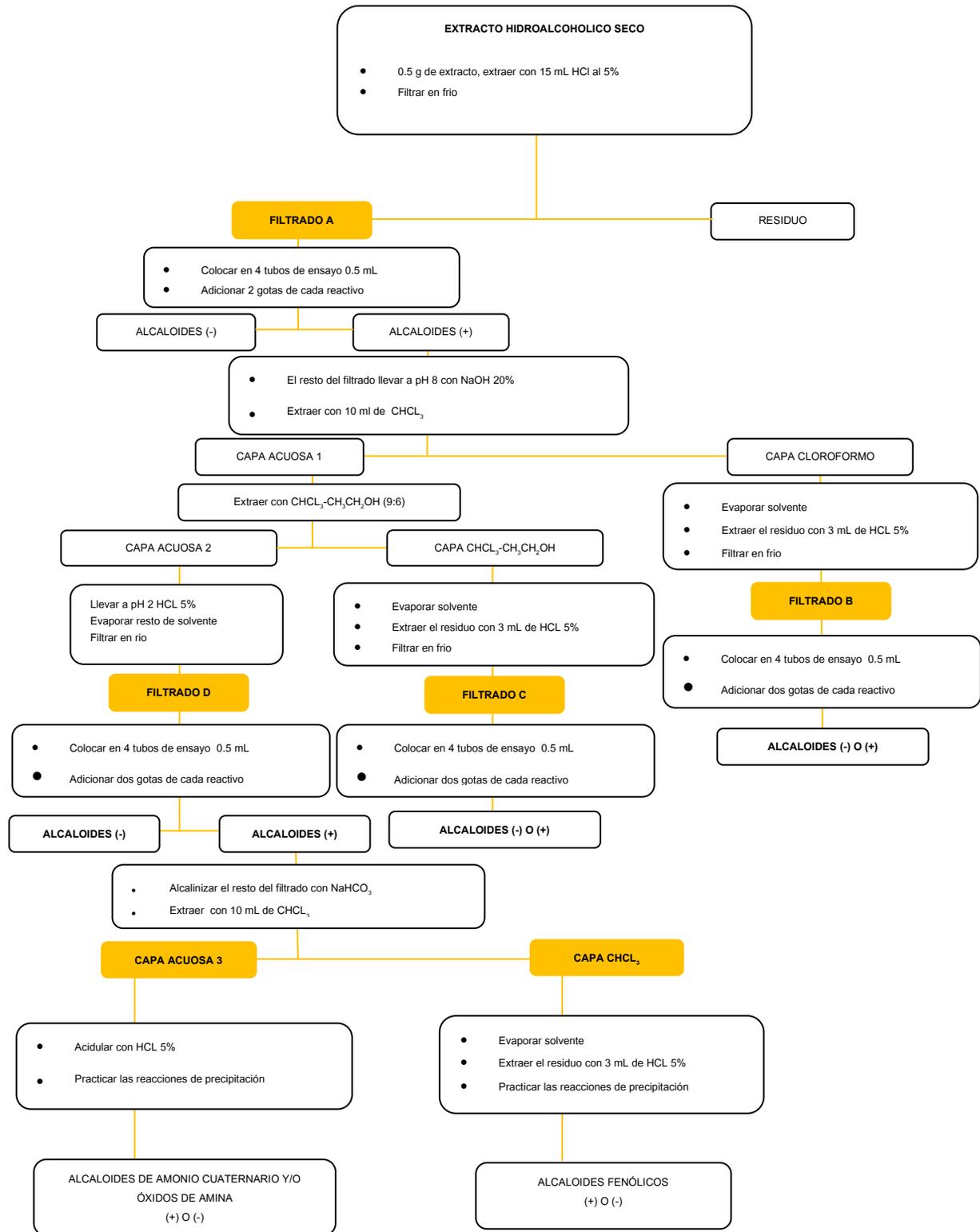


Fig. 8. Análisis preliminar de alcaloides

### 5.5.2 Naftoquinonas y antraquinonas

Son pigmentos naturales que poseen grupos carbonilo, hidroxilo o metilo como sustituyentes en forma libre o condensada con diversos monosacáridos que al ser tratadas con soluciones alcalinas forman complejos de color rojo cereza. Con base en lo anterior se empleó la reacción de Bornträger-Kraus, la cual consistió en extraer 500 mg de extracto seco con una solución  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  (1:7), posteriormente se le adicionó 2 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Meyer, grado RA) y  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Reasol, grado RA); seguido de un calentamiento por 5 min; bajo estas condiciones se hidrolizan los enlaces glicosídicos y se oxidan las antronas y antronoles hasta antraquinonas, éstas fueron extraídos con 2 mL de  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$  (J.T Baker, grado RA) y agitadas con 2 mL de NaOH al 5% (J.T. Baker, grado RA) que contiene 2% de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (J.T. Baker, grado RA). En caso de presencia, al dejar separar la capa alcalina toma una coloración rosa al rojo intenso.

### 5.5.3 Esteroides y triterpenoides libres

Los triterpenoides son compuestos con un esqueleto carbonado de seis unidades de isopreno derivados del escualeno, hidrocarburo acíclico de 30 carbonos. Éstos pueden contener grupos hidroxilo, cetona, aldehído y ácidos carboxílicos, muy relacionados con los esteroides y que en contacto con soluciones ácidas forman dobles enlaces dando tonalidades rojas, azules o verdes. Para su identificación se utilizó el reactivo de Liebermann-Burchard ( $\text{CHCl}_3$  y  $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$  (1:1)(Sigma, grado RA) en medio ácido ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ).

Esta reacción se lleva a cabo en un medio anhidro, ya que al existir moléculas de agua estas reaccionan con el anhídrido acético, anulando de esta manera la formación de un agente oxidante, muy necesario para el desarrollo de la prueba de identificación de éstos. De esta manera, el cloroformo solubiliza la muestra, favoreciendo la captación de moléculas de agua presentes, debido a que es un solvente inmiscible. Por el contrario el ácido sulfúrico reacciona con el anhídrido acético, dando lugar a la liberación de hidrogeniones, los cuales catalizan la dimerización del triterpeno inicial y además, la formación de trióxido de azufre, el agente oxidante que generará un compuesto coloreado.<sup>133,136,137</sup> Para ello, 5  $\mu\text{L}$  de un stock de 500 mg/mL de extracto hidroalcohólico se sometió a cromatografía bidimensional empleando cromatofolios en base de aluminio (Silica gel 60 F<sub>254</sub>, Merk) como fase estacionaria y fases móviles ( $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  (87:17:1) (J.T. Baker, grado RA);  $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  (50:6.5:5) (J.T. Baker, grado RA)). El cromatograma desarrollado se dejó secar, posteriormente se reveló con el reactivo de Liebermann-Burchard y se sometió a calentamiento (110 °C) durante 2 min.

### 5.5.4 Flavonoides

Los flavonoides son estructuras de tipo  $\text{C}_6-\text{C}_3-\text{C}_6$  con dos anillos aromáticos (bencénicos) unidos entre sí por una cadena de 3 carbonos ciclada a través de un oxígeno, solubles en mezclas hidroalcohólicas. Estos pueden formar complejos con metales como  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ , que al acidularlas viran a reacciones coloreadas. Con base en lo anterior se empleó la reacción de Shinoda, donde el magnesio metálico es oxidada por el ácido clorhídrico concentrado dando como producto al hidrogeno molecular y cloruro de magnesio. Este último forma complejos con los flavonoides dando coloraciones definidas. Para el caso de flavonas, el magnesio divalente actúa sobre su grupo carbonilo, produciendo una coloración naranja, en los flavonoles el magnesio divalente presenta dos enlaces de coordinación fuertes y dos débiles; los primeros son formados por los oxígenos de los grupos carbonilos y los segundos por los hidroxilos de la posición 3, de esta manera la intensidad aumenta dando una

coloración roja. Con respecto a las flavonas el magnesio divalente produce un movimiento de electrones generando una coloración violeta.<sup>134</sup> Para ello, 500 mg de extracto se disolvió en  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  (1:7) y se filtró. En tubos de ensayo se adicionaron limaduras de magnesio (J.T. Baker, grado RA) con 0.2, 0.6 y 1 mL del filtrado. Posteriormente se adiciono HCl gota a gota hasta el desprendimiento del hidrogeno. La aparición de coloración rojiza, violeta o naranja, se considera positivo para compuestos con el núcleo de la  $\gamma$ -benzopirona (flavonas, flavonoles, flavononas, flavanoles, Isoflavonoides y xantonas).

### 5.5.5 Taninos

Son polifenoles que tienen la propiedad de unirse a las proteínas y precipitarlas. Por esta propiedad se empleó 1 mL del Reactivo Gelatina-sal (1% gelatina en 10% NaCl (J.T. Baker, grado RA)), el cual produce un precipitado blanco, luego de haber extraído 500 mg de extracto con  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  (7:1). Estos deben ser solubles en  $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$  (J.T. Baker. G.A) 10 M y producir coloraciones verdes, azules o negras tras la adición de 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Mallinckrod, G.A) al 10%.

### 5.5.6 Saponinas

Son glicósidos cuya aglicona consiste en un núcleo esteroidal o triterpénico; esta característica estructural les confiere un carácter anfótero que les permite actuar como tensoactivos. Con base en lo anterior, se empleó la prueba de formación de espuma (estable por 30 min), la cual consiste en agitar una solución acuosa (7:1) de 500 mg de extracto en un tubo de ensayo.

### 5.5.7 Glicósidos cardiotónicos

Son heterósidos formados por una parte glucídica constituida por una o varias unidades de azúcar y un aglicón, con un núcleo esteroidico ( $\text{C}_{27}$ , tetracíclico) unido a un anillo lactónico insaturado.<sup>162</sup> Para su identificación se emplearon reactivos de coloración para cada una de las unidades constituyentes, para ello se preparó un stock de 500 mg/mL de extracto, posteriormente en tubos de ensayo se adicionaron 0.2 y 0.6 mL llevados a 1 mL con  $\text{H}_2\text{O}$ , se adicionó 1 mL del Reactivo Keller-Killiani ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  2% en  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (Mallinckrod, G.A), 1-3 gotas de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y observar coloración verde o pardo en caso de presencia de azucars, para el núcleo esteroidal 1 mL del Reactivo Lieberman-Burchard (100 mL  $\text{CHCl}_3$  y  $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ ), 1-3 gotas de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , observar tonalidades rosa, rojo, azules o verdes, y para la lactona, 1-3 gotas del Reactivo de Baljet (1% Acido pícrico (J.T. Baker) en  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$  y 10% NaOH), observar un color rojo-naranja estable.

### 5.5.8 Cumarinas

Son compuestos derivados de la  $\alpha$ -benzopirona. Estos compuestos exhiben una fuerte fluorescencia azul o verde al ser irradiadas con luz UV (254-365), propiedad retomada para su identificación. Para ello, 5  $\mu\text{L}$  de un stock de 500 mg/mL de extracto hidroalcohólico se sometió a cromatografía bidimensional, empleando cromatofolios en base de aluminio como fase estacionaria y fase móvil ( $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  (87:17:1);  $\text{CHCl}_3:(\text{CH}_3)_2\text{CO}$  (90:10) (J.T. Baker, grado RA)). Una vez eluida se observó a luz UV (365 y 254 nm) antes de revelarse con la reacción de Hidroxamato férrico (Clorhidrato de hidroxilamina (J.T. Baker, grado RA) 2% en  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$  y NaOH 2N), calentar (2-5 min) a 100 °C, dejar enfriar y asperjar con una solución de HCl 2N y 1%  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  en  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ . Aquellos compuestos con fluorescencia al ultravioleta que exhiben coloración naranja son considerados cumarinas.

### 5.5.9 Lactonas sesquiterpénicas

Son terpenos con un esqueleto de 15 átomos de carbono, que tienen en su estructura una lactona. Para su identificación se aplicó la técnica indicada para cumarinas, esteroides y triterpenos libres. Ambas pruebas deben ser positivas para concluir la presencia de este metabolito secundario.

### 5.6 Inducción de carcinoma a modelos experimentales

Protocolo basado con modificaciones en el método estandarizado por Ortíz *et al.* 1995.<sup>116</sup> Se administró una dosis intramuscular de 20mg/Kg de NiO (Sigma, grado RA)) a 7 grupos (5 ratones hembra, CD-1) de un mes de edad.

### 5.7 Tratamiento con extractos hidroalcohólicos

Después de tres meses en tratamiento con NiO se administraron dos dosis de cada extracto hidroalcohólico (35 y 20 mg/Kg, basado en un DL<sub>50</sub> 50 mg/Kg) durante 9 días.

### 5.8 Obtención de plasma

Las grupos experimentales fueron sacrificados por decapitación y desangrados en tubos con EDTA, los cuales fueron centrifugados (C-600, SOLBAT) a 5000 rpm durante 5 min a una temperatura de 4 °C y almacenadas en hielo hasta el momento de su análisis.

### 5.9 Cuantificación de NO por el método de Griess

La reacción de Griess se basa en la formación de un cromóforo magenta por la reacción de sulfanilamida con nitrito en medio ácido, seguido de un acoplamiento con aminas bicíclicas tales como N-(1-naftil) etilendiamina (Fig. 2). Para su cuantificación se tomaron 25 µL de plasma; simultáneamente se preparó una curva patrón de NaNO<sub>2</sub> (J.T. Baker, grado RA), en concentración de 0 a 100 µM, de la disolución stock de NaNO<sub>2</sub> se realizaron las disoluciones pertinentes. Se adicionó de manera secuencial 1 mL de Sulfanilamida (J.T. Baker, grado RA) 2% (p/v) en H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (J.T. Baker, grado RA) al 5% (v/v) y 1 ml de diclorhidrato de N-(1-naftil) etilendiamina (J.T. Baker, grado RA) al 2% (p/v), incubándose a temperatura ambiente durante 45 minutos antes de leer la absorbancia a 540 nm en el espectrofotómetro UV (Genesys 20, 4001/4, Thermo Fisher Scientific).

### 5.10 Cuantificación de proteína total por el método de Biuret

Se basa en la formación de un cromóforo violeta por la reacción del Cu<sup>2+</sup> y cuatro grupos NH de los enlaces peptídicos en medio básico. Con base en lo anterior se tomaron 25 µL de plasma; simultáneamente se preparó una curva patrón de albumina de huevo (Sigma), en el intervalo de concentración de 0 a 10 mg/ml, en donde de la disolución patrón de albumina de huevo se realizaron las disoluciones pertinentes. Se adicionó de manera secuencial 1 mL de reactivo de Biuret, incubándose a temperatura ambiente durante 10 minutos antes de leer la absorbancia a 545 nm en el espectrofotómetro UV (Genesys 20, 4001/4, Thermo Fisher Scientific).

### 5.11 Actividad de catalasa por el método de Chance y Machley

Protocolo basado con modificaciones, en el método estandarizado de Chance y Machley (1954).<sup>117</sup> Se base en el principio de que la catalasa es capaz de reducir al  $H_2O_2$  en una molécula de agua y  $\frac{1}{2}$  de oxígeno molecular. Para determinar esta reacción se midió la descomposición del  $H_2O_2$  a 240 nm como se menciona a continuación:

Se mezclaron en una cubeta de cuarzo: 1450  $\mu$ L de sustrato ( $H_2O_2$  30 mM en solución PBS, pH 7.0) (LASA, grado RL) y 50  $\mu$ L de plasma. Se registró la absorbancia a 240 nm ( $A_{240}$ ) (UNICO, S-2150 UV) cada 10 s durante 3 min. Se calculó el cambio en la absorbancia a 240 nm por minuto ( $\Delta A_{240}$ ) como la pendiente de la parte lineal de la gráfica de  $A_{240}$  contra el tiempo.

Se calculó la actividad de catalasa con la siguiente ecuación:

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

Donde  $\epsilon$  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 ( $1500/50 = 30$ ). Se corrigió por la concentración de proteína en cada muestra (determinada por el método de Biuret), utilizando la siguiente fórmula:

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

Una unidad de catalasa se definió como la cantidad de enzima necesaria para reducir un  $\mu\text{mol}$  de  $H_2O_2$ /minuto.

### 5.12 Análisis estadístico

Los datos fueron sometidos a análisis estadístico de varianza, considerado éste como no paramétrico en un nivel de confianza del 95%. Los datos significativos fueron representados como ( $p < 0.05$ ).<sup>118</sup>

## VI.- RESULTADOS

### 6.1 Registro etnofarmacológico de *A. curassavica*

Es importante mencionar que este registro etnofarmacológico está fundamentado en una entrevista directa a 10 personas que hicieron uso de esta planta, de los cuales, tres fueron hombres y siete mujeres. La edad se encuentra entre los 23 a 53 años, las propiedades atribuidas son dermatológicas, antiinflamatorias, anestésicas y antihemorroidales. El látex es la parte más empleada sin ningún tratamiento previo, seguida de las flores, tallos y hojas frescas donde se prepararon extracciones hidroalcohólicas y cataplasmas. Las administraciones fueron tópicas hasta la desaparición del daño tisular, presentándose efectos irritantes ligeros (tabla 10).

Tabla 10. Registro etnofarmacológico de *A. curassavica*

No.	Edad	Sexo	Propiedad	Parte empleada	Preparación	Administración	Efecto
1	23	H	Dermatológico	Tallo	Extracto hidroalcohólico	Tópica	Irritante
2	45	H	Antihemorroidal	Flor	Cataplasma	Tópica	Irritante
3	35	H	Dermatológico	Látex y hoja	Extracto hidroalcohólico	Tópica	Irritante
4	53	M	Antihemorroidal	Flor	Cataplasma	Tópica	Irritante
5	46	M	Anestésico	Látex	Directo	Tópica	Irritante
6	24	M	Dermatológico	Látex	Directo	Tópica	Irritante
7	56	M	Anestésico	Látex	Directo	Tópica	Irritante
8	49	M	Antiinflamatorio, Dermatológico	Látex	Directo	Tópica	Irritante
9	44	M	Antiinflamatorio, Dermatológico	Látex	Directo	Tópica	Irritante
10	48	M	Antiinflamatorio, Dermatológico	Látex	Directo	Tópica	Irritante

### 6.2 Análisis fitoquímico de los extractos hidroalcohólicos de *A. curassavica*

Para el estudio fitoquímico de *A. curassavica* se obtuvo un extracto hidroalcohólico (70:30) de tallo, hoja y flor, con aspecto de masa homogénea, consistencia blanda, color verde oscuro y café para el caso de flor, libre de partículas extrañas. Con rendimientos de 3.93, 2.43 y 2.72 % por cada 100 g de vegetal respectivamente. El análisis fitoquímico muestra la presencia de alcaloides, flavonoides, glicósidos cardiotónicos, cumarinas, lactonas sesquiterpénicas, esteroides y triterpenos libres (Tabla 11).

Tabla 11. Análisis fitoquímico de *A. curassavica*

Metabolito secundario	Órgano			
	Tallo	Hoja	Flor	
Alcaloides	Filtrado A	+	++	+++
	Filtrado B	-	-	-
	Filtrado C	-	-	-
	Filtrado D	+	++	+++
	Capa acuosa 3	+	++	+++
	Capa cloroformo	-	-	-
Naftoquinonas y antraquinonas	-	-	-	
Esteroides y triterpenoides libres	+++	++	+	
Flavonoides	-	-	+++	
Taninos	-	-	-	
Saponinas	-	-	-	
Glicósidos cardiotónicos	++	+++	+	
Cumarinas	+++	++	+	
Lactonas sesquiterpénicas	+++	++	+	

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

### 6.3 Efecto de los extractos hidroalcohólicos de *A. curassavica* sobre los niveles de NO

Los resultados indican un aumento significativo en los niveles de óxido nítrico plasmático en el grupo inducido a cáncer con óxido de níquel con respecto al control. Por el contrario los grupos inducidos a cáncer y tratados con el extracto hidroalcohólico de tallo, hoja y flor de *A. curassavica* disminuyeron las concentraciones de éste. El extracto de flor a dosis alta presenta niveles de óxido nítrico muy por debajo del control, para el caso del extracto de tallo y hoja muestran resultados significativos a dosis bajas (Fig. 9).

Los extractos hidroalcohólicos de *A. curassavica* generaron variaciones sobre los niveles plasmáticos de este radical durante los nueve días de tratamiento. El grupo inducido a cáncer aumento sus concentraciones durante los días de tratamiento con respecto al control, por el contrario los grupos inducidos a cáncer y tratados con el extracto hidroalcohólico de tallo, hoja y flor presentaron una disminución al tercer día, al quinto un aumento y posteriormente su declive en los días restantes (Fig. 10).

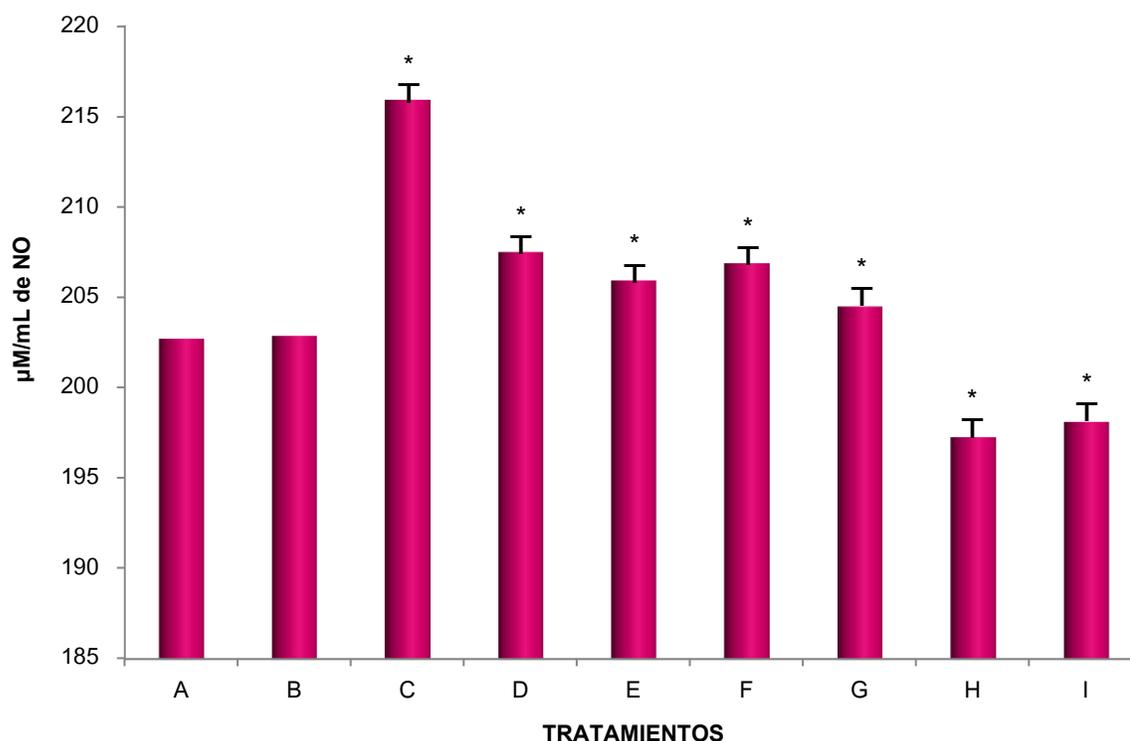


Fig. 9. Efecto de los extractos hidroalcohólicos de *A. curassavica* sobre los niveles de NO en plasma de ratones hembra (CD-I) inducidas a cáncer.

Grupo A: control negativo; Grupo B: vehículo (aceite de oliva); Grupo C: control positivo (inducción a cáncer con NiO); Grupo D: experimental (inducción a cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de tallo dosis alta (35 mg/Kg); Grupo E: experimental (inducción a cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de tallo dosis baja (20 mg/Kg); Grupo F: experimental (inducción a cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de hoja dosis alta (35 mg/Kg); Grupo G: experimental (inducción a cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de hoja dosis baja (20 mg/Kg); Grupo H: experimental (inducción a cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de flor dosis alta (35 mg/Kg); Grupo I: experimental (inducción a cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de flor dosis baja (20 mg/Kg). Los valores del análisis estadístico representan al menos tres experimentos independientes realizados por hexaplicado.

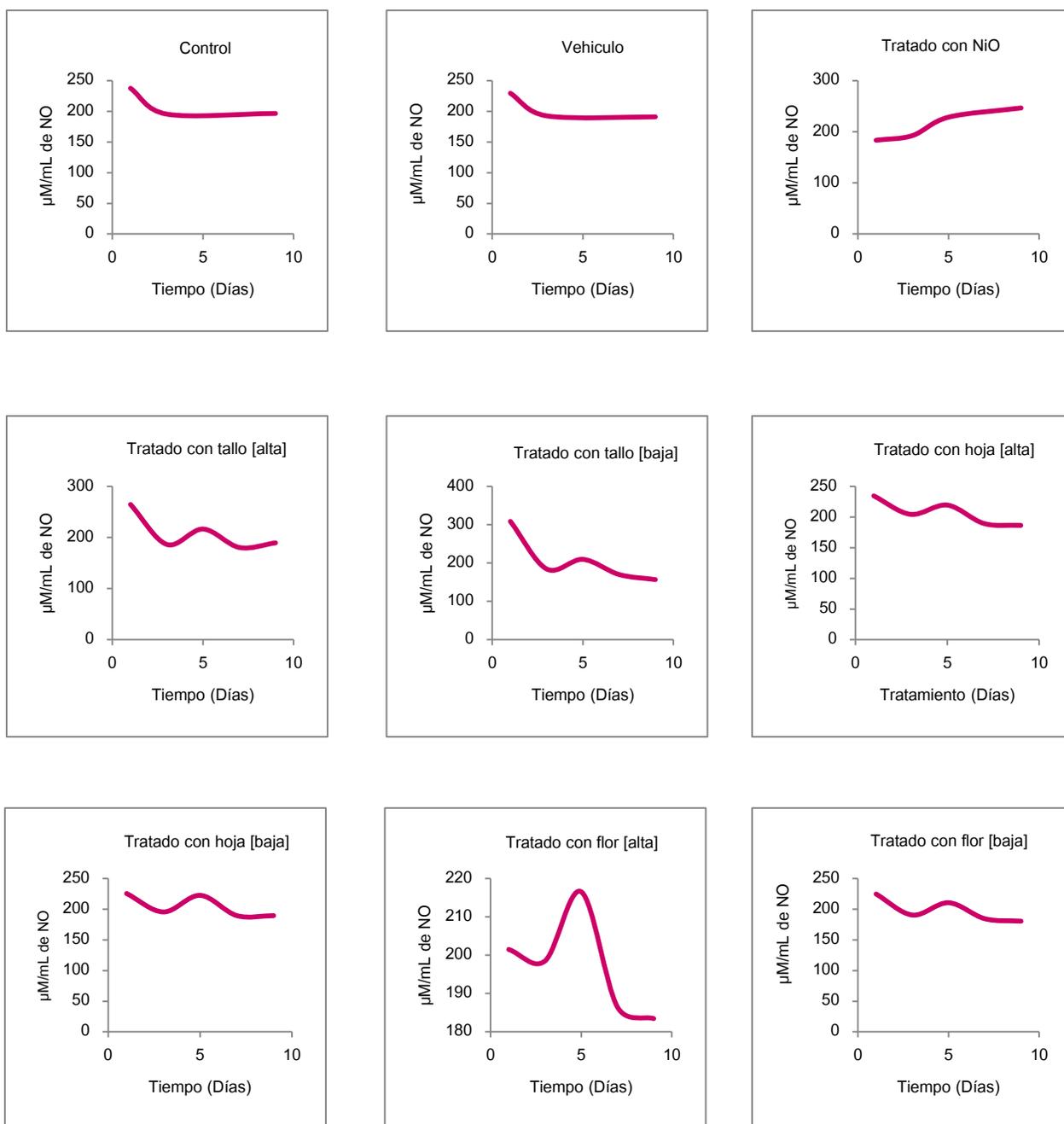


Figura 10. Efecto de los extractos hidroalcohólicos de *A. curassavica* sobre los niveles de NO en plasma de ratones hembra (CD-I) inducidas a cáncer, en un periodo de 9 días.

Grupo A: control negativo; Grupo B: vehículo (aceite de oliva); Grupo C: control positivo (inducción a cáncer con NiO); Grupo D: experimental (inducción a cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de tallo dosis alta (35 mg/Kg); Grupo E: experimental (inducción a cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de tallo dosis baja (20 mg/Kg); Grupo F: experimental (inducción a cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de hoja dosis alta (35 mg/Kg); Grupo G: experimental (inducción a cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de hoja dosis baja (20 mg/Kg); Grupo H: experimental (inducción a cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de flor dosis alta (20 mg/Kg); Grupo I: experimental (inducción a cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de flor dosis baja (20 mg/Kg). Los valores del comportamiento grafico representan al menos tres experimentos independientes realizados por hexaplicado.

## 6.4 Efecto de los extractos hidroalcohólicos de *A. curassavica* en la actividad de catalasa

Los resultados muestran una disminución significativa de la actividad plasmática de catalasa en el grupo inducido a cáncer con óxido de níquel con respecto al control. Por el contrario, los grupos inducidos a cáncer y tratados con el extracto hidroalcohólico de tallo, hoja y flor de *A. curassavica* aumentaron la actividad de esta enzima antioxidante. Los extractos de tallo y hoja a dosis baja presentan las actividades más significativas, seguida de flor a dosis alta, esto con referencia al grupo inducido a cáncer (Fig. 11).

Los extractos hidroalcohólicos de *A. curassavica* muestran variaciones sobre las actividades plasmáticas de esta enzima durante los nueve días de tratamiento. En el grupo inducido a cáncer se vio disminuida su actividad de catalasa durante los días de tratamiento con respecto al control, por el contrario los grupos inducidos a cáncer y tratados con el extracto hidroalcohólico de tallo, hoja y flor generaron un aumento al tercer día, al quinto una disminución y en los días restantes un incremento fue observado (Fig. 12).

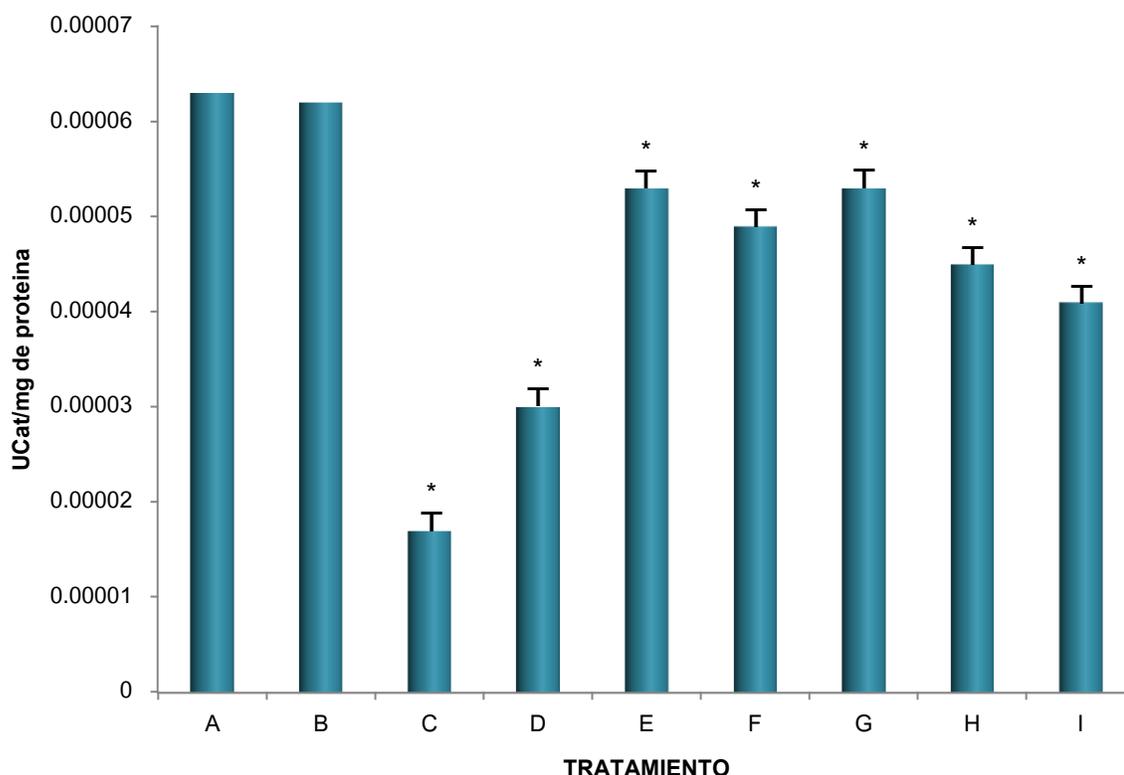


Fig. 11. Efecto de los extractos hidroalcohólicos de *A. curassavica* sobre la actividad de catalasa en plasma de ratones hembra (CD-1) inducidas a cáncer.

Grupo A: control negativo; Grupo B: vehículo (aceite de oliva); Grupo C: control positivo (inducción a cáncer con NiO); Grupo D: experimental (inducción a cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de tallo dosis alta (35 mg/Kg); Grupo E: experimental (inducción a cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de tallo dosis baja (20 mg/Kg); Grupo F: experimental (inducción a cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de hoja dosis alta (35 mg/Kg); Grupo G: experimental (inducción a cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de hoja dosis baja (20 mg/Kg); Grupo H: experimental (inducción a cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de flor dosis alta (35 mg/Kg); Grupo I: experimental (inducción a cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de flor dosis baja (20 mg/Kg). Los valores del análisis estadístico representan al menos tres experimentos independientes realizados por hexaplicado.

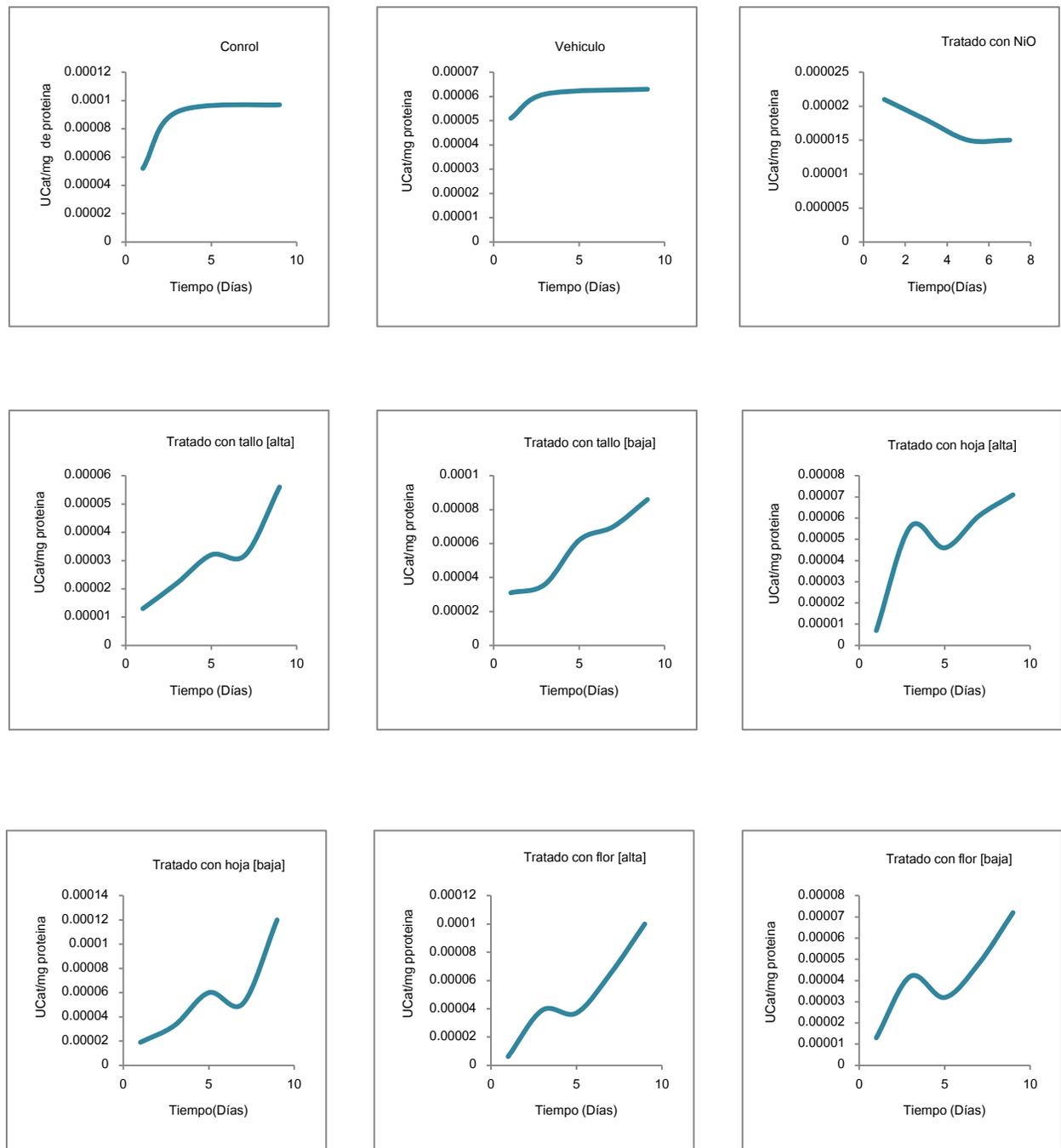


Fig. 12. Efecto de los extractos hidroalcohólicos de *A. curassavica* sobre la actividad de catalasa en plasma en ratones hembra (CD-I) inducidas a cáncer, en un periodo de 9 días.

Grupo A: control negativo; Grupo B: vehículo (aceite de oliva); Grupo C: control positivo (inducción a cáncer con NiO); Grupo D: experimental (inducción a cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de tallo dosis alta (35 mg/Kg); Grupo E: experimental (inducción a cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de tallo dosis baja (20 mg/Kg); Grupo F: experimental (inducción a cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de hoja dosis alta (35 mg/Kg); Grupo G: experimental (inducción a cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de hoja dosis baja (20 mg/Kg); Grupo H: experimental (inducción a cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de flor dosis alta (35 mg/Kg); Grupo I: experimental (inducción a cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de flor dosis baja (20 mg/Kg). Los valores del análisis estadístico representan al menos tres experimentos independientes realizados por hexaplicado.

## VII.- DISCUSIÓN

En 1979 River y Bruhn definieron a la Etnofarmacología como un área multidisciplinaria fundamentada en la observación, descripción e investigación experimental de los recursos (vegetal, animal o mineral) usados como medicamentos por los pueblos indígenas. La visión de esta disciplina ha cambiado durante los últimos 34 años consolidándose como un medio potencial para la validación y optimización del conocimiento tradicional.<sup>119-124</sup> Por el contrario la etnobotánica es un campo científico que estudia las interrelaciones que se establecen entre el hombre y las plantas, a través del tiempo y en diferentes ambientes,<sup>125</sup> teniendo como tarea primordial la integración del conocimiento tradicional con el científico.<sup>126</sup> Bajo este esquema el estudio fue dirigido a un registro etnofarmacológico al aportarnos datos relevantes para el posterior diseño experimental, cabe mencionar que la etnobotánica fue retomada en la revisión bibliográfica.

Dentro de su género *A. curassavica* es la especie más aprovechada y con mayor número de usos medicinales dentro de los que destacan como estornutatorio, laxante, purgante, emético, anestésico, dermatológico, vermífugo, antiviperino, antiinflamatorio, antihemorroidal y cicatrizante,<sup>49,59-79</sup> incluso se le atribuyen propiedades para curar el cáncer y en la actualidad se llevan a cabo estudios para probarla como agente quimioterapéutico.<sup>127,128</sup> El registro etnofarmacológico de esta especie corrobora su uso medicinal en



Fig. 11. Mama izquierda tratada con el látex de *A. curassavica*. Las flechas amarillas indican la cicatrización del daño tisular.

aplicaciones dermatológicas, antiinflamatorias, anestésicas y antihemorroidales, este registro se integró por hombres y mujeres, la edad promedio se encuentra entre los 42 años, lo que nos indica un mayor uso en personas adultas. Dentro de estas, la aplicación dermatológica y antiinflamatoria fue relevante para este estudio, ya que tres informantes presentaban erupciones con pus e inflamación alrededor de la mama, que al administrar de manera tópica el látex de esta planta generaba supuraciones y efecto desinflamatorio hasta la desaparición del daño tisular (Fig. 11), presentándose efectos irritantes ligeros. Dentro de los síntomas señalados por el Instituto Nacional de Cancerología para el cáncer de mama se encuentra la secreción anormal

a través del pezón y cambios en la coloración o en las características en la piel de la mama, lo cual podría suponerse que estos informantes se encontraban en una situación previa o similar a estos síntomas, sin embargo es importante aplicar técnicas más sensibles como la mastografía para descartar esta suposición.

Reportes científicos mencionan el uso del látex para tratar heridas, infecciones, sarna y verrugas.<sup>129-132</sup> Posiblemente estas actividades biológicas ejercidas por latex son debidas a su composición rica en enzimas proteolíticas ( $\beta$ -D-fucosidasa, fosfatasa, Asclepain cl y cII),<sup>88-92</sup> además de taninos que estarían participando en la curación de heridas, inhibición del desarrollo de bacterias y cuidado de la piel al cicatrizar.<sup>52</sup> También podrían estar involucrados en el efecto antiinflamatorio. La actividad anestésica es dada por los alcaloides fenantroindolizídicos, ya que muchos de ellos afectan el sistema nervioso central.<sup>52</sup>

Con respecto al análisis fitoquímico, se identificó la presencia de alcaloides en los tres órganos. Sin embargo, dado que la cantidad de precipitado es proporcional a la concentración de alcaloides en la muestra, puede inferirse que las flores son el órgano de la planta donde tiene lugar la mayor acumulación de estos metabolitos secundarios, aunque cabe mencionar que las hojas y tallos presentan concentraciones apreciables.

Algunos estudios químicos en especies del género *Asclepias* han demostrado que biosintetizan diversos alcaloides derivados del indol de la piridina o de la fenantroindolizidina,<sup>135</sup> la cual es corroborada con el presente estudio, ya que el proceso de purificación (filtrados A, D y capa acuosa 3) presentaron una mayor concentración de alcaloides (tabla 11). Además de la presencia de alcaloides de amonio cuaternario o N-óxidos de amina en los tres órganos de esta planta. Sin embargo, los alcaloides fenantroindolizidínicos son los más comunes para este género. Algunos de ellos han demostrado actividad citotóxica e inhibición de peroxidación de lípidos por lo que pudieran ser responsables de las propiedades medicinales y tóxicas.<sup>52</sup> Particularmente en *A. curassavica* se ha reportado la presencia de alcaloides derivados de la 2-metoxi-pirazina,<sup>84-87</sup> a la cual se le atribuyen actividades citotóxicas y probablemente ello explique su uso en el tratamiento del cáncer, además de que estos sean los responsables de las propiedades anestésicas ya que muchos alcaloides afectan el sistema nervioso central.<sup>52</sup>

La cromatografía bidimensional realizada para la detección de esteroides y triterpenos libres permitió determinar la presencia de estos compuestos en los tres órganos de esta planta, lo que se justifica en la aparición de diversas tonalidades rojas, azules y verdes (fig. 12). Los tallos presentaron un mayor número de estos metabolitos, seguida de las hojas y flores. Los Rf obtenidos para cada extracto nos indica una diferencia en cuanto a la composición de estos metabolitos secundarios, observándose una mayor separación en la fase compuesta por cloroformo, metanol y agua, sin embargo, al aplicar la segunda fase con acetato de etilo, metanol y agua hay una mayor resolución de estos (fig. 12).

Entre triterpenos y esteroides, no existen diferencias fundamentales, generalmente éstos últimos pueden ser considerados como triterpenos tetracíclicos. Tienen la capacidad de formar parte de otros compuestos como heterosidos cardiotónicos y sapogeninas, las cuales representan materias primas para la obtención de medicamentos esteroídicos como anticonceptivos, anabolizantes y antiinflamatorios.<sup>138</sup>

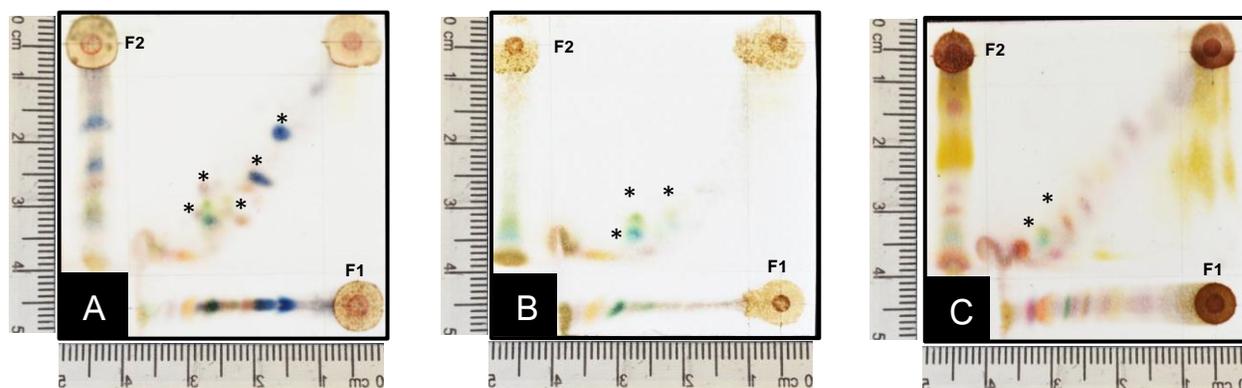


Fig. 12. Identificación de esteroides y triterpenos libres en extractos hidroalcohólicos de *A. curassavica*. Las tonalidades en color rojo, azul y verde indican la presencia de estos metabolitos secundarios (asteriscos en color negro). A: Extracto hidroalcohólico (70:30) de tallo (500mg/mL); B: Extracto hidroalcohólico (70:30) de hoja (500mg/mL); C: Extracto hidroalcohólico (70:30) de flor (500mg/mL); F1: Fase móvil (cloroformo: metanol: agua); F2: Fase móvil (Acetato de etilo: metanol: agua).

Para el caso de flavonoides, la reacción de Shinoda dio positivo únicamente para el extracto de flor, estos de tipo flavonoles, observándose un cromóforo rojo cereza al adicionar el ácido clorhídrico. Cabe mencionar que la formación del cromóforo aumenta con respecto a las concentraciones experimentales (12.5, 37.5 y 62.5 mg/mL) la cual es proporcional a la cantidad de flavonoides (fig. 13). Es importante mencionar que estos compuestos no han sido reportados para esta planta, por ello es necesario profundizar en su estudio.

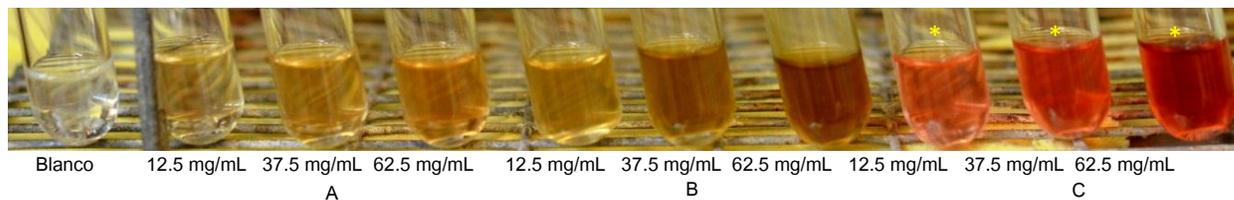


Fig. 13. Identificación de flavonoides en extractos hidroalcohólicos de *A. curassavica*. La formación del cromóforo rojo indica la presencia de estos metabolitos secundarios (asteriscos en color amarillo).

A: Extracto hidroalcohólico (70:30) de tallo; B: Extracto hidroalcohólico (70:30) de hoja; C: Extracto hidroalcohólico (70:30) de flor.

Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos con excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición.<sup>139</sup> Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo y tienen efectos terapéuticos en diversas patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis y el cáncer.<sup>140</sup> Algunos flavonoides han mostrado actividad antiinflamatoria *in vitro* e *in vivo*.<sup>144</sup> Uno de estos mecanismos es por inhibición de eicosanoides generadores de enzimas, incluyendo fosfolipasa A2, ciclooxigenasa y lipoxigenasa, reduciendo así la presencia de prostanoïdes y leucotrienos. Además, recientes estudios muestran que los flavonoides, especialmente flaonas y sus derivados, expresan una gran actividad antiinflamatoria debido a la modulación de la expresión de genes proinflamatorios, tales como ciclooxigenasa-2, óxido nítrico sintasa inducible y varias citocinas.<sup>145,146</sup>

Estos metabolitos secundarios inducen apoptosis al activar la caspasa 8 y Bax, inhiben la expresión del Bcl-2 y permiten la liberación de citocromo C.<sup>147</sup> También, poseen actividad anti-angiogénica, al suprimir la proliferación del factor de crecimiento vascular (VEGF).<sup>148</sup> Sus propiedades antioxidantes se dirigen fundamentalmente hacia los radicales hidroxilo y superóxido, especies altamente reactivas implicadas en el inicio de la cadena de peroxidación lipídica y se ha descrito su capacidad de modificar la síntesis de eicosanoides (con respuestas anti-prostanoïde y anti-inflamatoria), de prevenir la agregación plaquetaria (efectos antitrombóticos) y de proteger a las lipoproteínas de baja densidad de la oxidación (prevención de la placa de ateroma)<sup>149,150,151</sup>

Además de sus conocidos efectos antioxidantes, los flavonoides presentan otras propiedades que incluyen la estimulación de la comunicación celular a través de las uniones en hendidura, el impacto sobre la regulación del crecimiento celular y la inducción de enzimas de detoxificación tales como las monooxigenasas dependientes de citocromo P-450, entre otras.<sup>152</sup> Numerosos estudios reportan la acción antiproliferativa, antimutagénica, anticarcinogénica, así como el papel de agente quimiopreventivo de los flavonoides.<sup>153,154</sup> Entre los numerosos fenómenos que tienen lugar durante el proceso carcinogénico y que ofrecen opción para la modulación mediante factores externos, se encuentran la formación de metabolitos carcinógenos, que se forman por la acción de enzimas citosólicas y microsómicas, estas enzimas controlan este paso crítico en el proceso carcinógeno.

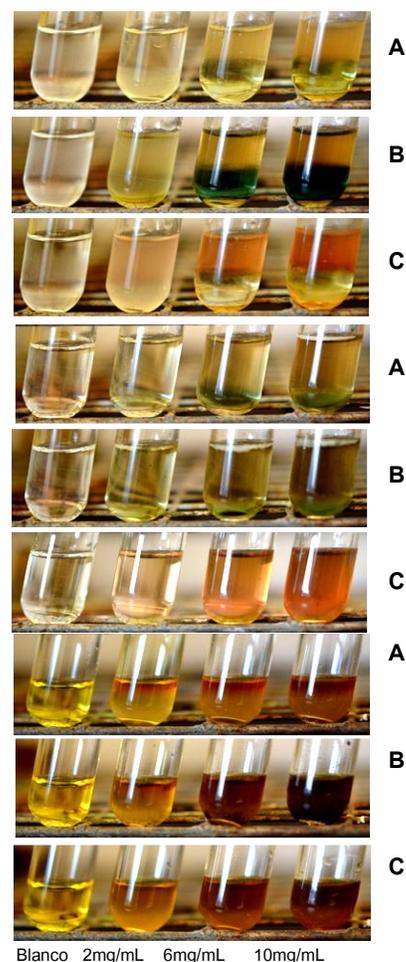
La quercetina, es uno de los flavonoides con potencial efecto quimiopreventivo frente a células cancerígenas de colon en humanos,<sup>155</sup> glándula mamaria y ovario,<sup>156</sup> en región gastrointestinal<sup>157</sup> y en la leucemia.<sup>158,159</sup> Una posible explicación a estas actividades puede deberse al incremento en las concentraciones intracelulares de glutatión a través de la regulación de la expresión de la enzima limitante en su síntesis.<sup>160</sup> Con lo que respecta a la prevención del cáncer de mama, puede deberse a su potente capacidad de inhibir la actividad de la aromatasas, evitando de esta forma la conversión de andrógenos en estrógenos.<sup>161</sup>

Los glicósidos cardiotónicos se identificaron con mayor concentración en hojas, seguida de tallos y flores. Cabe mencionar que la formación del cromóforo aumenta con respecto a las concentraciones experimentales (2mg/mL, 6mg/mL y 10mg/mL) la cual es proporcional a la cantidad de las estructuras de estos metabolitos secundarios (fig. 14).

Los glicósidos cardiotónicos son representativos de este género. En *A. curassavica* se han identificado numerosos cardenolidos en las partes aéreas,<sup>84,87,93</sup> glicósidos esteroidales en raíz<sup>59,94-100</sup> y semillas.<sup>101</sup> Dentro de estos, la Calotropina, voruscharina 16 $\alpha$ -acetoxicalotropina, 15 $\beta$ -hidroxicalotropina, calactina, 15 $\beta$ -hidroxicalactina, asclepina, 16 $\alpha$ -hidroxiasclepina, uscharidina, uscharina y uzarigenina (fig. 15).<sup>59, 94-96</sup>

La continua eficacia de glicósidos cardiotónicos, los han convertido en medicamentos de elección para el tratamiento de la insuficiencia cardiaca congestiva y como agentes antiarrítmicos. Sin embargo, es menos conocido, el papel emergente de esta categoría de compuestos en la prevención y/o tratamiento de enfermedades proliferativas como el cáncer.<sup>163</sup> Nuevos hallazgos dentro de los últimos cinco años han revelado que estos compuestos participan en los mecanismos de transducción de señal celular compleja, resultando en control selectivo de tumores humanos pero no en la proliferación celular normal.<sup>163</sup>

Fig. 14. Identificación de estructuras de los glicósidos cardiotónicos en extractos hidroalcohólicos de *A. curassavica*. Cromóforo verde indica azúcares (Reactivo Keller-Killiani), núcleo esteroidal coloración verde o pardo (Reactivo Lieberman-Burchard) y el Reactivo de Baljet para la lactona observándose un color rojo-naranja estable. A: Extracto hidroalcohólico (70:30) de tallo; B: Extracto hidroalcohólico (70:30) de hoja; C: Extracto hidroalcohólico (70:30) de flor.



El uso potencial de los glicósidos cardiotónicos para el tratamiento del cáncer, fue inicialmente investigado hace cuarenta años, pero se abandonó debido a la toxicidad de estos compuestos; ya que los agentes quimioterápicos aceptables deben actuar con una cierta especificidad que permita una ventana terapéutica, es decir, una situación en que la dosis empleada suponga más beneficio que los efectos secundarios tóxicos. Así, el ensayo inicial más común de la actividad anticancerígena de un compuesto o extracto es su capacidad para inhibir el crecimiento de células tumorales en cultivos.<sup>164,165</sup>

Mecanismos moleculares refieren la actividad anticancerígena de los glicósidos cardiotónicos a través del incremento de la expresión de Fas, incremento en la producción de ROS, inhibición de la topoisomerasa II, alteración de la fluidez de la membrana, alteración en los perfiles de expresión génica, incremento en los niveles de p21, alteración en la homeostasis de  $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Ca^{++}$ .<sup>166</sup> Cabe mencionar que los mecanismos aún no están totalmente dilucidados.

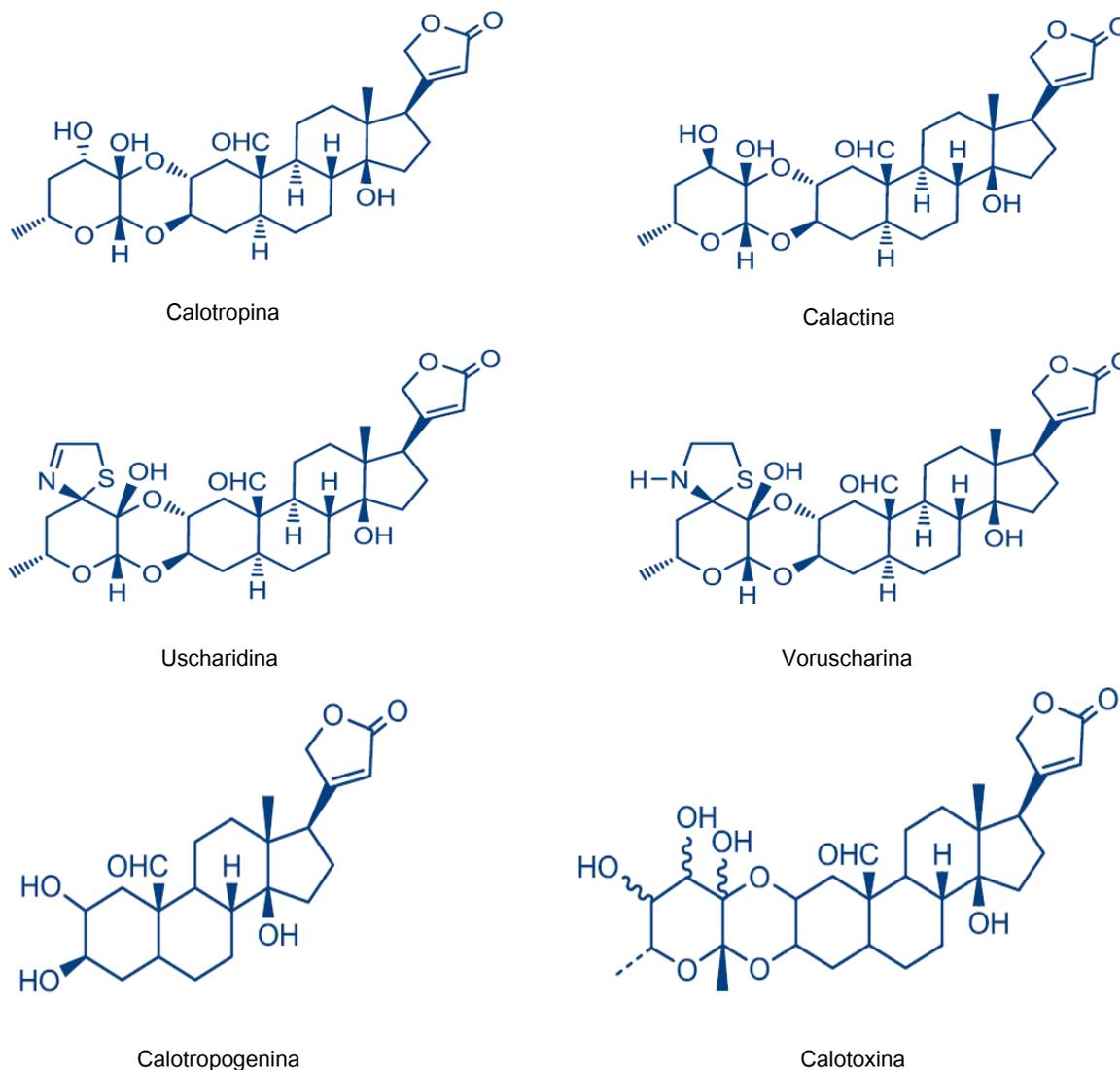


Fig. 15. Glicósidos cardiotónicos de las partes aéreas de *A. curassavica*.

Reportes de *A. curassavica* revelan actividades citotóxicas frente a líneas celulares A 549, MCF-7, MDA-MB-231, HepG2, SiHa y Raji.<sup>98,105,106</sup> La calotropina es un glicósido cardiotónico aislado de esta planta que tiene un efecto citotóxico en células K562, a través de la activación de caspasas.<sup>104</sup> El  $\beta$ -sitosterol, es otro principio activo con alto potencial quimiopreventivo contra las especies reactivas de oxígeno, en un modelo de cáncer de colon *In vitro* e *In vivo*.<sup>108</sup> Además de presentar actividad antifúngica para *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Clostridium histolyticum* y *Escherichia coli*.<sup>102,103,109</sup>

Para la detección de cumarinas se aplicó una cromatografía bidimensional, como fase móvil una mezcla de  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  (87:17:1) y  $\text{CHCl}_3:(\text{CH}_3)_2\text{CO}$  (90:10), esta última permitió una mejor separación de estos metabolitos, encontrándose a si una fuerte fluorescente naranja bien definida en el extracto de tallo, posteriormente en la de hoja y flor (fig. 16). Estas son justificadas al ser reveladas con la reacción del Hidroxamato férrico. Este metabolito no está reportado en la literatura científica para este género y particularmente para *A. curassavica*. De manera que es necesario aplicar técnicas más sensibles para su validación.

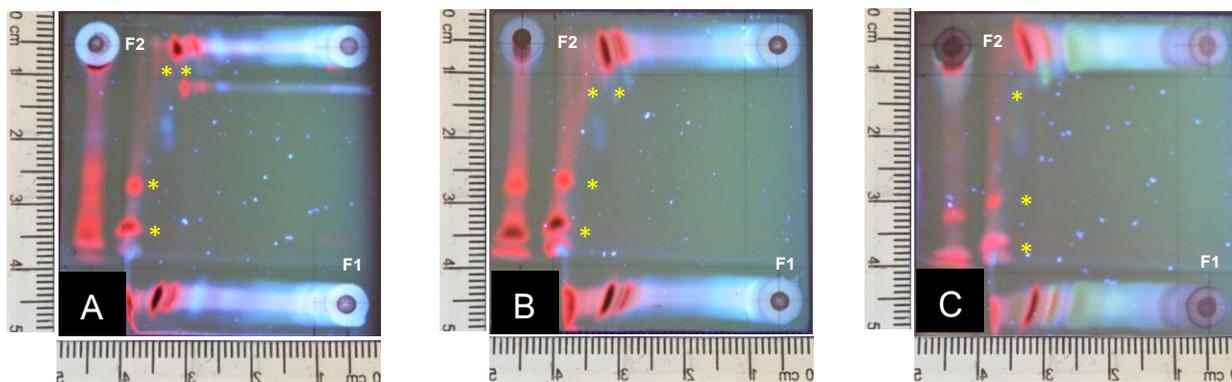


Fig. 16. Identificación de cumarinas en extractos hidroalcohólicos de *A. curassavica*. Las fluorescencias naranjas indican la presencia de estos metabolitos secundarios (asteriscos en color amarillo).

A: Extracto hidroalcohólico (70:30) de tallo (500mg/mL); B: Extracto hidroalcohólico (70:30) de hoja (500mg/mL); C: Extracto hidroalcohólico (70:30) de flor (500mg/mL); F1: Fase móvil (cloroformo: metanol: agua); F2: Fase móvil (Cloroformo: acetona).

Finalmente las lactonas sesquiterpénicas fueron detectadas positivamente en las tres muestras, estas con mayor concentración en tallos, seguida de hojas y flores. La cual se justica con las reacciones para cumarinas, esteroides y triterpenos libres (fig. 12 y fig.16).

Las lactonas sesquiterpénicas constituyen un grupo de terpenoides (C15) con un anillo lactónico, que representan los componentes activos de muchas plantas medicinales de la familia Asteraceae. Estos compuestos se obtienen a partir de hojas y flores de plantas como *Milleria quinqueflora*, *Viguiera sylvatica*, *Decachaeta thieleana*,<sup>167</sup> *Vanillomopsis arborea*<sup>168</sup> y *Arnica montana*,<sup>169</sup> entre otras. Algunos ensayos demuestran que los extractos de estas plantas, así como también, las lactonas sesquiterpénicas purificadas poseen propiedades antiinflamatorias.<sup>170,171</sup> En *A. curassavica*, posiblemente estos compuestos se encuentren formando parte de la unidad aglicona de los glicósidos cardiotónicos.

Grupos de metabolitos secundarios como naftoquinonas, antraquinonas, taninos y saponinas, no fueron detectados en ninguno de los órganos evaluados en el presente estudio. Tampoco existen reportes en la literatura consultada para otras especies del genero *Asclepias*, a excepción de los taninos que se han detectado en *A. glausescens* y *A. hypoleuca* con propiedades astringentes.<sup>52</sup>

El cáncer se ha relacionado con un estrés oxidativo persistente, entendido como una situación bioquímica que se caracteriza por el desequilibrio entre los radicales libres, principalmente las especies reactivas de oxígeno (ERO) y del nitrógeno (ERN), y los mecanismos de defensa antioxidantes. Aunque la administración de agentes que disminuyan la inflamación pueden ser un recurso para evitar estas condiciones, en los casos de tratamientos contra el cáncer, se emplean agentes citotóxicos, los cuales no son selectivos y afectan tanto a las células cancerígenas como a las normales ocasionando efectos adversos. Ante este panorama, desde principios de los años cincuenta se han realizado grandes esfuerzos a nivel mundial para encontrar fármacos novedosos contra esta patología, los cuales han dado lugar al aislamiento e identificación de productos naturales con actividad anticancerígena, como los alcaloides bisindólicos vincristina y vinblastina, así como el taxol y la camptotecina.

Algunos estudios han observado que pacientes con cáncer avanzado presentan concentraciones plasmáticas de ERO más elevadas que los individuos sanos, mientras que los niveles de actividad enzimática de los sistemas antioxidantes como CAT, GPx y SOD se hallan disminuidos. Ante este panorama, desde finales del siglo pasado se han realizado grandes esfuerzos a nivel mundial para encontrar fármacos antioxidantes contra esta patología.<sup>172-174</sup>

Con respecto a la evaluación de la actividad antioxidante, los resultados indican que el tratamiento con extractos de *A. curassavica* disminuyen significativamente la concentración de óxido nítrico plasmático, siendo mayor para el grupo tratado con el extracto de flor (18.65  $\mu$ M). Con respecto a la actividad de catalasa se observó un incremento de 0.000036 UCat/mg proteína en el grupo tratado con el extracto hidroalcohólico de tallo, lo que nos indica una disminución de radicales libres y estimulación del sistema antioxidante de catalasa. Posiblemente esta actividad antioxidante es mediada por los glicósidos cardiotónicos que presentan un alto potencial quimiopreventivo contra las especies reactivas de oxígeno,<sup>108</sup> y flavonoides, que contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos con excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición.<sup>139</sup> Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, fundamentalmente hacia los radicales hidroxilo y superóxido, especies altamente reactivas implicadas en el inicio de la cadena de peroxidación lipídica y se ha descrito su capacidad de modificar la síntesis de eicosanoides con respuestas anti-prostanoide y anti-inflamatoria.<sup>149,150,151</sup>

Debido a la resistencia farmacológica y los marcados efectos adversos de los agentes que actualmente se emplea el tratamiento de esta patología, se hace necesaria la búsqueda de nuevos productos, de preferencia naturales que puedan demostrar eficacia y mínimos efectos adversos en el manejo de esta enfermedad. Es por ello que los aportes de la presente investigación servirán para futuros ensayos sobre los glicósidos cardiotónicos y flavonoides de *A. curassavica*, como agentes con potencial modulador de los radicales libres.

## VIII.- CONCLUSIÓN

En condiciones experimentales, se demuestra el efecto antioxidante del extracto hidroalcohólico (70:30) de *A. curassavica*, en un modelo murino de cáncer inducido con óxido de níquel.

## IX.- AGRADECIMIENTOS

**Agradecimientos a la:**

**Universidad Nacional Autónoma de México**

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

*Por haberme formado como profesional de excelencia y calidad*

*Al:*

**Programa Universitario**

México Nación Multicultural

*Por haber apoyado el desarrollo y culminación de mis estudios profesionales*

*Al:*

**M. en C. Catalina Machuca Rodríguez**

**M. en C. Ernesto Mendoza Vallejo**

*Por compartir su dedicación y compromiso académico*

*A:*

**Verónica Ramírez Ramírez (Madre)**

**Minerva Castellanos García (Tía)**

*Porque gracias a su apoyo y consejos, he culminado una de mis grandes metas lo cual constituye la herencia más valiosa que pudiera recibir*

**A mis maestros, familiares y amigos**

*Que con confianza, cariño y apoyo han hecho posible el logro de mi carrera profesional.*

## X.- REFERENCIAS

- [1] Castillo R., Huerta P., Carrasco R. y Rodrigo R. 2003. *Estrés oxidativo y daño renal*. CIMEL; 8(1), 43-52.
- [2] Maldonado O., Nahúm E., Bernabé M., Ceballos G. y Méndez E. 2010. *Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas*. Rev. Med. UV, Julio-Diciembre.
- [3] Roche E. y Romero D. 1994. *Estrés oxidativo y degradación de proteínas*. Med Clin (Barc).103:189-96.
- [4] Jiménez S. 2003. *Antioxidantes y RL en el tabaquismo*. Buenos Aires: Solo-Mujeres.
- [5] Pérez A., Abilés J. y Castaño J. 2008. Estrés oxidativo y su implicación en distintas patologías. *Nutrición Clínica en Medicina*. (2); 45-64.
- [6] Lozada M. y García L. 2009. Estrés oxidativo y antioxidantes: como mantener el equilibrio. *Rev Asoc Colomb Dermatol*. (17); 172-9.
- [7] Adachi M., Zhang Y., Zhao X., Minami T., Kawamura R., Hinoda Y. 2004. *Clin Cancer Res*. (10); 3853-62.
- [8] Coulter I., Hardy M., Morton S., Hilton L., Tu W. and Valentine D. 2007. *Antioxidants vitamin C and vitamin E for the prevention and treatment of cancer*. *J Gen Intern Med*. 21:735-44.
- [9] Llacuna L. y Mach Nuria. 2012. *Papel de los antioxidantes en la prevención del cáncer*. *Rev Esp Nutr Hum Diet*. 16(1):16-24
- [10] Hirota K., Murata M., Sachi Y., Nakamura H., Takeuchi J. and Mori K. 1999. *Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus. A two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF-KB*. *J Biol Chem*. (274); 27891-7.
- [11] Bergendi L., Benes L., Durackova Z. and Ferencik M. 1999. *Chemistry, physiology and pathology of free radicals*. *Life Sci*. (65); 1857-2017.
- [12] Vicario IM. 1996. *Peroxidación lipídica, antioxidantes de la dieta y enfermedad cardiovascular*. *Nutr Clin*. (16); 19-28.
- [13] Halliwell B. y Gutteridge J. 1990. *Antioxidants of human extracellular fluids*. *Arch Biochem Biophys*. (280); 18.
- [14] Halliwell B. 1997. *Antioxidants and human disease: A general introduction*. *Nutr Rev*. 55 (Suppl. 1): 44-52.
- [15] Krinsky N. 1992. *Mechanisms of action of biological antioxidants*. *Proc Soc Exp Biol Med*. 2000; 248-54.
- [16] Emina Colak. 2008. *New markers of oxidative damage to macromolecules*. *JMB*. 27; 1-16.
- [17] Venereo G. y Justo R. 2002. *Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes*. *Rev Cub Med Mil*. 31: 26-133.
- [18] Céspedes T. ay Sanchez D. 2000. *Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación*. *Rev Cubana Cardiol*. 14 (1): 55-60.
- [19] Stadman E. and Levine R. 2003. *Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins*. *Amino Acids*. 25: 207- 218.
- [20] Cadenas E. and Davies K. 2000. *Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging*. *Free Rad Biol Med*. 29: 222-230.
- [21] Z. Zhang CS and cols. 2001. *Vanadate-induced cell growth regulation and the role of reactive oxygen species*. *Arch Biochem Biophys* 2001; 392: 311–320.
- [22] Heistad D. 2006. *Oxidative stress and vascular disease*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 26: 689–695.
- [23] Kim HJ y cols. 2002. *Modulation of redox-sensitive transcription factors by calorie restriction during aging*. *Mech Aging and Develop*.123: 1589-1595.
- [24] Vanhoutte P. 2004. *Endothelium-dependent hyperpolarizations: the history*. *Pharmacol Res*. 49: 503-8.
- [25] Zorrilla A., Eirez M. and Izquierdo M. 2004. *Papel de los radicales libres sobre el ADN: carcinogénesis y terapia antioxidante*. *Rev Cubana Invest Bioméd v.23 n.1 supl.1*.
- [26] Perez O., Roue G., Villamar N., Campo E. and Colomer D. 2006. *The proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in mantlecell lymphoma through generation of ROS and Nox a activation independent of p53 status*. *Blood*. 107:257-64.
- [27] Atalla S., Toledo L., McKenzie G. and Cederna J. 1985. *Influence of oxygen-derived free scavengers*. *Transplantation*. 40:584-90.
- [28] Kim M., Cho H., Jung M, Hong M., Lee S., Shin B., Ahn B. and Jung Y. 2005. *Extracellular signal-regulated kinase and AP-1 pathways are involved in reactive oxygen species-induced urokinase plasminogen activator receptor expression in human gastric cancer cells*. *Int J Oncol*. 26(6):1669-74.
- [29] Lin J., Wang J., Jiann B., Yu C., Tsai J., Huang J. and Wu T. 2005. *Correlation of p53 protein accumulation and Bcl-2 overexpression with histopathological features in prostatic cancer*. *J Formos Med Assoc*. 104(11):864-7.
- [30] Mann G., Thorne H., Balleine R., Butow P., Clarke C., Edkins E., Evans G., Fereday S., Haan E., Gattas M., Giles G., Goldblatt J., Hopper J., Kirk J., Leary J., Lindeman G., Niedermayr E., Phillips K., Picken S., Pupo G., Saunders C., Scott C., Spurdle A., Suthers G., Tucker K., Chenevix G. and Kathleen C. 2006. *Consortium for Research in Familial Breast Cancer. Analysis of cancer risk and BRCA1 and BRCA2 mutation prevalence in the kConFab familial breast cancer resource*. *Breast Cancer Res*. 8(1):R12
- [31] Sun Y. 1990. *Free radicals, antioxidant enzymes and carcinogenesis*. *Free Rad Biol Med*. 8: 583-99.
- [32] Oliva M., Ripoll F., Muniz P., Iradi A., Trullenque R. and Valls Y. 1997. *Genetic alterations and oxidative metabolism in sporadic colorectal tumors from a Spanish community*. *Molecular Carcinogen*. 1: 232-43.
- [33] Feig D., Reid T. and Loeb L. 1994. *Reactive oxygen species in tumorigenesis*. *Cancer Res*. 54: 1 890s-4s.
- [34] Sanchez M., Torres J., Tormos C., Iradi A., Oliva M. and Muniz P. 2006. *Impairment of antioxidant enzymes, lipid peroxidation and 8-oxo-2-deoxyguanosine in advanced epithelial ovarian carcinoma of a spanish community*. *Cancer Lett*. 20; 233 (1): 28-35.
- [35] Clemens M., Waladkhani A., Bublitz K., Ehringer G. and Gey K.1997. *Supplementation with antioxidants prior to bone marrow transplantation*. *Wien Klin Wochenschr*. 109:771-6.
- [36] Jaakkola K., Lahteenmäki P., Laakso J., Harju E., Tykka H. and Mahlberg K. 1992 *Treatment with antioxidant and other nutrients in combination with chemotherapy and irradiation in patients with small-cell lung cancer*. *Anticancer Res*.12:599-606.
- [37] Lockwood K., Moesgaard S., Hanioka T. and Folkers K. 1994. *Apparent partial remission of breast cancer in high risk patients supplemented with nutritional antioxidants, essential fatty acids and coenzyme Q10*. *Mol Aspects Med*. 15 Suppl:s231-40.
- [38] Legha S., Wang Y., Mackay B., Ewer M., Hortobagyi G., Benjamin RS, et al. 1982. *Clinical and pharmacologic investigation of the effects of alpha-tocopherol on adriamycin cardiotoxicity*. *Ann N Y Acad Sci*. 393:411-8.
- [39] Mills E. 1988. *The modifying effect of beta-carotene on radiation and chemotherapy induced oral mucositis*. *Br J Cancer*. 57:416-7.
- [40] Lamm D., Riggs D., Shriver J., Gilder P., Rach J. and DeHaven J. 1994. *Megadose vitamins in bladder cancer: a double-blind clinical trial*. *J Urol*. 151:21-6.
- [41] Lesperance M., Olivetto I., Forde N., et al. 2002. *Mega-dose vitamins and minerals in the treatment of non-metastatic breast cancer: an historical cohort study*. *Breast Cancer Res Treat*. 76:137-43.
- [42] Pathak A., Bhutani M., Guleria R. and Mao L. 2005. *Chemotherapy alone vs. chemotherapy plus high dose multiple antioxidants in patients with advanced non small cell lung cancer*. *J Am Coll Nutr*. 24:16-21.
- [43] Bairati I., Meyer F., Gelinas M., Fortin A., Nabid A., Brochet F., et al. 2005. *Aleatorized trial of antioxidant vitamins to prevent acute adverse effects of radiation therapy in head and neck cancer patients*. *J Clin Oncol*. 23:5805-13.
- [44] Ferreira P., Fleck J., Diehl A., Barletta D., Braga-Filho A., Barletta A., et al. 2004. *Protective effect of alpha-tocopherol in head and neck cancer radiation-induced mucositis: a double-blind aleatorized trial*. *Head Neck*. 26:313-21.
- [45] Misirliglu C., Erkal H., Elgin Y., Ugur I. and Altundag K. 2006. *Effect of concomitant use of pentoxifylline and alpha-tocopherol with radiotherapy on the clinical outcome of patients with stage IIIB non-small cell lung cancer: a randomized prospective clinical trial*. *Med Oncol*. 23:185-9.
- [46] Lissoni P., Meregalli S., Nosetto L., Barni S., Tancini G., Fossati V., et al. 1996. *Increased survival time in brain glioblastomas by a radioneuroendocrine strategy with radiotherapy plus melatonin compared to radiotherapy alone*. *Oncology*. 53: 43-6.
- [47] Berk L., Berkey B., Rich T., Blask D., Gallagher M., Kudrimoti M., et al. 2007. *Aleatorized phase II trial of high-dose melatonin and radiation therapy for RPA class 2 patients with brain metastases (RTOG 0119)*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 68:852-7.
- [48] Pankaj O. 2003. *Doomar or Gular (Ficus glomerata) as medicinal herbs in Chattishgarh, India*. *Research Note*. [botanical.com/site/column\\_poudhial/127\\_doomar.html](http://botanical.com/site/column_poudhial/127_doomar.html).
- [49] Juárez J. y Lozada L. 2003. *“Asclepiadaceae”. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatán*. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. 37: 1-57.
- [50] Juárez J, Alvarado C. y Villaseñor J. 2007. *“La familia Apocynaceae sensu lato en México: diversidad y distribución”*. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 78(2): 459-482.
- [51] Cronquist A. 1981. *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. Columbia University Press.
- [52] Fernández A, Juárez V. y Cortés L. 2008. *Usos de las especies del género Asclepias L. (Apocynaceae, Asclepiadoideae)*, *Información del Herbario Nacional de México, MEXU*. *Polibotánica* 25: 155-171.
- [53] UNAM. 2012. *Biblioteca Digital de Medicina Tradicional Mexicana*. Consulta electrónica <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php>.
- [54] Malcolm S. 1990. *Chemical defense in chewing and sucking insect herbivores: plant-derived cardenolides in the monarch butterfly and oleander aphid*. *Chemoecology*. 1:12–21.
- [55] Dussourd D. and Hoyle A. 2000. *Poisoned pluses: toxicity of milkweed latex and cardenolides to some generalist caterpillars*. *Chemoecology*. 10:11–6.
- [56] Haribal M. and Renwick J. 1998. *Identification and distribution of oviposition stimulants for monarch butterflies in hosts and nonhosts*. *J. Chem Ecol*. 24:891–904.
- [57] Martha E., Simei M., Rafael D., y Alfredo D. *Flora medicinal*. *Uso de la Flora y Fauna Silvestre*. *Biodiversidad y Desarrollo Humano de Yucatán*. 349-352.
- [58] Waizel H. y Waizel B. *Algunas plantas utilizadas en México para el tratamiento del asma*. *An Ori Mex* 2009; 54(4):145-71.
- [59] Kupchan S., Knox J. and Kelsey J. 1964. *Calotropin, a cytotoxic principle isolated from Asclepias curassavica L.* *Science* 146, 1685–1686.
- [60] Argueta A., Cano L. y Rodarte M. 1994. *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*, Tomo 1–3. Instituto Nacional Indigenista, México D.F., 1786 pp.
- [61] Avilés M. y Suárez G. 1994. *Catálogo de Plantas Medicinales Jardín Etnobotánico Centro*. INAH, Cuernavaca, Morelos, México, 47 pp.
- [62] Fuentes M. y Avilés M. 1997. *Informe Registro de las Plantas Medicinales Reportadas en el Estado de Morelos*. Centro INAH, Cuernavaca, Morelos, México, 125 pp.

- [63] Monroy O. y Castillo P. 2000. *Plantas Medicinales Utilizadas en el Estado de Morelos*. Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México, 400 pp.
- [64] Banerjee A. and Banerjee I. 1986. *A survey of the medicinal plants in Shevaroy hills*. J. Econ Tax Bot. 8: 271-290.
- [65] Roig J. 1945. *Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba-La Habana, Cuba*. Ed. Científico-Técnica, Tomo II-2da. ed., 3ra. Reimpresión. 426, 428-1125.
- [66] Toursarkissian M. 1980. *Plantas medicinales de la Argentina*. Bs. As., Ed. H. Sur. 11-178.
- [67] Jiangsu New Medical College. 1977. *The Dictionary of Traditional Chinese Materia Medica*. Shanghai Science and Technology Press: Shanghai. pp.1807.
- [68] Cárdenas J., Reyes C. y Doll J. 1972. *Malezas Tropicales*. Vol 1. Colombia: ICA.
- [69] Tokarnia C., Brito M. y Cunha B. 2001. *Toxicación experimental por Asclepias curassavica em bovinos*. Dados complementares. Pesq Vet Bras. 21:1-4.
- [70] Hemavani C. and Thippeswamy B. 2012. *Evaluation of antimicrobial activity of root extract of Asclepias curassavica*. Recent Research in Science and Technology 2012, 4(1): 40-43
- [71] Flores J. 2001. *Leguminosae: Florística, Etnobotánica y Ecología*. Fasc. No. 18. Programa Etnoflora Yucatanense. Universidad Autónoma de Yucatán Press, México, pp. 4-24.
- [72] Arellano J., Flores J., Tun J. y Cruz. M. 2003. *Leguminosae*. In: *Nomenclatura, Forma de Vida, Uso, Manejo y Distribución de las Especies Vegetales de la Península de Yucatán*. Universidad Autónoma de Yucatán Press, México, pp. 312-380.
- [73] Ayensu E. 1981. *Medicinal Plants of the West Indies*. Reference Publishing, Michigan.
- [74] Adams C. 1972. *Flowering Plants of Jamaica*. MaeLehose, Glasgow.
- [75] Tamara T. y Sarah P. 2004. *Medicinal plant use in the practice of midwifery in rural Honduras*. Journal of Ethnopharmacology 96 (2005) 233-248.
- [76] Laferriere J. 1994. *Medicinal Plants of the Lowland Inga People of Colombia*. Int. J. Pharmacol. 32 (1994). No. 1, pp. 90-94.
- [77] Beb O. 1986. *Medicinal plants intropical West Africa*. Cambridge University Press London New York, New Rochelle, pág. 18.
- [78] Lunan H. y Jamaicensis V. 1874. *Hamilton Pharm. Journ*, pág. 214.
- [79] Cuevas B. 1913. *Las plantas medicinales de Yucatán, Mérida*.
- [80] Tscherecher R., Sznatzke G. and G. Grimmer. 1959. *Calotropagenin aus Asclepias curassavica L.* Biochemische Abteilung des Chemischen Staatsinstituts der Universität, Hamburg.
- [81] Sing B. and Rastogi. 1969. *Indian. J. Chem* 7, 1105.
- [82] Giordani R. 1978. *Biol. Cell* p.p. 33, 253.
- [83] Giordani R., Blasco F. y Bertrand J. 1982. *C. R. Acad. SC., Paris, III*, p.p 295, 641.
- [84] Jeanette V. and James N. 1985. *Chemical constituents and energy content of two milkweeds, Asclepias speciosa and A. curassavica*. Economic Botany. 39(1), pp. 45-47.
- [85] Aguilar A., Camacho R., Chino S., Jáquez P. y López E. 1994. *Herbario medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social*. México: Ed. IMS.
- [86] Aguilar A., Camacho R., Chino S., Jáquez P. y López E. 1996. *Plantas medicinales del Herbario IMSS*. Cuadros básicos por aparatos y sistemas del cuerpo humano. México: IMS.
- [87] Taylor L. *Wealth of the rainforest, pharmacy to the world*. Raintree Nutrition, Inc. Austin, TX. 2005. <http://www.rain-tree.com/plistbot.htm>. [Consulta: septiembre-diciembre 2012].
- [88] Roger G., Joannes N., Georges N. and Paul S. 1986. *Purification and molecular properties of an acid phosphatase from Asclepias curassavica latex*. Plant Science. 43. 207-212.
- [89] Roger G. y Laurence L. 1992. *A  $\beta$ -D-Fucosidase from Asclepias curassavica latex*. Phytochemistry, Vol 33, No. 6, pp. 1327-1331.
- [90] Liggieri C., Arribère M., Trejo S., Canals F., Avilés F. and Priolo N. 2004. *Purification and biochemical characterization of asclepain c I from the latex Asclepias curassavica L.* J Protein. 23: 403-411.
- [91] Constanza L., Walter O., Sebastián T. and Nora P. 2009. *Biochemical analysis of a papain-like protease isolated from the latex of Asclepias curassavica L.* Acta Biochim Biophys Sin: 154-162.
- [92] Walter D., Constanza S., Sebastian A., Francesc X., Sandra E. and Nora S. 2009. *Characterization of papain-like isoenzymes from latex of Asclepias curassavica by molecular biology validated by proteomic approach*. Biochimie 91; 1457-1464.
- [93] Tsutoma W. and Tadatak N. 2008. *Steroidal glycosides from the roots of Asclepias curassavica*. Chem. Pharm. Bull. 56(3) 315-322.
- [94] Singh, B.; Rastogi, R. P. 1970. *Phytochemistry* 9, 315-331.
- [95] James N., Carolyn J. and Mark S. 1982. *Cardenolides in the latex and leaves of seven Asclepias species and Calotropis procera*. Phytochemistry Vol. 21, No. 9, pp. 2343-23481.
- [96] Abe F., Mohri Y., Yamauchi and Chen. 1991. *Chem. Pharm. Bull.* 39, 2709-27011.
- [97] Abe F., Mohri Y. and Yamauchi T. 1992. *Chem. Pharm. Bull.* 40, 2917-2920.
- [98] Roy M., Chang F., Huang H., Chiang M. and Wu C. 2005. *J. Nat. Prod.* 68. 1494-1499.
- [99] Tsutoma W., Kimiko S., Toshio M., Satoshi and Tadatak N. 2008. *New cardenolides and acetylated lignan glycosides from aerial parts of Asclepias curassavica*. Chem. Pharm. Bull. 56 (8) 1159-1163.
- [100] Jun Z., Hai Y., Yi J., Xiao J., Wei N. and Chang X. 2008. *Six new C<sub>21</sub> steroidal glycosides from Asclepias curassavica L.* Steroids. 73. 594-600.
- [101] Fumiko A., Yujiro M and Tatsuo Y. 1992. *Cardenolide Glycosides from the Seeds of Asclepias curassavica*. Chem. Pharm. Bull. 40(11) 2917-2920.
- [102] Catherine C., Charles W., Richard D., Anthony B., Julie S., Abraham J. and Gerald B. 2002. *Antibacterial activity of some Peruvian medicinal plants from the Callejón de Huaylas*. J. Ethnopharmacology. 79.133-138.
- [103] Navarro G., Gonzalez A., Fuentes M., Aviles M., Rios M., Zepeda G. and Rojas M. 2003. *Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants*. Journal of Ethnopharmacology. 87. 85-88
- [104] Shih-Chung W., Mei-Chin., Hsiu-Lin C., Hsing-I T., Yu-Yuan K., Yang-Chang W. and Pei-Yu Y. 2009. *Cytotoxicity of calotropin is through caspase activation and downregulation of anti-apoptotic proteins in K562 cells*. Cell Biology International 33.1230-1236.
- [105] Jun-Zhu L., Chen Q., Chang-Xiang C., Xiao-Jiang H. and Hai-Yang L. 2009. *Cytotoxicity of cardenolides and cardenolide glycosides from Asclepias curassavica*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 19. 1956-1959.
- [106] Mena-Rejón G., Caamal-Fuentes E., Cantillo-Claub Z., Cedillo-Rivera R., Flores-Guidoc J. and Moo-Puca R. 2009. *In vitro cytotoxic activity of nine plants used in Mayan traditional medicine*. Journal of Ethnopharmacology. 121. 462-465.
- [107] Shivaprasad H., Rajesh R., Nanda B., Dharmappa K. and Vishwanath B. *Thrombin like activity of Asclepias curassavica L. latex: Action of cysteine proteases*. Journal of Ethnopharmacology. 123.106-109.
- [108] Albert A., Savarimuthu I., Gabriel M. and Khalid S. 2010. *Chemopreventive potential of  $\beta$ -Sitosterol in experimental colon cancer model - an In vitro and In vivo study*. BMC Complementary and Alternative Medicine. 10:24.
- [109] Durairandyan V. and Ignacimuthu S. 2011. *Antifungal activity of traditional medicinal plants from Tamil Nadu, India*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. S204-S215.
- [110] Rafael M., Vicalina A., Julia R. and Luis J. 2009. *Grazing sheep poisoned by milkweed Asclepias curassavica or gastrointestinal nematosis? A case report findings*. Vet. Méx. 40 (3).
- [111] Tokarnia C., Brito M. y Cunha B. 2001. *Toxicación experimental por Asclepias curassavica em bovinos*. Dados complementares. Pesq Vet Bras. 21:1-4.
- [112] Beasley V. *Online Toxicants associated with stimulation or seizures* [database on the internet]. Ithaca (NY): International Veterinary Information Service (US). c1999 [updated 1999 Aug 9; cited 2008 Jan 8]. Available from: [http://www.ivis.org/advances/Beasley/Cpt2C/chapter\\_frm.asp?LA=1](http://www.ivis.org/advances/Beasley/Cpt2C/chapter_frm.asp?LA=1)
- [113] Knight A. and Walter R. *Online Plants affecting the cardiovascular system*. [database on the internet]. Jackson (WY): International Veterinary Information Service (US). c 2002 [updated 2002 Sep 17; cited 2008 Feb 20]. Available from: [http://www.ivis.org/special\\_books/Knight/chap2/chapter.asp?LA=1](http://www.ivis.org/special_books/Knight/chap2/chapter.asp?LA=1).
- [114] Cuéllar O. 1986. *Parasitosis del aparato digestivo*. En: PIJON AP, TÓRTORA P.J.L, editores. *Enfermedades de los Ovinos y Caprinos*. México: FES-Cuautitlán, UNAM. 103-118.
- [115] Urquhart G., Armour J., Duncan J., Dunn A. y Jennings F. 2001. *Parasitología veterinaria*. Zaragoza España: Editorial Acribia.
- [116] Ortiz, A., castillo, R. y Beausoleil, I. 1995. *Carcinogénesis por óxido de níquel en 2 líneas de ratones consanguíneas*. Revista Cubana de Oncología, Enero-junio.
- [117] Chance B, Machley AL. 1954. *Assay of catalases and peroxidases*. Methods in Enzymology; 2:764-75.
- [118] Zar J. H. 1999. *Biostatistical analysis*. 5 ed. Pearson Education. New Jersey, USA, 994 p.
- [119] Etkin, N.L. and E. Elisabetski. 2005. *Seeking a transdisciplinary and culturally germane science: The future of Ethnopharmacology*. Journal of Ethnopharmacology 100: 23-26.
- [120] Heinrich, M. 2001. Editorial: *Journal of Ethnopharmacology: an interdisciplinary journal devoted to indigenous drugs*. Journal of Ethnopharmacology 76 (2), 137-138.
- [121] Heinrich, M., Gibbons S. 2001. *Ethnopharmacology in drug discovery: an analysis of its role and potential contribution*. Journal of Pharmacy and Pharmacology 53. 425-432.
- [122] Jaeger, A. 2005. *Is traditional medicine better off 25 years later?*. Journal of Ethnopharmacology 100: 3-4.
- [123] Rivier, L. and J.G. Bruhn. 1979. Editorial. *Journal of Ethnopharmacology* 1(1): 1.
- [124] Verpoorte, R. Y.H. Choi, H.K. Kim. 2005. *Ethnopharmacology nd systems biology: A perfect holistic match*. Journal of Ethnopharmacology 100: 53-56.
- [125] Hernández, E. 1996. *El concepto de etnobotánica*. En: Estrada Lugo E. (Ed.) *Plantas medicinales de México, introducción a su estudio*. 4° edición, 1° reimpresión. Universidad Autónoma de Chapingo, México. 566 pp.
- [126] Luna-Morales, C. 2002. *Ciencia, conocimiento tradicional y etnobotánica*. Etnobiología 2: 120-135.
- [127] Erichsen-Brown. 1989. *Medicinal and other uses of North American plants*. Dover Publications. New York.
- [128] Singh, Bragirath, Rastogi and Ramp P. 1969. *Chemical investigation of Asclepias curassavica*. Indian Journal of Chemistry, 7(11): 1105-1110.
- [129] Alcorn, J. 1983. *Dynamics of Huastec Ethnobotany resources, Perception and resources management at Teenek Tsabaal, Mexico*. Ph.D.Thesis. University of Texas Austin.
- [130] Martínez, M. 1992. *Las plantas medicinales de México*. 6ta. ed. Editorial Botas. México.
- [131] Cedillo-Portugal, E. 1990. *Las plantas útiles del municipio de Tepoztlán, Morelos*. Tesis de Maestría en Ciencias, Facultad de Ciencias, UNAM.
- [132] Standley, P. 1926. *Trees and Shrubs of Mexico*. Contributions from the United States National Herbarium. Vol. 23. Washinton Government Printing Office.
- [133] Gonza M. 2000. *Fundamentación química de las reacciones de coloración y precipitación en la identificación de metabolitos secundarios de plantas medicinales*.
- [134] Trujillo-Perú, Villar del Fresno A. 199. *Farmacognosia general*. 1ª. Ed. Ed. Síntesis. España, pp. 136-267
- [135] Cronquist A. 1981. *An integrated System of Classification of Flowering Plants*. Columbia University Press.
- [136] Miranda M. 2001. *Farmacognosia y productos naturales*. 1ª ed. Ed. Félix Varela. Cuba. pp: 141, 207, 291-292.)
- [137] Avendaño C. 2001. *Introducción a la química farmacéutica*. 2ª ed. McGraw-Hill Interamericana. España. pp. 823, 836, 850-851
- [138] Bruneton, J. 2001. *Farmacognosia; Fitoquímica, plantas medicinales*. 2ª edición. España. Editorial Acribia. 1099 p.
- [139] Haystean B. 1983. *Flavonoids. A class of natural products of high pharmacological potency*. Biochem Pharmacol. 32:1141-8.
- [140] Pace-Asciac C, Hahn S, Diamandis E, Soleas G, Goldberg D. 1995. *The red wine phenolics transresveratrol and quercetin block human platelet aggregation in eicosanoid synthesis: implication for protection against coronary heart disease*. Clin Chim Acta. 235:207-19.

- [141] Tanaka T, Makita H, Ohnishi M, Hirose Y, Wang A, Mori H, et al. 1994. *Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis by dietary curcumin and hesperidin: Comparison with the protective effect of  $\beta$ -carotene*. Cancer Res. 54:4653-9.
- [145] Kim HP, Son KH, Chang HW, Kang SS. 2004. *Antiinflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms*. J Pharmacol Sci. 96:229-45.
- [146] Sakata K, Hirose Y, Qiao Z, Tanaka T, Mori H. 2003. *Inhibition of inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase by flavonoid hesperidin in mouse macrophage cell line*. Cancer Lett. 199:139-45.
- [147] Jang HS, Kook SH, Son YO, Kim JG, Jeon YM, Jang YS, Choi KC, Kim J, Han SK, Lee KY, Park BK, Cho NP, Lee JC. 2005. *Flavonoids purified from Rhus verniciflua Stokes actively inhibit cell growth and induce apoptosis in human osteosarcoma cells*. Biochim Biophys Acta. 1726(3):309-16.
- [148] Deog K, Liping L, Weimin G, Mohsen M. 2005. *Chemical structure of flavonols in relation to modulation of angiogenesis and immune-endothelial cell adhesion*. J Nutritional Biochem. 17:165-76.
- [149] Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, Soleas G y Goldberg DM. 1995. *The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation in eicosanoid synthesis: implication for protection against coronary heart disease*. Clin Chim Acta, 235:207-219.
- [150] Yang K, Lamprecht SA, Liu Y y cols. 2000. *Chemoprevention studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethane-treated mouse colon*. Carcinogenesis, 21:1655-1660.
- [151] Geleijnse JM, Launer LJ, Van der Kuip DA, Hofman A y Witterman JC. 2002. *Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam study*. Am J Clin Nutr, 75:880-886.
- [152] Stahl W, Ale-Agha N y Polidori MC. 2002. *Non-antioxidant properties of carotenoids*. Biol Chem, 383:553-558.
- [153] Hardigree AA y Epler JL. 1978. *Comparative mutagenesis of plants flavonoids in microbial system*. Mutation Res, 58:231.
- [154] Birt DF, Hendrich S y Wang W. 2001. *Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids*. Pharmacol Ther, 90:157-177.
- [155] Ranelletti FO, Ricci R y Larocca LM. 1992. *Growth-inhibitory effect of quercetin and presence of type-II estrogen binding sites in human colon-cancer cell lines and primary colorectal tumors*. Int J Cancer, 50:486-492.
- [156] Scambia G, Ranelletti FO y Panici PB. 1990. *Inhibitory effect of quercetin on OVCA 433 cells and presence of type II estrogen binding sites in primary ovarian tumors and cultured cell*. Br J Cancer, 62:942-947.
- [157] Yoshida M, Sakai T y Hosokawa N. 19990. *The effects of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells*. FEBS Lett, 260:10-13.
- [158] Yoshida M, Yamamoto M y Nikaido T. 1992. *Quercetin arrests human leukemic T-cells in late G1 phase of the cell cycle*. Cancer Res, 52:6676-6681.
- [159] Ren W, Qiao Z, Wang H y cols. 2001. *Tartary buckwheat flavonoid activates caspase 3 and induces HL-60 cell apoptosis*. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 23:427-432.
- [160] Myhrstad MC, Carlsen H, Nordstrom O, Blomhoff R y Moskaug JJO. 2002. *Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the gamma-glutamylcysteine synthetase catalytic subunit promoter*. Free Radic Biol Med, 32:386-393.
- [161] Pouget C, Fagnere C, Basly JP y cols. 2002. *Synthesis and aromatase inhibitory activity of flavanones*. Pharm Res, 19:286-291.
- [162] Claudia Koklinski. Farmacognosia, Ediciones Omega, Barcelona 2003; 155-203.
- [163] Mukherjee, AK.; Basu, S.; Sarkar, N.; Ghosh, AC. 2001. *Advances in Cancer Therapy with Plant Based Natural Products*. Current Medicinal Chemistry. Vol. 8. Pag.1467 – 1486.
- [164] Mukherjee, AK.; Basu, S.; Sarkar, N.; Ghosh, AC. 2001 *Advances in Cancer Therapy with Plant Based Natural Products*. Current Medicinal Chemistry. Vol. 8. Pag.1467 – 1486.
- [165] Watanabe, Kazuki; Mimaki, Yoshihiro; Sakagami, Hiroshi; Sashida, Yutaka. 2003. *Bufadienolide and Spirostanol Glycosides from the Rhizomes of 133 Helleborus orientalis*. Journal Natural Products. Vol. 66. Pág. 236 – 241.51.
- [166] Prassas, Ioannis; Diamandis, Eleftherios. 2008. *Novel Therapeutic Applications of Cardiac Glycosides*. Nature Reviews. Vol. 7 (11). Pag. 926 – 933.
- [167] Castro, V., P. Rüngeler, R. Murillo, E. Hernandez, G. Mora, H.L. Pahl & I. Merfort. 2000. *Study of sesquiterpene lactones from Milleria quinqueflora on their anti-inflammatory activity using the transcription factor NF-kappa B as molecular target*. Phytochemistry 53: 257-263
- [168] Vischnewski, W., C.A. Skrochy, A.M. Nasi, C. Lopes & W. Herz. 1999. *15-Hydroxyeremmantholide and derivatives from Eremanthus arboreus*. Phytochemistry 50: 317-320.
- [169] Willuhn, G., P.M. Röttger & D. Wendisch. 1984. *Helénalinund 11a13-dihydrohelenalinester aus Blüten von Arnica montana*. Planta Med. 50: 35-37
- [170] García-Piñeres, A.J., V. Castro, G. Mora, T.J. Schmidt, E. Strunck, H.L. Pahl & I. Merfort. 2001. *Cysteine 38 in p65/NF-kB plays a crucial role in DNA binding inhibition by sesquiterpene lactones*. J. Biol. Chem. 276: 39713-39720
- [171] Humar, M., A.J. García-Piñeres, V. Castro & I. Merfort. 2003. *Effect of sesquiterpene lactones on the expression of the activation marker CD69 and of IL-2 in T lymphocytes in whole blood*. Biochem. Pharmacol. 65: 1551-1563.
- [172] Hilleman EO, Liu J, Albitar M, Keating MJ, Huang P. *Intrinsic oxidative stress in cancer cells: a biochemical basis for therapeutic selectivity*. Cancer Chemother Pharmacol. 2004;53:209–19.
- [173] Sharma A, Tripathi M, Satyam A, Kumar L. *Study of antioxidant levels in patients with multiple myeloma*. Leuk Lymphoma. 2009;50:809–15.
- [174] Stachowicz-Stencel T, Synkiewicz A, Bien E, Adamkiewicz-Drozynska E, Wybieralska-Dubaniewicz M, Balcerska A. *Multiple primary cranio-spinal tumours in a 13-year-old female with neurofibromatosis type 2 management strategy*. Childs Nerv Syst. 2011;27:175–8.
- [175] Endes, M E. and Brayans. P.V. 2000. *A revised Classification of the Apocynaceae* S. L. Bot. Re. 66(1): 1-56
- [176] Rzedoski, G.C. de R. y J. Rzedoski. 2001. *Flora Fanerogámica del Vale de México*. 2ª. Ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.
- [177] Villaseñor Rios, J.L. y F. J. Espinoza García. 1998. *Catálogo de Malezas de México*. Universidad Nacional Autónoma de México. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario y Fondo de la Cultura Económica, México, D.F.

## XI.- ANEXOS

### Entrevista etnofarmacológica

No. de entrevista

Fecha:

Nombre:

Sexo:

Edad:

- 1.- ¿Qué enfermedades ha padecido y cuales han presentado sus familiares más cercanos?
- 2.- ¿Qué alimentos consume regularmente?
- 3.- ¿Cuál es el empleo que usted le ha dado a la planta?
- 4.- ¿Cómo supo usted del uso medicinal de la planta? ¿Quién le recomendó su uso?
- 5.- ¿Qué parte de la planta uso?
- 6.- ¿Cómo fue su aplicación?
- 7.- ¿Cómo inicio y progresó su padecimiento?
- 8.- ¿Cuánto tiempo transcurrió desde la detección del problema hasta el inicio del tratamiento?
- 9.- ¿Cuánto duró el tratamiento y con qué frecuencia?
- 10.- ¿Cuáles fueron sus observaciones más importantes durante el tratamiento?
- 11.- ¿Además de utilizar la planta, tenía otro tratamiento? ¿Cuál era?
- 12.- ¿Presento algunas molestias durante el uso?
- 13.- ¿Al término del tratamiento usted ha observado nuevas lesiones?
- 14.- ¿Estaría dispuesto a que se le realizaran unos exámenes para saber su estado de salud?

## Fotografías de formación de tumores



Fig. 17. Formación de tumor en muslo derecho del ratón hembra (CD-1) inducida con NiO.



Fig. 18. Tumor localizado en el muslo izquierdo derecho



Fig. 19. Tumor disectado del muslo

