



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

TESIS PROFESIONAL

**Actividad antioxidante de extractos hidroalcohólicos de
Asclepias curassavica en ratones CD1**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

FERNANDO FLORES BOLAÑOS

DIRECTORA DE TESIS

M. en C. CATALINA MACHUCA RODRIGUEZ



CIUDAD DE MÉXICO, A 15 DE NOVIEMBRE, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

MÉXICO

NOVIEMBRE 2016

A mis Maestros, familia y amigos.

Gracias Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme las armas para ser profesionista.

Muchas gracias Maestra Catalina, Maestro Ernesto, Biol. Pedro Hernández por su amistad, apoyo, confianza y compartir sus conocimientos.

Gracias por su ayuda Papá, Mamá e Ivette; en especial agradezco a mis abuelos e Ilse, y a la familia Téllez García. Son la base de la persona que soy.

Gracias Dios. La obtención de este grado representa un triunfo para todos nosotros.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	1
MARCO TEÓRICO.....	2
Radicales	2
Óxido nítrico (NO)	2
Mecanismos antioxidantes.....	3
Catalasa (CAT)	4
Cáncer	4
Acción de los radicales libres sobre el ADN	5
Acción de los radicales libres en cada una las etapas de carcinogénesis.....	6
Terapia antioxidante	7
Etnofarmacología	7
Metabolitos secundarios	7
Alcaloides	8
Glicósidos Cardiotónicos	9
Esteroides y Triterpenos libres	9
Flavonoides	9
Taninos.....	10
Saponinas	10
Naftoquinonas y antroquinonas.....	11
Cumarinas	11
Lactonas Sesquiterpenicas	11
Familia Apocynaceae.....	12
Género Asclepias.....	12
Clasificación cladista de <i>Asclepias curassavica</i> L.	12
Nombres comunes	13
Descripción morfológica.....	13
Hábitat.....	13
Ecología.....	13
Distribución en México.....	14
Estudios citotóxicos de <i>A. curassavica</i> y su uso como anticancerígeno.....	14
JUSTIFICACIÓN	15
HIPÓTESIS.....	15

OBJETIVOS.....	15
MATERIAL Y MÉTODOS	16
Localidad y colecta de material biológico.....	16
Registro de información etnofarmacológica	16
Procesamiento del material vegetal.....	16
Obtención del extracto hidroalcohólico	16
Identificación de metabolitos secundarios.....	16
Alcaloides	16
Naftoquinonas y antraquinonas	17
Esteroides y triterpenoides libres.....	17
Flavonoides	17
Taninos.....	18
Saponinas	18
Glicósidos cardiotónicos.....	18
Cumarinas	19
Lactonas sesquiterpénicas.....	19
Inducción de carcinoma a modelos experimentales	19
Tratamiento con extractos hidroalcohólicos	19
Obtención de plasma	20
Cuantificación de Óxido nítrico (NO) por el método de Griess.....	20
Cuantificación de proteína total por el método de Biuret.....	20
Actividad de catalasa por el método de Chance y Machley	21
Análisis estadístico	21
RESULTADOS	22
Registro etnofarmacológico de <i>Asclepias curassavica</i> L.	22
Metabolitos secundarios identificados en <i>Asclepias curassavica</i> L.	24
Efecto de los extractos hidroalcohólicos de <i>A. curassavica</i> sobre los niveles de NO.....	30
Efecto de los extractos hidroalcohólicos de <i>A. curassavica</i> en la actividad de catalasa	33
DISCUSIÓN	36
CONCLUSIÓN.....	40
REFERENCIAS.....	41

INTRODUCCIÓN

Los radicales que se producen por la combustión química del metabolismo de un organismo aerobio, la contaminación ambiental, el consumo de tabaco, o de alimentos procesados, causan daño sobre los sistemas biológicos celulares.⁽¹⁾ En condiciones fisiológicas normales, el organismo neutraliza los radicales con mecanismos antioxidantes; pero si la capacidad de control de las sustancias oxidantes por sistemas antioxidantes es superada cambia el balance a favor de la oxidación, estableciéndose un estado denominado estrés oxidativo, provocando daño a biomoléculas y células e iniciando procesos patológicos graves entre las que destaca el cáncer.^{(1) (2)}

El cáncer es considerado una de las principales causas de muerte en el mundo, en el 2012 hubo 8.2 millones de muertes relacionadas con el cáncer de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud⁽²⁾; en México aproximadamente hay 128,000 nuevos casos de cáncer al año, según estimaciones de la Unión Internacional contra el Cáncer.⁽³⁾ Para el tratamiento del cáncer se han empleado agentes citotóxicos como la vincristina, vinblastina, taxol y camptotecina además de las radioterapias, pero estos tratamientos no son selectivos y afectan tanto a células cancerosas como a células normales, ocasionando efectos adversos.⁽⁴⁾ Debido a ello es necesaria la búsqueda de nuevas moléculas, que sean eficientes para disminuir los efectos negativos de esta enfermedad.

Las plantas son la principal fuente de moléculas bioactivas con reconocido futuro potencial en la síntesis de fármacos. Por ello y debido a la complejidad y variabilidad de su metabolismo secundario es importante la realización de estudios fitoquímicos y farmacológicos que sirvan como modelo para la producción de nuevos fármacos.⁽⁵⁾ Sin embargo se estima que solo una pequeña parte del total de especies existentes ha sido objeto de estudios fitoquímicos y biológicos, debido a esto la presente investigación se encamina a evaluar la composición química de los extractos obtenidos de tallo, hoja y flor de *Asclepias curassavica* L. y la actividad antioxidante de los extractos en ratones comprometidos a un proceso carcinógeno.

Asclepias curassavica L., es una especie caracterizada por la presencia de sustancias bioactivas, como glicósidos cardiotónicos (calotropina, asclepina, curassavicina, calactina) y alcaloides derivados de la 2 metoxi-pirazina. La bioactividad de estos metabolitos secundarios está relacionada a su efecto como anestésico, antiviperino, antiinflamatorio, dermatológico, laxante, emético y citotóxico.⁽⁶⁻¹²⁾ Su efecto citotóxico se asocia a las líneas celulares AGZY, K562, HepG2, Raji, MDCK, KB, HeLa, SiHa y MCF-7.⁽⁹⁻¹⁶⁾

Los extractos hidroalcohólicos (70:30) de *A. curassavica* analizados en esta investigación ejercen efecto antioxidante sobre un modelo murino de cáncer inducido con óxido de níquel (NiO), los grupos tratados con los extractos hidroalcohólicos de tallo, hoja y flor disminuyeron las concentraciones de óxido nítrico, siendo el extracto de flor a dosis alta el que presenta niveles de óxido nítrico muy por debajo del control; al analizar la actividad de catalasa, se observó un incremento de la actividad en los grupos tratados con extractos hidroalcohólicos, lo que nos indica una disminución de radicales libres y la estimulación del sistema antioxidante de catalasa, por ende los aportes de esta investigación servirán para futuros ensayos de *A. curassavica* y sus componentes químicos.

MARCO TEÓRICO

Radicales

Un radical (R) es una molécula o átomo que contiene un electrón desapareado en su órbita externa, lo que le imprime inestabilidad y reactividad. 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. ^{(6) (7)} 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. ⁽¹⁾

Generalmente son reconocidos dos grupos de radicales, las Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) y Especies Reactivas de Nitrógeno (ERN), ambas definidas por su capacidad oxidante, 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. ^{(3), (19-21)}

Las fuentes exógenas incluyen radiaciones, los tóxicos que ingresan al organismo por dieta o inhalación, entre otros. ⁽⁸⁾ De forma endógena 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. ^{(9) (10)} 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 NOX₂. ⁽¹⁰⁾ 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, ^{(7) (11)} que son representadas por el anión superóxido (O₂⁻), peróxido (O₂⁻²), perhidroxilo (HO₂[·]) y el hidroxilo ([·]OH) y moléculas no radicales, como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), oxígeno singulete (¹O₂), ozono (O₃) y ácido hipocloroso (HClO) el problema que plantean estas moléculas es que, en determinadas circunstancias del entorno celular, se transforman en radicales hidroxilo. ^{(7) (11) (12)}

En las ERN el representante más sobresaliente es el óxido nítrico ([·]NO), 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). ⁽¹⁰⁾ Bajo ciertas condiciones el [·]NO puede originar otros radicales como: el catión nitrosonium (NO⁺), anión nitroxilo (NO⁻), dióxido de nitrógeno (NO₂) y peroxinitrito (ONOO⁻). ^{(7) (11) (12)}

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, participando en procesos fisiológicos y patológicos.

El óxido nítrico es producido en las células por tres isoformas de la óxido nítrico sintasa (tipo I, dependiente de Ca^{2+} ; tipo II, no regulada por Ca^{2+} ; y tipo III, dependiente del sistema 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. ⁽¹³⁾

Las concentraciones en un organismo vivo se encuentran entre 10 nM a 1 μM . El NO puede ser cuantificado a partir de sus metabolitos estables como NO_2^- y 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 diazoción de la sulfanilamida con ácido nitroso, seguida por la unión de una amina bicíclica. ⁽¹⁴⁾

Mecanismos antioxidantes

Los organismos aeróbicos poseen complejos sistemas antioxidantes que permiten la neutralización de los radicales libres, a través de dos mecanismos, la estequiometría y la catalítica. Estos pueden agruparse según su naturaleza química y modo de acción en dos grupos: enzimáticos y no enzimáticos (preventivos y sequestradores) Tabla 1. ^{(6) (11) (12) (15)}

Enzimáticos		
Mecanismos de acción: catalítico	Forman la primera línea de defensa celular frente a especies reactivas de oxígeno específicas, degradándolas a moléculas menos reactivas.	
Clasificación	Modo de acción	Biogeneración
Superoxido Dismutasa (SOD)	$\text{O}_2 \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2$	Mitocondria (Mn-SOD), Citosol (Cu-Zn-SOD)
Catalasa (CAT)	$\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{H}_2\text{O}$	Interior de glóbulos rojos
Glutathion peroxidasa (GPx)	$\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{H}_2\text{O}$	Citosol, membranas celulares
No enzimáticos		
<ul style="list-style-type: none"> Preventivos 		
Mecanismo de acción: estequiometrico	Secuestran los iniciadores del proceso oxidativo como los metales de transición (Fe(II), Cu(I), Co(II) y Ni(II))	
Clasificación	Modo de acción	Biogeneración
Transferrina y lactoferrina	Quelantes	Citosol, membranas celulares
Ceruloplasmina	Quelantes	Plasma
<ul style="list-style-type: none"> Secuestradores 		
Mecanismo de acción: estequiometrico	Inhiben la cadena de iniciación de reacciones de radicales libres o rompen la cadena de propagación de la misma	
Clasificación	Modo de Acción	Biogeneración
B-Carotenos	Recicladores	Metabolismo de plantas
Vitamina C	Recicladores	Frutas y verduras
Bilirrubina	Inhibe peroxidación	Metabolismo de grupos hemo

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 H₂O₂ producto del metabolismo celular, la radiación ionizante y dismutación del radical superóxido. Proceso que ocurre por la descomposición celular del H₂O₂ en agua y oxígeno (Fig. 1). 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. ⁽¹⁶⁾

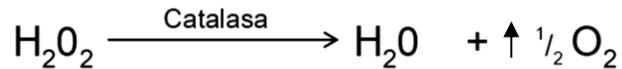


Fig. 1. Descomposición del peróxido de hidrogeno mediada por catalasa.

Cáncer

Es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo; también con este término se habla de "tumores malignos" o "neoplasias malignas". El cáncer comienza en una célula. La transformación de una célula normal en tumoral es un proceso multifásico y suele consistir en la progresión de una lesión precancerosa a un tumor maligno. ⁽³⁾ Las lesiones precancerosas son resultado de la interacción entre los factores genéticos y sobre todo agentes externos. La incidencia de esta enfermedad aumenta muchísimo con la edad, muy probablemente porque se van acumulando factores de riesgo de determinados tipos de cáncer. La acumulación general de factores de riesgo se combina con la tendencia que tienen los mecanismos de reparación celular a perder eficacia con la edad. ⁽¹⁷⁾

Una característica del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, proceso conocido como metástasis. La metástasis ocasiona comúnmente la muerte por cáncer. ⁽¹⁷⁾

La asociación entre radicales y cáncer es compleja, ha sido demostrado que estas especies químicas pueden inducir varios tipos de cáncer debido al daño oxidativo que ocasiona a todas las moléculas de importancia biológica. ⁽⁸⁾ ⁽¹⁸⁾ Generalmente, los radicales tienen como blanco la molécula de ADN (particularmente los grupos nucleofílicos de la desoxirribosa y bases nitrogenadas), además de proteínas y lípidos, ocasionando una enfermedad con alta morbilidad y mortalidad como el cáncer. ⁽¹⁹⁾ El daño al ADN se considera un suceso crucial en la carcinogénesis. Se han reportado diferentes tipos de lesiones oxidativas al ADN que provocan mutaciones e inestabilidad genética, ambos daños implicados en la carcinogénesis. ⁽⁸⁾

Acción de los radicales libres sobre el ADN

Las moléculas oxidantes presentes en el denominado estrés oxidativo, son capaces de dar lugar a múltiples reacciones con otros compuestos presentes en el organismo, y consecuentemente, llegar a producir daño celular. ⁽²⁰⁾

Las ERO presentan una alta reactividad, tanto que son capaces de reaccionar con una amplia gama de estructuras celulares, conociéndose que sus blancos fundamentales son los ácidos grasos insaturados de las membranas fosfolipídicas, las proteínas y los ácidos nucleicos (ADN). ⁽²⁰⁾

La molécula de ADN es uno de los principales blancos del ataque por radicales libres en la célula y las modificaciones que sufre como consecuencia de esos ataques son relevantes para la pérdida de homeostasis celular, pérdida que puede prolongarse como consecuencia de las funciones del ADN como reservorio activo de información. ^{(21) (22)}

Existen diferentes tipos de daño oxidativo al ADN, entre los que se han reportado: ruptura del esqueleto azúcar fosfato de una o de las 2 hebras, modificación de las bases nitrogenadas (saturación y fragmentación del anillo de timina) y la formación de uniones cruzadas (cross-links) ADN-ADN o ADN-proteína ⁽²³⁾, a través de diferentes mecanismos que se enumeran y muestran en la siguiente tabla (Tabla 2):

Tabla 2. Principales daños ocasionados por radicales libres al ADN.	
Daño oxidativo	Acción de los radicales libres
1. Modificación de las bases de ADN	Se conoce que el daño al ADN por radicales libres (RL) endógenos ocurre de forma espontánea y existe un nivel normal de bases modificadas por ERO en el ADN celular. La acción del $\cdot\text{OH}\cdot$ da lugar a más de 20 modificaciones y entre ellas 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. ^{(23) (24)}
2. Generación de sitios AP	Los sitios apurínicos o apirimidínicos (AP), se generan por ruptura del enlace glicosídico, que puede resultar del ataque al azúcar por parte del $\text{OH}\cdot$. Estas lesiones presentan adenina insertada preferencialmente opuesta a la lesión. Los oxidantes mutágenos que incluyen radiaciones ionizantes, H_2O_2 , bleomicina, neocarzinotatina y complejo Cu-fenantrolina, son capaces de producir sitios AP por oxidación de la desoxirribosa del ADN. ⁽⁸⁾
3. Ruptura de una cadena del ADN	Las rupturas de cadena (RC) se producen por escisión del enlace fosfodiéster. Ocurren frecuentemente por ataque químico o de radicales libres a la porción desoxirribosa del esqueleto del ADN. Se ha demostrado que sustancias carcinógenas, generadoras de ERO, provocan la aparición de rupturas de una cadena en el ADN, además de modificaciones de bases. ⁽²⁵⁾
4. Mutaciones	Dado que muchos tumores humanos contienen 1 ó más mutaciones independientes, indispensables para el desarrollo del tumor, se ha postulado que son el resultado de un incremento en la velocidad de la mutagénesis endógena. De otra forma se supone que la ocurrencia de malignidad sería extremadamente rara. El efecto del ataque al ADN por ERO desempeña un papel importante en el incremento de estas mutaciones que conducen al cáncer. ^{(26) (27)}
5. Activación de oncogenes e inactivación de genes supresores	Activación de oncogenes e inactivación de genes supresores: oxidantes como el H_2O_2 , $\text{O}_2\cdot$, oxígeno hiperbárico y el ozono, pueden inducir experimentalmente la activación de oncogenes en células iniciadas y protegidas. Es posible también que conduzcan a la inactivación de genes supresores. De esta forma se modifica la proliferación celular. ^{(22) (28)}
6. Daño endotelial que favorece la metástasis	Las vías más importantes para la diseminación de las células cancerosas, son los vasos sanguíneos y linfáticos. El ataque por radicales libres a las células endoteliales causa la liberación de proteasas que pueden con posterioridad, degradar la membrana basal. Esta acción se asocia con la generación de compuestos químicos que atraen a las células tumorales. En estudios experimentales se ha observado un aumento del número de células tumorales retenidas por la pared vascular y su migración hacia el subendotelio después de la acción de ERO (oxigenación hiperbárica), cuatriplicándose el número de metástasis así obtenidas. ^{(29) (30)}

Acción de los radicales libres en cada una de las etapas de carcinogénesis

El cáncer se desarrolla como un proceso micro-evolutivo que requiere de la acumulación de múltiples eventos que tienen lugar en un clon de células y comprenden 3 estadios denominados iniciación, promoción y progresión, ⁽³¹⁾ además se ha comprobado que las ERO pueden estimular el desarrollo tumoral en las 3 etapas señaladas. (Tabla 3) ^{(32) (33) (34) (35)}

La angiogénesis constituye uno de los procesos de gran significación en el desarrollo y posterior difusión de las células tumorales. En un estudio realizado en 1998 se destaca el posible papel de las ERO en este evento, donde los breves episodios de hipoxia-reoxigenación, sobre las células del endotelio microvascular humano, causaron la formación de ERO y la activación del factor de transcripción nuclear (NF-Kappa B), acelerando significativamente el grado de morfogénesis tubular o neovascularización que define este proceso. ⁽³⁶⁾

Tabla 3. Efecto de los radicales libres en las etapas de carcinogénesis.	
Iniciación	—————▶ Inducción de mutación en el ADN de una célula somática
Mecanismo	Los posibles mecanismos por los que transcurre el daño al ADN inducido por estrés oxidativo son: formación del ·OH· y el incremento del calcio (Ca ²⁺) libre intracelular.
Descripción	
La iniciación requiere de una modificación permanente del material genético de una célula.	
<p>– Formación del ·OH·, generado por la interacción del H₂O₂ con el hierro (Fe²⁺) o cobre (Cu²⁺) constitutivos, unidos o cercanos al ADN, o liberados en el interior celular a causa del estrés oxidativo. La reacción del H₂O₂ con estos iones metálicos reducidos es conocida como reacción de Fenton y es una vía fundamental en la generación de esta especie química. (21)</p> <p>– Incremento del calcio (Ca²⁺) libre intracelular, ya sea producto de la movilización a partir de sus depósitos intracelulares (el retículo endoplasmático y la mitocondria) o a través del influjo extracelular. Esta respuesta es provocada por una sobrecarga de estrés oxidativo que agota las reservas de antioxidantes endógenos, lo que constituye una señal para la liberación de este elemento; que una vez liberado, además de provocar otras respuestas, conduce a la activación de endonucleasas que fragmentan al ADN (proceso que normalmente tiene lugar durante la apoptosis). (37) Estos mecanismos no son excluyentes, por lo que pueden tener lugar simultáneamente.</p>	
Promoción	—————▶ Estimulación de la expansión tumoral del clon mutado
Mecanismo	Las ERO pueden estimular la expansión de clones celulares mutados mediante la modulación temporal de genes relacionados con la proliferación y muerte celular.
Descripción	
<p>En la promoción, las ERO inducen un incremento notable del Ca²⁺ citosólico, movilizándolo de las reservas intracelulares e incrementando su flujo desde el medio extracelular. (38) El efecto del Ca²⁺ puede tener lugar por vía directa induciendo proto-oncogenes como c-fos o de forma indirecta, modificando la fosforilación de factores transcripcionales por proteína quinasa C dependiente de Ca²⁺ (PKC), la cual junto con otras quinasas, regula la actividad de factores transcripcionales por múltiples cascadas de fosforilación. Las ERO pueden estimular la actividad PKC por vía directa mediante la oxidación de sus residuos de cisteína en el dominio regulatorio de la enzima. Pueden ejercer efectos directos sobre la regulación de la actividad de factores transcripcionales como el factor NF-kappa B que tiene bajo su control una gran variedad de genes. (39)</p>	
Progresión	—————▶ Malignización del tumor
Mecanismo	Crecimiento acelerado de las células
Descripción	
El estadio final del cáncer es la malignización tumoral que se caracteriza por un crecimiento acelerado de las células, la evasión de la vigilancia inmunológica y la invasión de otros tejidos.	
<p>Muchos de estos cambios involucran lesiones adicionales al ADN, pensándose que la generación elevada de ERO en las células origina un estrés oxidativo persistente que incrementa su inestabilidad genómica, acompañándose de una disminución de las enzimas antioxidantes, lo cual incrementa a su vez la sensibilidad de estas células a las ERO. (40) Muchos tipos de tumores pueden originar una respuesta de intensidad variable del sistema inmune.</p>	

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.⁽²⁰⁾ 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. Así como considerar otros aspectos como la etnofarmacología, la farmacodinámica, farmacocinética, desbalance oxidativo, fallos en el sistema antioxidante, entre otros.^{(20) (41)}

Etnofarmacología

Si bien el proceso típico de descubrimiento de fármacos industrial hace uso de distintas plataformas de detección con bioensayos para encontrar compuestos prometedores para un objetivo particular, la etnofarmacología va en la dirección opuesta; es la eficacia anecdótica de las plantas medicinales poniéndose a prueba en el laboratorio. El etnofarmacólogo trata de comprender la base farmacológica de plantas de importancia cultural. Este enfoque se emplea actualmente para estudiar las farmacopeas de la Medicina Tradicional China, las farmacopeas europeas, o las numerosas plantas medicinales de los grupos étnicos tradicionales.⁽⁴²⁾

Por lo tanto, en general, el etnofarmacólogo usa hipótesis de trabajo derivadas de un trabajo de campo antropológico, es decir, el extracto de la planta X se utiliza en el contexto cultural de Z para curar las enfermedades A-D. Por lo tanto, la investigación etnofarmacológica es interdisciplinaria, tocando áreas como la antropología cultural, la etnobiología, la fitoquímica y como su nombre lo indica, la farmacología.^{(42) (43)}

El término etnofarmacología ha sido utilizado libremente para describir, la observación, identificación, descripción e investigación experimental de los ingredientes y efectos de las drogas indígenas, es un campo verdaderamente interdisciplinario de la investigación y hasta ahora se siguen definiendo los objetivos y el alcance de esta disciplina.⁽⁴³⁾

El estudio de la etnofarmacología no pretende apoyar un retorno a la utilización de fármacos tradicionales en su forma aborígen, ni para explotar la medicina tradicional, sino para rescatar, investigar, evaluar y documentar un importante patrimonio cultural antes de que pueda perderse.⁽⁴²⁾

Metabolitos secundarios

Las plantas producen una cantidad de compuestos que aparentemente no están implicados en procesos de crecimiento y desarrollo denominándose metabolitos secundarios así lo menciona Lincoln Taiz, en el 2006.⁽⁴⁴⁾ Los científicos han descubierto que estos compuestos protegen a las plantas de predadores y patógenos en base a su toxicidad, repulsión a herbívoros o microbios probada en pruebas *in vitro*.⁽⁴⁵⁾

Hay tres tipos principales de metabolitos secundarios: terpenos, compuestos fenólicos y compuestos que contienen nitrógeno. Los terpenos, compuestos de unidades de cinco carbonos de isopreno, son toxinas y disuaden la ingestión a los herbívoros.

Los compuestos fenólicos, sintetizados fundamentalmente como productos de la ruta del ácido shikimico tienen importantes y variadas funciones en las plantas que van desde la protección UV, hasta atrayentes de polinizadores. Los miembros del tercer grupo de metabolitos secundarios, los metabolitos que contienen nitrógeno, se sintetizan principalmente a partir de aminoácidos comunes. Compuestos como alcaloides, glicósidos cianogenicos, glucosinolatos, aminoácidos no proteicos e inhibidores de proteinasas, protegen a las plantas de una gran variedad de animales herbívoros. ^{(44) (45)}

El reconocimiento de las propiedades que ostentan los metabolitos secundarios ha conducido a la búsqueda de nuevos fármacos, antibióticos, herbicidas e insecticidas. Por su lado, la industria farmacéutica muestra un éxito notable en el descubrimiento de medicamentos originados a partir de productos naturales, entre estos podemos señalar la aspirina, la digoxina, la morfina, la quinina y el taxol. En las plantas los principios activos se hallan siempre biológicamente equilibrados por la presencia de sustancias complementarias, que van a potenciarse entre sí, de forma que en general no se acumulan en el organismo, y sus efectos indeseables están limitados. ⁽⁴⁶⁾

Algunos de los metabolitos secundarios con mayor relevancia debido a su actividad biológica y que son de gran interés para la industria farmacéutica son: alcaloides, flavonoides, esteroides y triterpenos libres, glicósidos cardiotónicos, lactonas sesquiterpénicas, saponinas, quinonas, taninos y cumarinas.

Alcaloides

Constituyen el grupo más grande de metabolitos secundarios de plantas; se encuentran en semillas, raíces, cortezas y hojas: al estado libre como glicósidos o formando sales como ácidos orgánicos. ⁽⁴⁷⁾

No existe una definición exacta para los alcaloides, son considerados como: “Un compuesto orgánico de origen natural (generalmente vegetal), nitrogenado (el nitrógeno se encuentra generalmente intracíclico), derivados generalmente de aminoácidos, de carácter más o menos básico, de distribución restringida, con propiedades farmacológicas importantes a dosis bajas y que responden a reacciones comunes de precipitación”. ⁽⁴⁸⁾

En cuanto a su estado natural, los alcaloides son esencialmente sustancias presentes en todos los órganos de la planta, pueden encontrarse mayoritariamente en hojas (Ej. cocaína, nicotina, pilocarpina), en flores (Ej. escopolamina, atropina), en frutos (Ej. alcaloides del opio, peletiarina, coniina), en semilla (Ej. piperina, arecolina), en corteza (Ej. quinina, tubocurarina), en la raíz (Ej. emetina y cefalina).

Este grupo de metabolito es el de mayor importancia para la industria farmacéutica debido a las propiedades que presenta, entre las que destacan: antiinflamatorio, emolientes y diuréticos, propiedades anestésicas, eméticas, analgésicas, sedante, antiséptico, además de ser un potente agente anticancerígeno, antineoplásico y un potente estimulante del sistema nervioso central. ^{(49) (50)}

Glicósidos Cardiotónicos

Son sustancias constituidas de una porción esteroide, una porción glicosídica y un anillo lactónico insaturado, que actúan sobre el musculo cardiaco y por tanto se utilizan como medicamentos contra la insuficiencia cardiaca. ⁽⁵¹⁾

Los glicósidos cardiotónicos se clasifican en dos grupos:

1. Cardenólidos: poseen una lactona insaturada de 5 miembros (pentagonal) en la posición 17 del núcleo esteroídico y una cadena de 23 carbonos.
2. Bufanólidos: poseen una lactona insaturada de 6 miembros (hexagonal) en la posición 17 del núcleo esteroídico y una cadena de 24 carbonos.

Los cardiotónicos se encuentran distribuidos principalmente en las hojas de plantas de las familias Scrofulariaceae, Apocynaceae, Liliaceaea, Ranunculaceae y Moraceae. Los bufanólidos se han encontrado también en ranas del genero Bufus, y en las alas de la mariposa monarca.

Los glicósidos han sido considerados de interés por su potencial uso farmacológico, poseen acción tónica y fortalecedora del corazón, es decir, aumentan su fuerza contráctil y regulan su ritmo, mientras que algunos tienen propiedades diuréticas, especies del genero Bufus han tomado mayor relevancia por su potencial anticancerígeno.

Esteroides y Triterpenos libres

Los triterpenoides son compuestos con un esqueleto carbonado de seis unidades de isopreno derivados del escualeno, hidrocarburo acíclico de 30 carbonos. Estos pueden contener grupos hidroxilo, cetona, aldehído y ácidos carboxílicos, muy relacionados con los esteroides.

Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, constituyendo un grupo de más de 100 esqueletos distintos. Son importantes para la industria farmacéutica ya que presentan propiedades antiinflamatorias, antihipertensivas y antioxidantes.

Flavonoides

Son compuestos de bajo peso molecular derivados de la unión de tres anillos (C6-C3-C6) compuesto por dos anillos fenilo (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). ⁽⁵¹⁾ Caracterizados por ser polifenólicos y solubles en agua.

Existen al menos diez clases de flavonoides que se encuentran presentes en todas las estructuras de la planta, entre estas encontramos principalmente a: las chalconas, las flavonas, los flavonoles, los flavanoles, las antocianidinas, y los taninos condensados, y otras dos más, las xantonas y las auronas. ⁽⁵²⁾

Entre los efectos benéficos para el hombre, se han reconocido flavonoides como la quercetina, kampferol y miricetina tienen cualidades farmacológicas y protectoras para la salud, demostrando que algunos modulan el sistema inmune y las respuestas antiinflamatorias.

Estas cualidades se deben a que los flavonoides desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos del daño oxidativo; es así como son reconocidas sus actividades antialérgicas, antiinflamatorias, antivíricas, anticancerosas y antioxidantes, ya que contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Igualmente, afectan una gran cantidad de enzimas y proteínas asociadas a la fotofosforilación. Por ello tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer. ⁽⁵³⁾

Taninos

Son compuestos químicos no cristalizables que forman con el agua soluciones coloides, de reacción ácida y de sabor muy acre. Generalmente son toxinas debido a su capacidad de unirse a proteínas. Producen la precipitación de soluciones de gelatina y de alcaloides. Los taninos precipitan las proteínas en solución y se combinan con ellas haciéndolas resistentes a las enzimas proteolíticas.

En medicina se emplean como astringentes del extracto gastrointestinal y de las escoriaciones de la piel. En el tratamiento de las quemaduras las proteínas de los tejidos expuestos precipitan y forman una capa protectora antiséptica bajo la cual tiene lugar la regeneración de los tejidos, ⁽⁵⁴⁾ además presentan propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antibacterianas, cicatrizantes, hemostática, dermatológica, para el tratamiento de hemorroides y úlceras en la boca. ⁽⁵⁵⁾

Saponinas

Son glicósidos cuya aglicona consiste en un núcleo esterooidal o triterpenico. Tienen la propiedad de hemolizar los glóbulos rojos y formar espuma abundante y estable al agitar sus soluciones acuosas, que es la principal característica para su reconocimiento. ⁽⁵⁶⁾ Tienen un sabor acre y amargo, se utilizan como producto mucolítico ya que provocan un aclaramiento del mucus denso, facilitando la expectoración, mediante una ligera acción irritativa sobre las mucosas gástricas.

Se encuentran principalmente en varias familias de la clase monocotiledónea, como son: Liliaceae, Dioscoreaceae y Amaryllidaceae (Agavaceae). En el reino animal, las estrellas de mar constituyen el único ejemplo de animales con saponinas esteroides. ⁽⁵⁷⁾

Son consideradas como precursores de únicos de medicamentos esteroides tales como: hormonas sexuales, corticoides, contraceptivos orales y diuréticos. Sin embargo, algunas saponinas esteroides han mostrado diversas actividades biológicas como: antimicrobiana, citotóxica, antitumoral, ictiotóxica, insecticida, antihelmíntica, expectorante, diurética, cardiovascular, antiinflamatoria, espermicida, analgésica, antipirética, sedante, hemolítica, antimicótica; también son utilizadas como coadyuvantes de la acción de otras plantas, ya que facilitan la oabsorción de los principios activos incrementando su eficacia. ⁽⁵⁴⁾

Naftoquinonas y antroquinonas

Son compuestos orgánicos de origen natural altamente reactivos, se utilizan como colorantes y pigmentos cuyos tonos van desde el amarillo al rojo. Estructuralmente, son compuestos cíclicos derivados del naftaleno. Estos compuestos y sus derivados son, en la actualidad de una gran importancia, debido a que pueden participar en distintos procesos biológicos esenciales para los seres vivos, ya que presentan una notable actividad biológica y poseen gran potencial antibacteriano, antifúngico, antiparasitario, antiespasmódico, insecticida, antiviral y anticancerígeno.

Algunos ejemplos de Naftoquinonas sintetizadas de origen vegetal son: la lawsona, colorante naranja que se encuentra en las hojas y tallos de la henna, la juglona, colorante marrón que se aísla en las especies del género *Juglans* y le confiere en parte el color característico a la cáscara de nuez, la plumbagina, el lapachol, pigmento amarillo que se encuentra en la corteza y la madera de los géneros *Tabebuia* y *Tecoma*, la alkanina y shikonina que se encuentran en las raíces de especies que pertenecen principalmente a los géneros *Alkana*, *Lithospermum*, *Echium*, *Onosma* y *Anchusa* de la familia Boraginaceae.⁽⁵⁸⁾

Cumarinas

Las cumarinas son compuestos derivados de la a-benzopirona. Ampliamente distribuidas en las plantas, principalmente en la familia Umbeliferae y Rutaceae; se encuentran en todas partes de la planta desde la raíz a flores y frutos siendo más abundantes en estos últimos; se presentan a menudo como mezclas, en forma libre o como glicosidos.⁽⁵⁹⁾

Presentan un amplio rango de actividad biológica por ejemplo: la acción anticoagulante y antibacterial del dicumarol, la acción antibiótica de la novobiocina, la aguda hepatotoxicidad y carcinogenicidad de ciertas afloxinas, la actividad astrogenica del cumestrol, la acción fotosensibilizadora de furanocumarinas como el bergapteno y la xantocina, la acción insecticida de los suragin A y B, entre otros: cabe destacar también las aplicaciones de las cumarinas como saborizantes y perfumería.⁽⁶⁰⁾

Lactonas Sesquiterpénicas

Son terpenos con un esqueleto de 15 átomos de carbono, que tienen en su estructura una lactona. Representan los componentes activos de muchas plantas medicinales de la familia Astereaceae.⁽⁶¹⁾

Estos compuestos se obtienen a partir de hojas y flores de plantas como *Milleria quinqueflora*, *Viguiera sylvatica*, *Decachaeta thieleana*, *Vanillomopsis arbórea* y *Arnica montana*, entre otras. Algunos ensayos demuestran que los ensayos de estas plantas, así como también, las lactonas sesquiterpénicas purificadas poseen propiedades antiinflamatorias,⁽⁶²⁾ antibacterianas y antifúngicas,⁽⁶³⁾ además de ser el principio activo responsable de sabor amargo de diferentes drogas.

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*).⁽⁶⁴⁾

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.⁽⁶⁵⁾

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.⁽⁶⁵⁾

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.⁽⁶⁶⁾ Probablemente estos compuestos les confieren sus propiedades medicinales y tóxicas. Las principales propiedades medicinales que se atribuyen al género son analgésicas, dermatológicas, purgantes y contra infecciones respiratorias, aunque también hay algunas que son consideradas tóxicas.⁽⁶⁷⁾

Clasificación cladista de *Asclepias curassavica* L.⁽⁶⁸⁾

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*

Especie: *curassavica* L.

Nombres comunes

A. curassavica es conocida comúnmente como adelfilla, algodoncillo, 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, pericón, revienta muelas, rompe muelas, saca espinas, salvilla, Santa Rosa; además de conocerse con específicos nombres en lengua Otomí, Cora, Maya y Tenek entre otras. ⁽⁶⁹⁾

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, presenta 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. 2) ⁽⁶⁹⁾

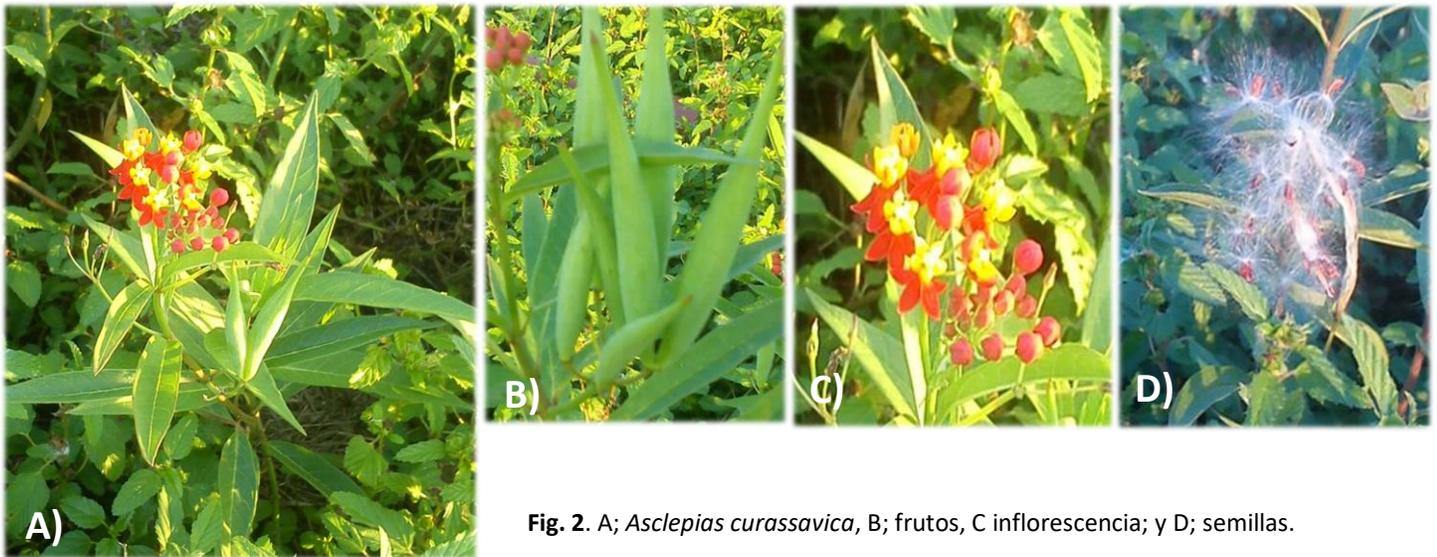


Fig. 2. A; *Asclepias curassavica*, B; frutos, C inflorescencia; y D; semillas.

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, a la orilla de casas, 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. ^{(69) (70)}

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. ^{(66) (71) (72)}

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. ^{(69) (70)}

Estudios citotóxicos de *A. curassavica* y su uso como anticancerígeno

Varios géneros de la familia *Asclepiadaceae* contienen productos químicos biológicamente activos, entre estos se encuentra la especie *Asclepias curassavica* que contienen cardenólidos tóxicos para los vertebrados. Ciertos insectos, especialmente mariposas monarca (*Danaus plexippus*), y chinches (*Oncopeltus fasciatus*), se alimentan de esta planta, utilizando sus productos químicos como defensa contra los depredadores vertebrados. Estudios anteriores han demostrado que la mayoría de las especies de *Asclepias* examinadas contienen mezclas de cardenólidos con concentraciones que varían entre las especies y entre las partes de la planta. ^{(73) (74)}

Los glicósidos cardiotónicos se utilizan en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva y como agentes anti-arrítmicos estos usos son los más comunes, pero actualmente emerge un papel de estos compuestos en la prevención y / o tratamiento de enfermedades proliferativas tales como el cáncer. Nuevos hallazgos en los últimos años han revelado que estos compuestos participan en el control selectivo de tumores humanos, o la proliferación celular anormal. Como tales, representan una forma prometedora de la quimioterapia del cáncer. Nuevos estudios clínicos de su potencial anticancerígeno como tratamientos únicos o complementarios pueden dar una idea de estas opciones terapéuticas potencialmente valiosas además se ha sugerido que puede haber también un papel quimiopreventivo para esta clase de agentes. Así los glicósidos cardiotónicos se deben considerar como una opción terapéutica novedosa. ⁽⁷¹⁾

La calotropina es un glicósido cardiotónico del grupo de los cardenólidos que se ha aislado de *A. curassavica* y se ha utilizado con fines medicinales en muchos países asiáticos. Estudios han mostrado que calotropina exhibe efectos citotóxicos contra varias células cancerosas. ⁽⁷⁵⁾ La actividad citotóxica de la calotropina muestra que este compuesto es un potente agente citotóxico contra líneas celulares de A 549, MDA-MB-231, HepG2, K562, Raji y MCF-7 además se ha comprobado citotoxicidad en células de HeLa y SiHa al trabajar con extractos de la planta (Tabla 4). ^{(76) (77) (78) (75) (79)}

Tabla 4. Estudios citotóxicos de <i>A. curassavica</i> L.	
Título de los principales estudios citotóxicos	Referencias
Actividad citotóxica de calotropina y otros cardenólidos, en células A 549, MCF-7, MDA-MB231 y HepG2	(77)
Actividad citotóxica de calotropina, en células K562 a través de la activación de caspasas	(75)
Actividad citotóxica de cardenólidos y glicósidos cardiotónicos, en células HepG2 y Raji	(78)
Actividad citotóxica de extracto metanolico de raíz, en células HeLa y SiHa	(79)

JUSTIFICACIÓN

El cáncer es considerado una de las principales causas de muerte en el mundo, en el 2012 hubo 8.2 millones de muertes relacionadas con el cáncer de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud ⁽²⁾; en México aproximadamente hay 128,000 nuevos casos de cáncer al año, ocupando el tercer lugar en cuanto a nuevos casos en el continente americano según las estimaciones de la Unión Internacional contra el Cáncer ⁽³⁾. Los cánceres de mayor incidencia a nivel nacional son pulmón, próstata, mama cérvix, y estómago. ⁽¹⁹⁾

Los factores que ocasionan cáncer son muy diversos pero uno de estos que en los últimos años ha tomado relevancia es el estrés oxidativo, caracterizado por reaccionar con distintas biomoléculas generando daños permanentes al ADN, daños que han sido implicados en la carcinogénesis. ⁽⁸⁰⁾ Para el tratamiento del cáncer se han empleado agentes citotóxicos (vincristina, vinblastina, taxol y camptotecina) y radioterapias, los cuales al no ser selectivos afectan tanto a las células cancerígenas como a las normales ocasionando efectos adversos. ^{(4) (80)}

Debido a esto, se hace necesaria la búsqueda de nuevas moléculas, que sean eficientes para disminuir los efectos adversos de esta enfermedad. Motivo por el que en este trabajo se evaluó la actividad antioxidante de los extractos de *A. curassavica* L. en ratones inducidos a un proceso carcinógeno mediante la aplicación de una dosis intramuscular de 20mg/Kg de NiO.

HIPÓTESIS

Asclepias curassavica L. contiene moléculas bioactivas como alcaloides o glicósidos cardiotónicos con reconocido potencial citotóxico, por lo que los extractos hidroalcohólicos de esta planta estimularán la respuesta antioxidante en ratones comprometidos a un proceso carcinógeno, modulando la cantidad de radicales libres.

OBJETIVOS

General

- Evaluar la actividad antioxidante de extractos hidroalcohólicos de hoja, tallo y flor de *A. curassavica* L., en ratones CD1 inducidos a un proceso carcinógeno.

Particulares

- Registrar el contexto etnofarmacológico de *A. curassavica* L. en la comunidad de Limón Chiquito, Cazonos de Herrera, Veracruz.
- Identificar los metabolitos secundarios presentes en los extractos de tallo, hoja y flor de la planta.
- Calcular la concentración plasmática de Nitritos, en los ratones tratados experimentalmente.
- Determinar el efecto de los extractos: tallo, hoja y flor de *A. curassavica* sobre la actividad de catalasa en plasma.

MATERIAL Y MÉTODOS

Localidad y colecta de material biológico

Se colectaron los ejemplares de *A. curassavica* L. el mes de julio del año 2014, en el Ejido Limón Chiquito, Municipio de Cazonces de Herrera, Veracruz (20°40'38'' N y 97°16'30'' O, a 8 msnm). La especie se identificó a través de la Flora Fanerogámica del Valle de México⁽⁸¹⁾⁽⁸²⁾ y fue cotejada en el Herbario FEZA, UNAM por un especialista en el área.

Registro de información etnofarmacológica

La información etnofarmacológica se obtuvo al realizar entrevistas, exclusivamente a los habitantes del lugar de colecta que han utilizado la planta con algún fin terapéutico.

Procesamiento del material vegetal

Cada ejemplar fresco de *A. curassavica* L. fue separado en sus estructuras tallos, hojas y flores, la utilización de la planta de forma fresca fue debido a que se intentó imitar la preparación que le dan en la medicina tradicional, además de evitar la descomposición de algún compuesto si el ejemplar es secado; posteriormente se les dio un lavado exhaustivo con agua destilada por separado a cada grupo. Ya limpios se trituraron con un molino de mano.

Obtención del extracto hidroalcohólico

Para la obtención del extracto se procedió de la siguiente forma, cada 100 g de material fresco y molido de las partes aéreas de *A. curassavica* se sometió a una maceración con 300 ml de una mezcla CH₃CH₂OH:H₂O (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 hasta obtener extracto seco a temperatura ambiente en una campana de extracción con el fin de no elevar la temperatura y con ello modificar la estructura química de algún compuesto presente.

Identificación de metabolitos secundarios

Alcaloides

Los alcaloides con excepción de los alcaloides de amonio cuaternario y 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(NO₃)₃·5H₂O) (J.T. Baker, grado RA) al 8.5% en C₂H₄O₂ (J.T. Baker, grado RA) y 8% de KI (Meyer, grado RA), se mezcló con 200 mL de C₂H₄O₂, posteriormente se aforo a 1L) y el reactivo de Mayer (2.2% de HgCl₂ (J.T. Baker, grado RA) en KI al 25%, se mezcló, y aforo 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.⁽⁸³⁾⁽⁸⁴⁾

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^{2+}) que da un precipitado blanco-amarillento.

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 consiste 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 adiciono 2 mL de H_2O_2 (Meyer, grado RA) y H_2SO_4 (Reasol, grado RA); seguido de un calentamiento por 5 min; bajo estas condiciones se hidrolizan los enlaces glicosídicos y se oxidan las antranas y antronoles hasta antraquinonas, éstas se extrajeron 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 NH_4OH (J.T. Baker, grado RA). En caso de presencia, al dejar separar la capa alcalina toma una coloración rosa al rojo intenso.

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 Lieberman- Burchard (CHCl_3 y $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ (1:1) (Sigma, grado RA) en medio ácido (H_2SO_4).

Esta reacción se llevó 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.^{(85) (86) (83)} Para ello, 5 μL de un stock de 500 mg/ml de extracto hidroalcohólico se sometio a cromatografía bidimensional empleando cromatofolios en base de aluminio (Silica gel 60 F₂₅₄, 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 deja secar, para posteriormente revelar con el reactivo de Lieberman-Burchard y se someterlo a calentamiento (110 °C) durante 2 min.

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 Mg^{2+} y 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. ⁽⁸⁴⁾ Para ello, 500 mg de extracto se disolvió en CH₃CH₂OH:H₂O (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 Y-benzopirona (flavonas, flavonoles, flavononas, flavanoles, Isoflavonoides y xantonas).

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 que se extraigan 500 mg de extracto con CH₃CH₂OH:H₂O (7:1). Estos deben ser solubles en (NH₂)₂ CO (J.T. Baker. G.A) 10 M y producir coloraciones verdes, azules o negras tras la adición de 100 µL de FeCl₃·6H₂O (Mallinckrod, G.A) al 10%.

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.

Glicósidos cardiotónicos

Son heterósidos formados por una parte glucídica constituida por una o varias unidades de azúcar y un aglicón, con un núcleo esteroídico (C₂₇, tetracíclico) unido a un anillo lactónico insaturado. ⁽⁸⁷⁾ Para su identificación se emplearon reactivos de coloración para cada una de las unidades constituyentes, para ello se preparara 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 H₂O, se adiciono 1 ml del Reactivo Keller-Killiani (FeCl₃·6H₂O 2% en CH₃COOH (Mallinckrod, G.A), 1-3 gotas de H₂SO₄ y se debe observar una coloración verde o pardo en caso de presencia de azucares, para el núcleo esteroidal 1 ml del Reactivo Lieberman-Burchard (100 ml CHCl₃ y (CH₃CO)₂O), 1-3 gotas de H₂SO₄, se observan tonalidades rosa, rojo, azules o verdes, y para la lactona, 1-3 gotas del Reactivo de Baljet (1% Acido pícrico (J.T. Baker) en CH₃CH₂OH y 10% NaOH), se observa un color rojo-naranja estable.

Cumarinas

Son compuestos derivados de la α -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 μ L de un stock de 500 mg/ml de extracto hidroalcohólico se sometieron 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 eluída 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, dejando 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.

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.

Inducción de carcinoma a modelos experimentales

Se trabajó con nueve grupos de ratones hembra CD-1 de un mes de edad; cada grupo se componía de cinco ejemplares, todos estuvieron bajo condiciones óptimas dentro del bioterio de la FES Zaragoza. El primer grupo denominado Grupo A fue el control negativo y no se le dio ningún tratamiento, el siguiente grupo, el Grupo B se le administró intramuscularmente aceite de oliva extra virgen el cual sirvió de vehículo en la inducción. La inducción del carcinoma se realizó a siete de los nueve grupos (es decir a los grupos C, D, E, F, G, H, e I) administrando una dosis intramuscular de 20mg/Kg de NiO (Sigma, grado RA), y solo a seis de estos grupos inducidos (excepto el grupo C) después de tres meses de la inducción se les dio tratamiento con extractos hidroalcolicos de tallo, hoja y flor administrando una dosis alta de 35mg/kg o una baja de 20mg/kg según la DL_{50} . Esto de acuerdo con Ortiz (et al), 1995. ⁽⁸⁸⁾

En la Tabla 5, se muestran cada uno de los grupos, su denominación y descripción de cómo se trabajó con cada uno de ellos.

Tratamiento con extractos hidroalcohólicos

Después de tres meses de la inducción del carcinoma con NiO se administró una dosis diaria del extracto a cada ratón según le correspondía durante 9 días.

Tabla 5. Trabajo experimental con los ratones hembra CD-1.

GRUPO	DENOMINACIÓN	DESCRIPCIÓN
A	Control negativo	Sin ningún tratamiento o inducción.
B	Vehículo	Dosis intramuscular de Aceite de Oliva extra virgen.
C	Control positivo	Inducción a Cáncer con NiO
D	Experimental Tallo/Alta (Dosis 35mg/Kg)	Inducción a Cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de tallo.
E	Experimental Tallo/Baja (Dosis 20mg/Kg)	Inducción a Cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de tallo.
F	Experimental Hoja/Alta (Dosis 35mg/Kg)	Inducción a Cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de hoja.
G	Experimental Hoja/Baja (Dosis 20mg/Kg)	Inducción a Cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de hoja.
H	Experimental Flor/Alta (Dosis 35mg/Kg)	Inducción a Cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de flor.
I	Experimental Flor/Baja (Dosis 20mg/Kg)	Inducción a Cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de flor.

Obtención de plasma

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

Cuantificación de nitritos de sodio (NaNO₂) 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.

Para su cuantificación se tomaron 25 µL de plasma; simultáneamente se preparó una curva patrón de NaNO₂ (J.T. Baker, grado RA), en concentración de 0 a 100 µM, de la disolución stock de NaNO₂ se realizaron las disoluciones pertinentes. Se adiciono de manera secuencial 1 ml de Sulfanilamida (J.T. Baker, grado RA) 2% (p/v) en H₃PO₄ (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.

Cuantificación de proteína total por el método de Biuret

Se basa en la formación de un cromóforo violeta por la reacción del Cu²⁺ y cuatro grupos NH de los enlaces peptídicos en medio básico. Con base en lo anterior se tomaron 25 µL de plasma; simultáneamente se preparó una curva patrón de albumina de suero (Sigma), en el intervalo de concentración de 0 a 10 mg/ml, en donde de la disolución patrón de albumina de suero se realizaron las disoluciones pertinentes. Se adiciono 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.

Actividad de catalasa por el método de Chance y Machley

Protocolo basado con modificaciones, en el método estandarizado de Chance y Machley (1954).⁵² Se basa 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 μL de sustrato (H_2O_2 30 mM en solución PBS, pH 7.0) (LASA, grado RL)) y 50 μL de plasma. Se registró la absorbancia a 240 nm (A_{240}) cada 10 s durante 3 min. Se calculó el cambio en la absorbancia a 240 nm por minuto (ΔA_{240}) como la pendiente de la parte lineal de la gráfica de A_{240} contra el tiempo.

Se calculó la actividad de catalasa con la siguiente ecuación: $\text{UCAT/ml} = (\Delta A_{240}/\epsilon)$ (FD de la reacción)

Donde ϵ es el coeficiente de extinción molar del H_2O_2 a 240 nm (37.36 μmol^{-1} ml Abs); y FD es el factor de dilución (1500/50= 30).

Se corrigió la concentración de proteína en cada muestra (determinada por el método de Biuret), utilizando la siguiente fórmula: $\text{UCAT/mg} = ((\Delta A_{240}/\epsilon)$ (FD de la reacción)) /mg/ml de proteína. Una unidad de catalasa se definió como la cantidad de enzima necesaria para reducir un μmol de H_2O_2 /minuto.

Análisis estadístico

Los datos fueron sometidos a un análisis estadístico de varianza, considerando éste como no paramétrico en un nivel de confianza del 95%. Los datos significativos fueron representados como ($p < 0.05$).⁽⁸⁹⁾

RESULTADOS

Registro etnofarmacológico de *Asclepias curassavica* L.

El registro etnofarmacológico está fundamentado en una entrevista directa a personas de la comunidad de Limón Chiquito, Municipio de Cazonces de Herrera, en el Estado de Veracruz, que han utilizado esta planta con algún fin terapéutico y los datos más representativos son:

Se aplicaron 50 entrevistas, lo cual representa el 5.22% de la población en la comunidad; esta fracción presentó una edad promedio de 38 años, correspondiendo el 70% a mujeres y el resto a hombres.

En la comunidad la planta *Asclepias curassavica* L. Es conocida con el nombre común de “revienta muelas” o “algodoncillo”, y las personas identifican en qué lugares de la comunidad abunda esta planta. La utilización para fines benéficos en su salud es usual ya que principalmente las personas entrevistadas utilizan esta planta en padecimientos dermatológicos, seguido por usos como analgésica, anestésica, purgante, cardiotónica, en afecciones respiratorias y como antihemorroidal; en general su efecto es irritante y la vía de administración es tópica para los casos dermatológicos y analgésicos. Fig. 3



Fig. 3 Porcentaje de las afecciones tratadas con *A. curassavica* por las personas entrevistadas en la comunidad de Limón Chiquito, Veracruz.

La estructura más utilizada de la planta es el látex con un 52%, seguido de las flores con 22%, hojas 10%, tallos 8% y semillas 8%, estos porcentajes están ligados con la forma de preparación y procedimiento curativo. Fig. 4

Para el caso del látex la aplicación es de forma directa para tratar heridas, infecciones y quitar verrugas, para la utilización de las flores, estas se muelen y posteriormente se prepara una cataplasma, con los tallos se hace un extracto acuoso, con las hojas se prepara de un extracto acuoso o bien un extracto alcohólico en el que aproximadamente se toma una parte de alcohol por dos de agua y por último la utilización de la semilla se hace introduciéndola en la picadura de la muela para así aliviar dolor.

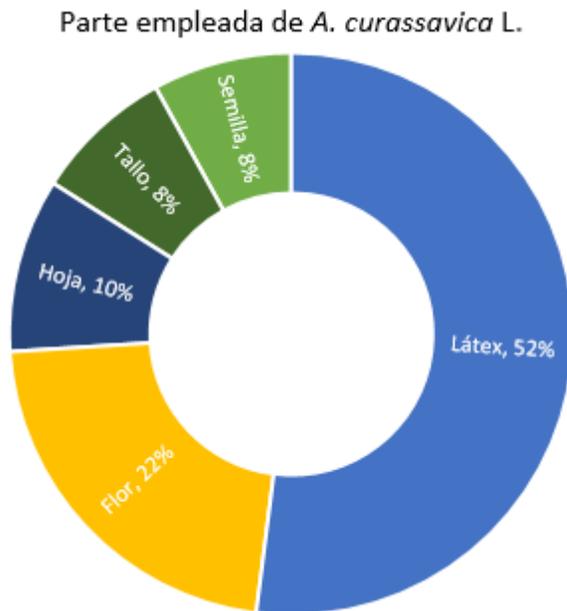


Fig. 4 Porcentaje de las partes empleadas de *A. curassavica* por las personas entrevistadas de la comunidad de Limón Chiquito, Veracruz.

El conocimiento etnofarmacológico de las plantas permite tener un mayor entendimiento de los resultados obtenidos al realizar ensayos científicos y así mismo entender la razón de su utilización y los efectos que estas presentan al ser preparadas en su forma tradicional en ciertas comunidades. *A. curassavica* es una planta que actualmente tiene un equilibrio de lo que se evalúa en los laboratorios y lo que se conoce de ella en la medicina tradicional.

De acuerdo con la información recabada podemos señalar aspectos importantes en el estudio de la especie como: la utilización de estructuras de la planta que no fueron analizadas en este trabajo, en específico la semilla y la raíz,

elementos que requieren atención en trabajos posteriores, así mismo es de gran interés hacer un análisis minucioso del látex presente en esta planta, debido a la gran utilización de este y los potenciales efectos que presenta.

Los usos dérmicos que le dan al látex las personas de la comunidad muestran un efecto citotóxico al ayudar a eliminar nacidos o verrugas de su piel, acentuando que el resultado se da sin presentar un daño considerable sobre la piel normal o sana, lo cual nos habla de cierta selectividad en su efecto. Esto lo describen las personas entrevistadas que favorecieron a enriquecer este trabajo; así junto a los datos etnofarmacológicos y pruebas científicas presentes en esta investigación permiten integrar y analizar el potencial farmacológico de *A. curassavica*.

Metabolitos secundarios identificados en *Asclepias curassavica* L.

El análisis fitoquímico de los extractos (70:30) de tallo, hoja y flor muestran los diferentes metabolitos secundarios presentes en cada estructura de la planta; la presencia más destacada es de los alcaloides, flavonoides, glicósidos cardiotónicos, cumarinas, y lactonas sesquiterpénicas compuestos reconocidos mediante reacciones químicas de identificación hechas a los diferentes extractos y presentados en la siguiente tabla. (Tabla 6).

Descripción física de los extractos hidroalcohólicos de *A. curassavica* L.

Aspecto de masa homogénea, consistencia blanda, color verde oscuro para los de tallo y hoja, color café en el caso de flor, todos libres de partículas extrañas. Con rendimientos de 3.93 (tallo), 2.43 (hoja) y 2.72 (flor) % por cada 100 g de vegetal respectivamente.

Tabla 6. Presencia de los metabolitos secundarios en las diferentes estructuras de *A. curassavica* L.

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				

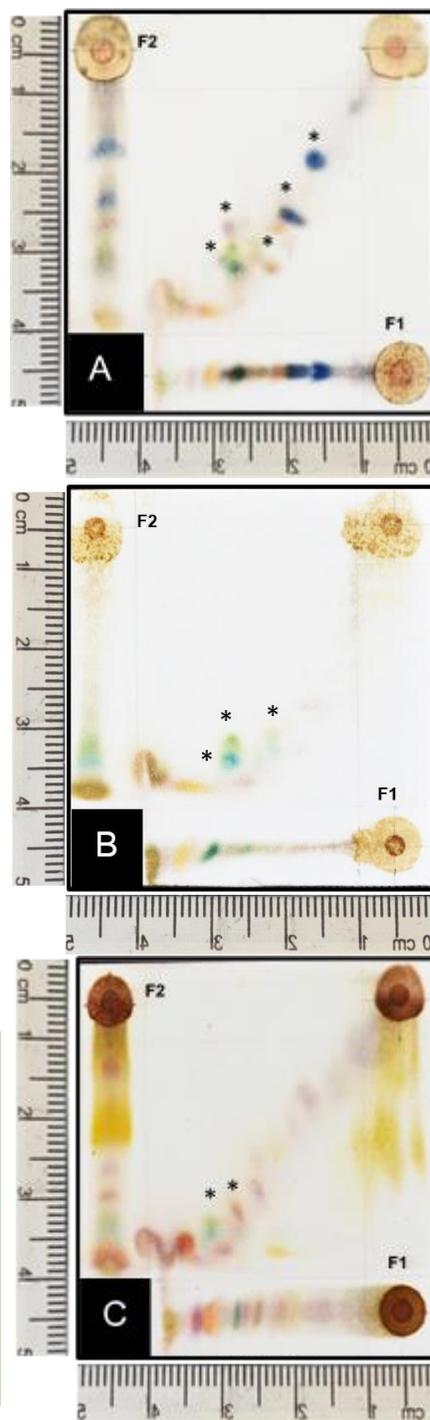
De los metabolitos secundarios que tuvieron presencia abundante en este análisis fitoquímico, los alcaloides representan un resultado relevante debido a sus diferentes usos y efectos farmacológicos reportados, además de que estos metabolitos estuvieron presentes en las tres estructuras evaluadas, aunque en mayor concentración en el extracto de flor.

Estudios químicos en especies del género *Asclepias* han demostrado que estas biosintetizan diversos alcaloides derivados del indol, de la piridina o de la fenantroindolizidina, ⁽⁶⁸⁾ lo cual se confirma en este estudio durante el proceso de purificación, filtrados A, D y capa acuosa 3 en las que se observó mayor concentración de alcaloides dado que la cantidad de precipitado es proporcional a la concentración de alcaloides en la muestra (Tabla 6). Los alcaloides fenantroindolizidinicos 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 toxicas. ⁽⁹⁰⁾ También hay presencia de alcaloides de amonio cuaternario o N-óxidos de amina en los tres órganos de esta planta.

Particularmente para *A. curassavica* L. se han reportado la presencia de alcaloides derivados de la 2-metoxi-pirazina, ⁽⁹¹⁾⁽⁹²⁾ a la cual se le atribuyen actividades citotóxicas, siendo estos efectos biológicos parte de la causa actual en la utilización de *A. curassavica* para la obtención de metabolitos y el posterior tratamiento en pruebas contra el cáncer, además estos compuestos son los responsables de las propiedades anestésicas ya que actúan normalmente sobre el sistema nervioso central. ⁽⁹⁰⁾

Los esteroides y triterpenos libres fueron detectados mediante la cromatografía bidimensional, la cual revelo la presencia de estos compuestos en los tres órganos estudiados de esta planta; la aparición de diversas tonalidades rojas, azules y verdes denota la presencia de estos metabolitos (Fig. 5). Los tallos presentaron un mayor número de estos compuestos, seguido 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 1 (F1), compuesta por cloroformo, metanol y agua, sin embargo, al aplicar la segunda fase (F2) con acetato de etilo, metanol y agua hay una mayor resolución de estos (Fig. 5).

Fig. 5 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).



No existen diferencias fundamentales entre triterpenos y esteroides, generalmente éstos últimos pueden ser considerados como triterpenos tetracíclicos, o pueden 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. ⁽⁹³⁾

La reacción de Shinoda utilizada para el caso de flavonoides dio positivo únicamente para el extracto de flor, estos de tipo flavonoles al observarse un cromóforo rojo cereza cuando se adiciono el ácido clorhídrico. Cabe indicar 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. 6). Es importante mencionar que estos compuestos no han sido reportados para esta planta, dando relevancia y profundidad a este estudio.

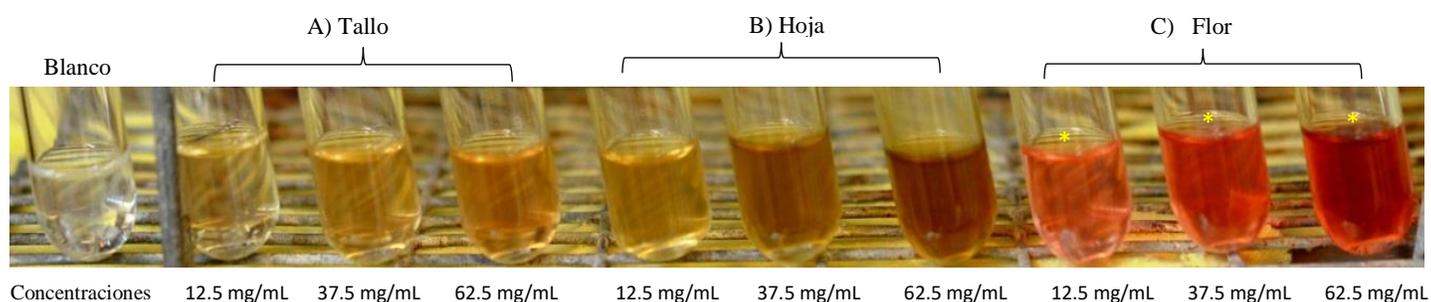


Fig. 6 Identificación de flavonoides en extractos hidroalcohólicos de *A. curassavica*. La formación del cromóforo rojo indica la presencia de estos metabolitos secundarios (asteriscos en color amarillo). A: Extracto hidroalcohólico (70:30) de tallo; B: Extracto hidroalcohólico (70:30) de hoja; C: Extracto hidroalcohólico (70:30) de flor.

Los flavonoides desempeñan un papel importante 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. ⁽⁹⁴⁾ 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. ⁽⁹⁵⁾ Los flavonoides han mostrado actividad antiinflamatoria in vitro e in vivo. Uno de estos mecanismos es por inhibición de eicosanoides generadores de enzimas, incluyendo fosfolipasa A2, ciclooxigenasa y lipoxigenasa, reduciendo así la presencia de prostanoides 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. ^{(96) (97)}

Los flavonoides presentan además de sus efectos antioxidantes otras propiedades como 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. ⁽⁹⁸⁾

Estudios reportan la acción antiproliferativa, antimutagénica, anticarcinogénica, así como el papel de agente quimiopreventivo de los flavonoides. ^{(99) (100)}

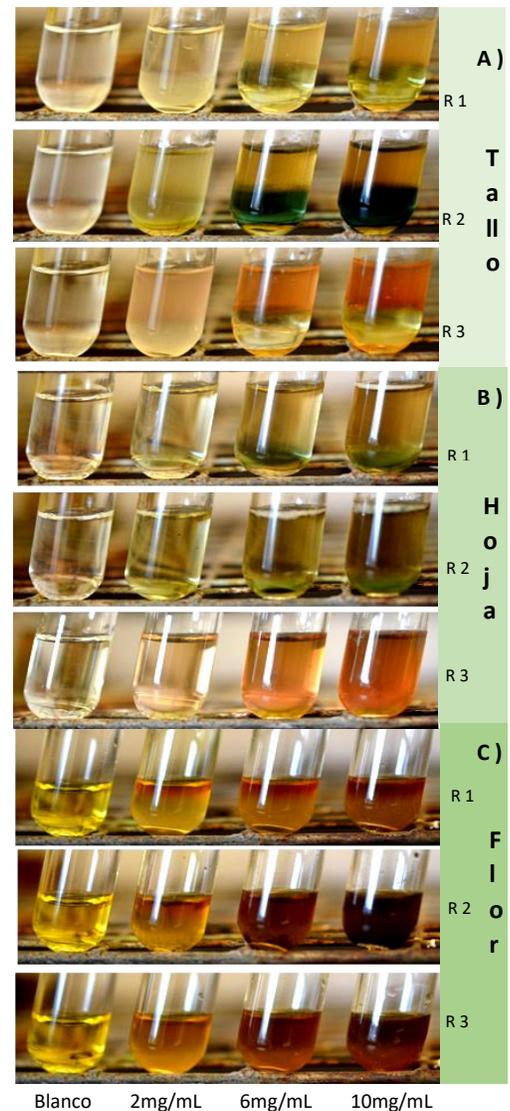
Los glicósidos cardiotónicos son metabolitos representativos de este género. En la especie *A. curassavica* L. se han identificado numerosos cardenolidos en las partes aéreas (Fig. 8), ^{(91) (101) (102)} glicósidos esteroidales en raíz ^{(76) (73) (103) (77) (104)} y semillas. ⁽¹⁰⁵⁾ Dentro de estos, la Calotropina, voruscharina 16 α -acetoxicalotropina, 15 β -hidroxicalotropina, calactina, 15 β -hidroxicalactina, asclepina, 16 α hidroxiasclepina, uscharidina, uscharina y uzarigenina son los más acreditados debido a los efectos exhibidos. ^{(76) (73) (103)}

La eficacia de los glicósidos cardiotónicos, los ha convertido en medicamentos de elección para el tratamiento de la insuficiencia cardiaca congestiva y como agentes antiaritmicos. Sin embargo, es menos conocido el papel emergente que tienen estos compuestos en la prevención y/o tratamiento de enfermedades proliferativas como el cáncer. ⁽¹⁰⁶⁾ Recientemente se ha revelado que estos compuestos participan en los mecanismos de transducción de señal celular compleja, resultando en un control selectivo de tumores humanos, pero no en la proliferación celular normal. ⁽¹⁰⁶⁾

En las pruebas se identificaron en mayor concentración glicósidos cardiotónicos en hojas, seguido de tallos y por último en flores. 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. 7).

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, y alteración en la homeostasis de K⁺, Na⁺ y Ca⁺⁺. ⁽¹⁰⁷⁾ Cabe mencionar que los mecanismos aún no están totalmente dilucidados.

Fig. 7 Identificación de estructuras de los glicósidos cardiotónicos en extractos hidroalcohólicos de *A. curassavica*. Reacción 1 (R1): Cromóforo verde indica azúcares (Reactivo KellerKilliani); Reacción 2 (R2): núcleo esteroidal coloración verde o pardo (Reactivo Lieberman-Burchard); Reacción 3 (R3): 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.



Estudios revelan actividades citotóxicas de los glicósidos cardiotónicos presentes en *A. curassavica* frente a líneas celulares A 549, MCF-7, MDA-MB231, HepG2, SiHa y Raji. ^{(77) (78) (79)} 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. ⁽⁷⁵⁾

También hay trabajos con estos metabolitos presentes en *Asclepias* y su actividad antifúngica para *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Trychophyton mentagrophytes*, *Trychophyton rubrum*, *Clostridium histolyticum* y *Escherichia coli*. ^{(108) (109) (110)}

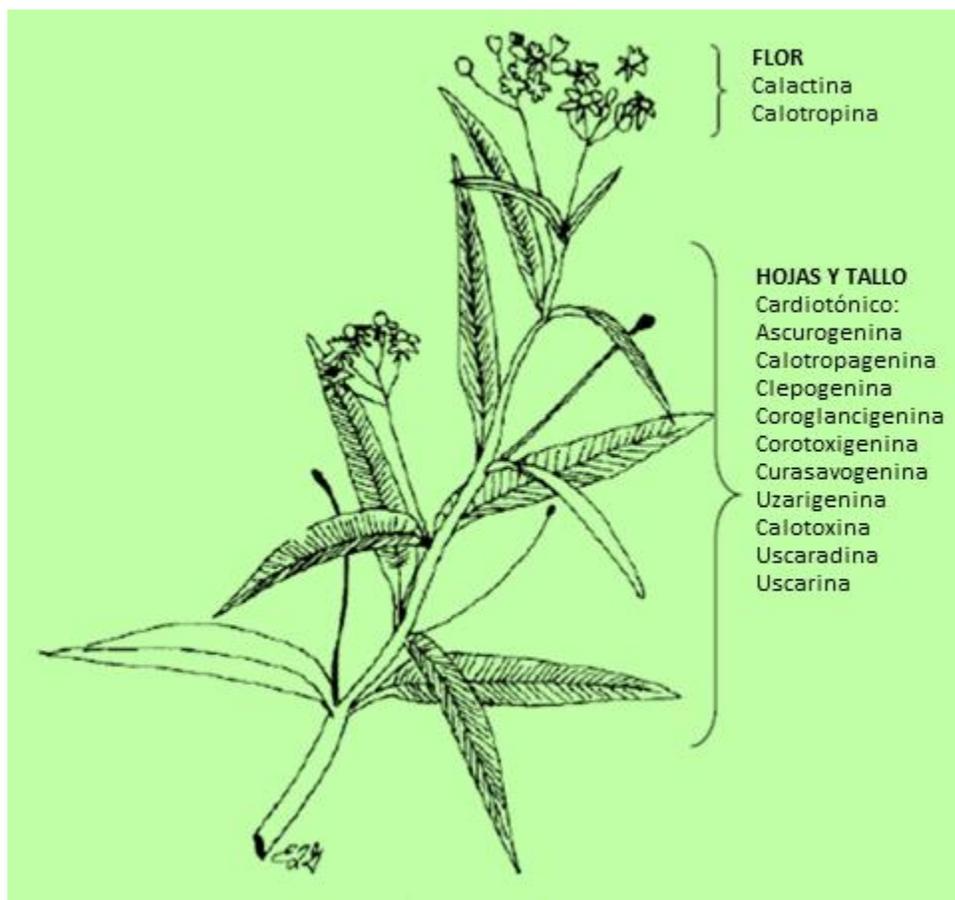
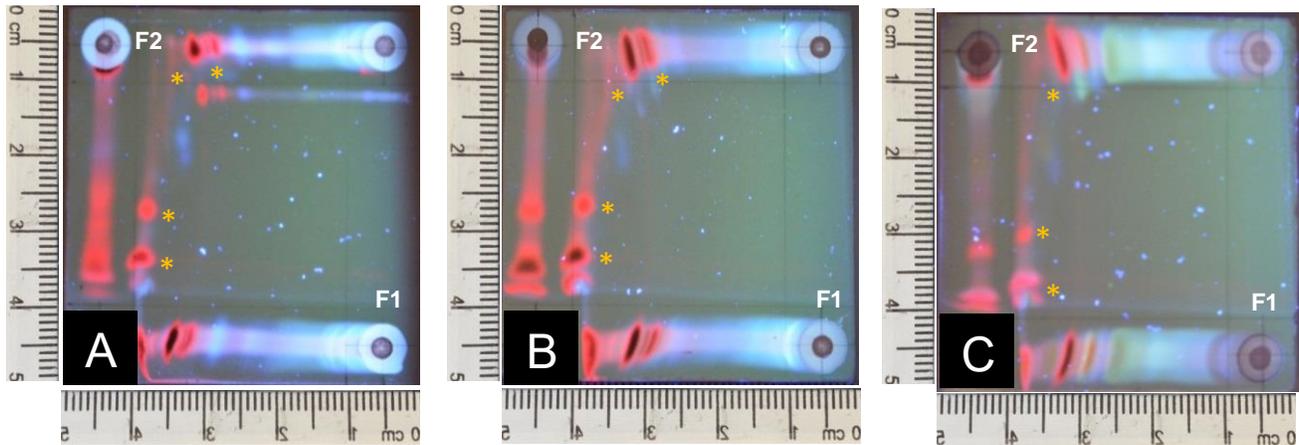


Fig. 8 Glicósidos cardiotónicos de Flor, tallo y hojas de *A. curassavica*. (Tomado y modificado de "Taxonomía de *A. curassavica*", E. F. Gilman, 1999).

En la cromatografía bidimensional para la detección de cumarinas se utilizaron como fase móvil una mezcla de cloroformo:metanol:agua en proporción (87:17:1) y una mezcla de cloroformo:acetona en proporción (90:10), esta última permitió una mejor separación de estos metabolitos, encontrándose coloraciones naranja fluorescente bien definidas y similares en los tres extractos, sobre todo en tallo y hoja, para el de flor fue un poco menos definida (Fig. 9). Estas son justificadas al ser reveladas con la reacción del Hidroxamato férrico.

Las cumarinas son un metabolito que no está reportado en la literatura científica para este género y particularmente tampoco para *A. curassavica*. De manera que es necesario aplicar técnicas más sensibles para su validación.

Fig. 9 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, (ver Tabla 6). Esto se definió conjuntamente con las reacciones para cumarinas, esteroides y triterpenos libres (Fig. 5 y Fig. 9). 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*,⁽⁵³⁾ *Vanillomopsis arborea*⁽¹¹¹⁾ y *Arnica montana*,⁽¹¹²⁾ entre otras. Algunos ensayos demuestran que los extractos de estas plantas, así como también, las lactonas sesquiterpénicas purificadas poseen propiedades antiinflamatorias.^{(113) (114)} En *A. curassavica*, posiblemente estos compuestos se encuentren formando parte de la unidad aglicona de los glicósidos cardiotónicos.

Las naftoquinonas, antraquinonas, y saponinas, fueron grupos que no se detectaron en ninguno de los órganos evaluados en el presente estudio y ciertamente no existen reportes en la literatura consultada para especies del género *Asclepias*, en cuanto a los taninos fueron otro de los grupos que no se detectaron en este estudio, pero que si se han reportado para otras especies del género como *A. glaucescens* y *A. hypoleuca* con propiedades astringentes.⁽⁹⁰⁾

Efecto de los extractos hidroalcohólicos de *A. curassavica* sobre los niveles de Nitritos de Sodio (NaNO₂) en plasma de ratones CD1 inducidos con NiO

Respecto a la evaluación de la actividad antioxidante, los resultados indican que el tratamiento con algunos de los extractos de *A. curassavica* disminuyen significativamente la concentración de nitritos de sodio (NaNO₂) en plasma, siendo mayor la disminución para el grupo tratado con el extracto de flor (Grupos H e I).

NIVELES DE NaNO₂ EN PLASMA

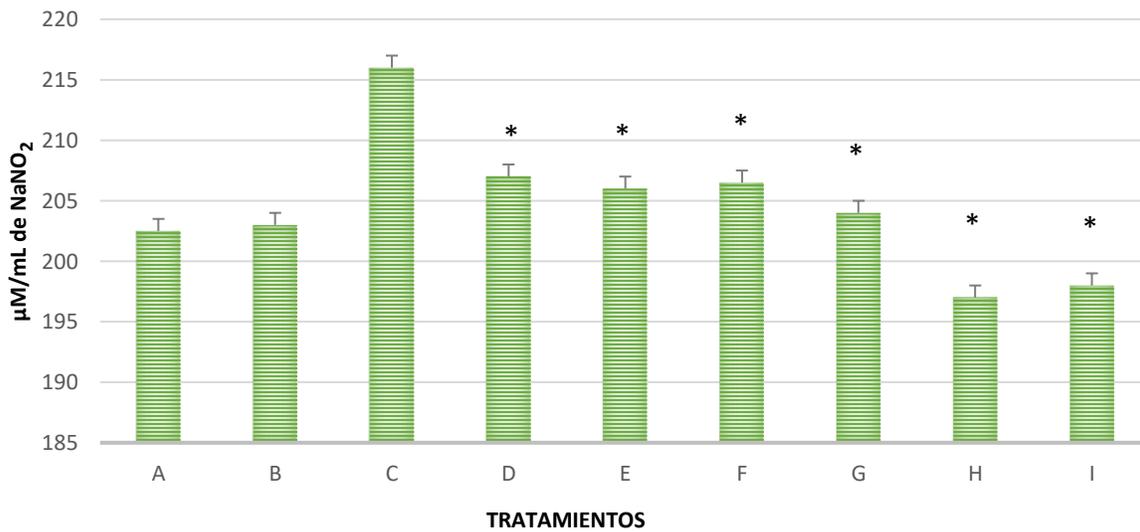


Tabla 7. Trabajo experimental de cada grupo

GPO.	DENOMINACIÓN	DESCRIPCIÓN
A	Control negativo	Sin ningún tratamiento o inducción.
B	Vehículo	Dosis intramuscular de Aceite de Oliva extra virgen.
C	Control positivo	Inducción a Cáncer con NiO
D	Experimental Tallo/Alta (Dosis 35mg/Kg)	Inducción a Cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de tallo.
E	Experimental Tallo/Baja (Dosis 20mg/Kg)	Inducción a Cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de tallo.
F	Experimental Hoja/Alta (Dosis 35mg/Kg)	Inducción a Cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de hoja.
G	Experimental Hoja/Baja (Dosis 20mg/Kg)	Inducción a Cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de hoja.
H	Experimental Flor/Alta (Dosis 35mg/Kg)	Inducción a Cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de flor.
I	Experimental Flor/Baja (Dosis 20mg/Kg)	Inducción a Cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de flor.

Fig. 10 Efecto de los extractos hidroalcohólicos de *A. curassavica* sobre los niveles de nitritos de sodio en plasma de ratones hembra (CD-I) inducidos a un proceso carcinógeno. Los valores del análisis estadístico representan experimentos independientes. *Valores con diferencia significativa con respecto al Grupo. C, p<0.05.

Los gráficos muestran un aumento significativo en los niveles de nitritos de sodio en plasma 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 la concentración de estos compuestos.

El extracto de flor a dosis alta presenta niveles de nitritos de sodio muy por debajo del control, para el caso del extracto de tallo y hoja muestran resultados significativos a dosis bajas (Fig. 10).

Cuantificación de NaNO₂ en plasma de ratones hembra de la cepa CD-1 tratados con NiO y extractos hidroalcohólicos de *Asclepias curassavica* L. (Día 1, 3, 5, 7 y 9).

Fig. 11



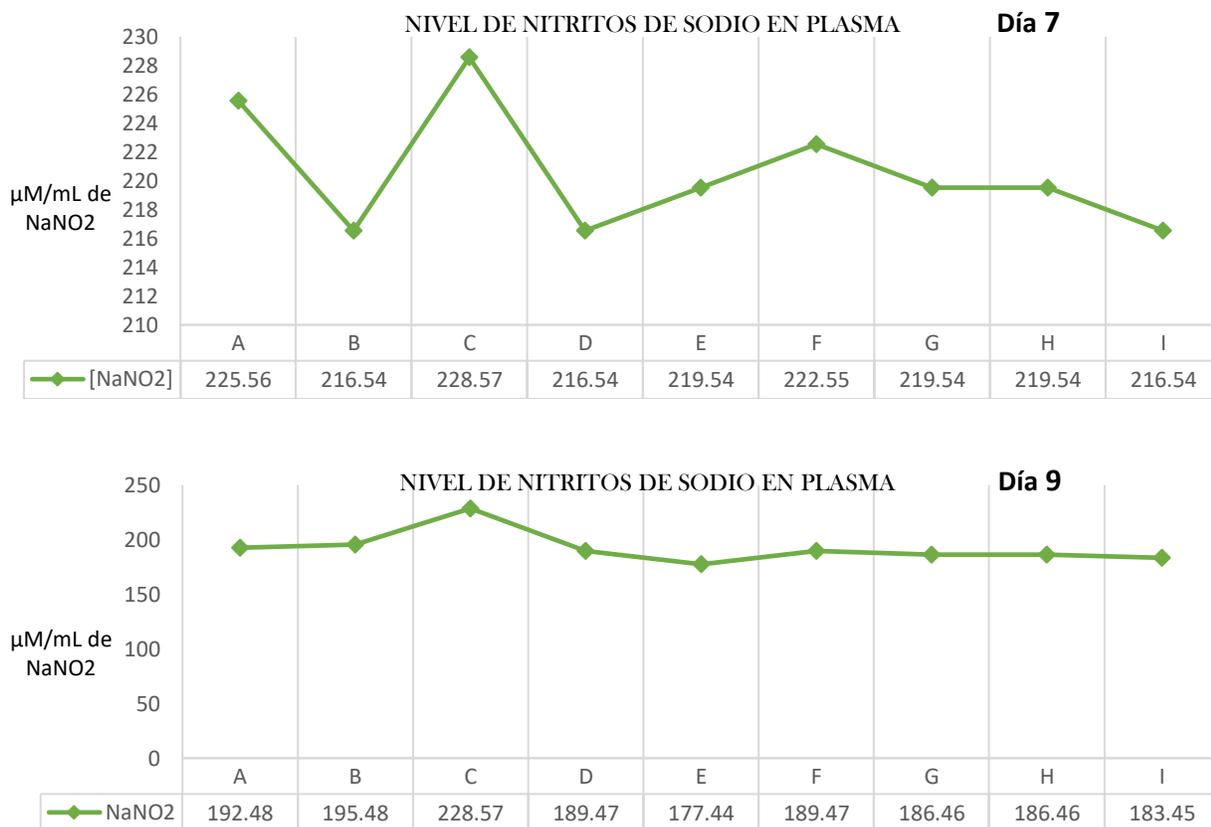


Fig. 11. Efecto de los extractos hidroalcohólicos de *A. curassavica* sobre los niveles de nitritos en el plasma de ratones hembra (CD-I) inducidos a cáncer, en un periodo de 9 días. El trabajo experimental de cada grupo es el mismo que se presenta en la Tabla 7. Los valores del comportamiento grafico representan experimentos independientes realizados en el tiempo mencionado.

Los extractos hidroalcohólicos de *A. curassavica* generaron variaciones sobre los niveles plasmáticos de nitritos de sodio lo cual nos indica de forma directamente proporcional la formación de radicales, estas variaciones se observan durante los nueve días de tratamiento. El grupo inducido a cáncer aumento sus concentraciones durante los días de tratamiento con respecto al control, el grupo tratado con el vehículo se mantuvo constante y, por el contrario, los grupos inducidos a cáncer y tratados con el extracto hidroalcohólico de tallo, hoja y flor presentaron una disminución notable al tercer día, al quinto día un aumento y posteriormente la tendencia es un declive en los días restantes (Fig. 11).

Comparando los resultados del análisis fitoquímico con los de la cuantificación de óxido nítrico podemos relacionar la disminución de los niveles plasmáticos de este radical con la presencia abundante de flavonoides en el extracto de flor, considerando las reconocidas propiedades antioxidantes de estos metabolitos y que 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-prostanoide 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), lo cual puede tener su efecto aquí. ⁽⁹⁴⁾ ⁽¹¹⁵⁾ ⁽¹¹⁶⁾

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. 12).

ACTIVIDAD DE CATALASA EN PLASMA

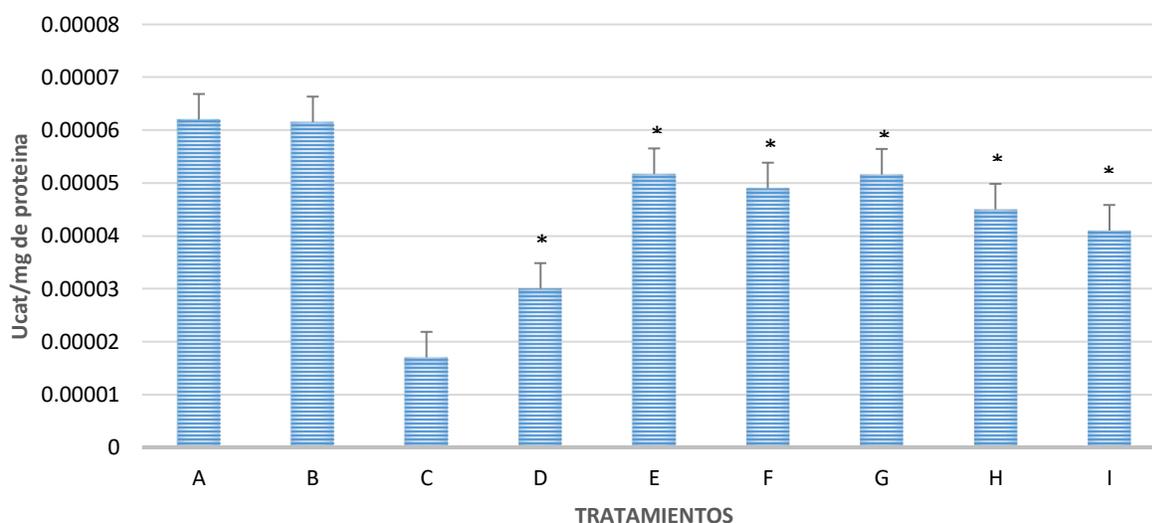


Fig. 12 Efecto de los extractos hidroalcohólicos de *A. curassavica* sobre la actividad de catalasa en plasma de ratones hembra (CD-I) inducidos a un proceso carcinógeno. Los valores del análisis estadístico representan experimentos independientes. *Valores con diferencia significativa con respecto al Grupo. C, $p < 0.05$.

Tabla 8. Trabajo experimental de cada grupo

GPO.	DENOMINACIÓN	DESCRIPCIÓN
A	Control negativo	Sin ningún tratamiento o inducción.
B	Vehículo	Dosis intramuscular de Aceite de Oliva extra virgen.
C	Control positivo	Inducción a Cáncer con NiO
D	Experimental Tallo/Alta (Dosis 35mg/Kg)	Inducción a Cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de tallo.
E	Experimental Tallo/Baja (Dosis 20mg/Kg)	Inducción a Cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de tallo.
F	Experimental Hoja/Alta (Dosis 35mg/Kg)	Inducción a Cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de hoja.
G	Experimental Hoja/Baja (Dosis 20mg/Kg)	Inducción a Cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de hoja.
H	Experimental Flor/Alta (Dosis 35mg/Kg)	Inducción a Cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de flor.
I	Experimental Flor/Baja (Dosis 20mg/Kg)	Inducción a Cáncer con NiO + extracto hidroalcohólico de flor.

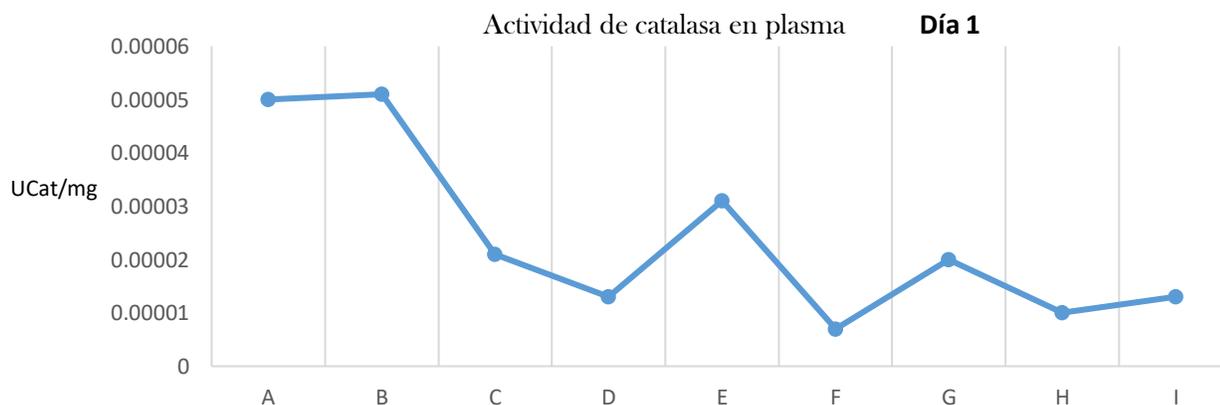
Con respecto a la actividad de catalasa se observó un incremento de 0.000036 UCat/mg proteína en el grupo tratado con el extracto hidroalcohólico de tallo, lo que nos indica una disminución de radicales libres y estimulación del sistema antioxidante de catalasa. Posiblemente esta actividad antioxidante es mediada por los glicósidos cardiotónicos que presentan un alto potencial quimiopreventivo contra las especies reactivas de oxígeno,⁽¹¹⁷⁾ y que están principalmente presentes en los extractos de tallo y hoja de acuerdo al análisis fitoquímico, además la presencia de los 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.⁽⁹⁵⁾

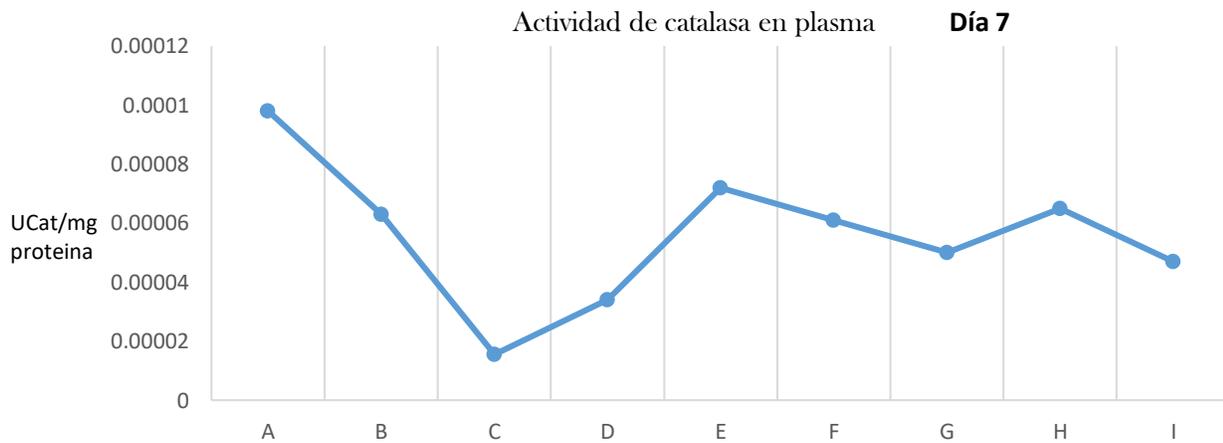
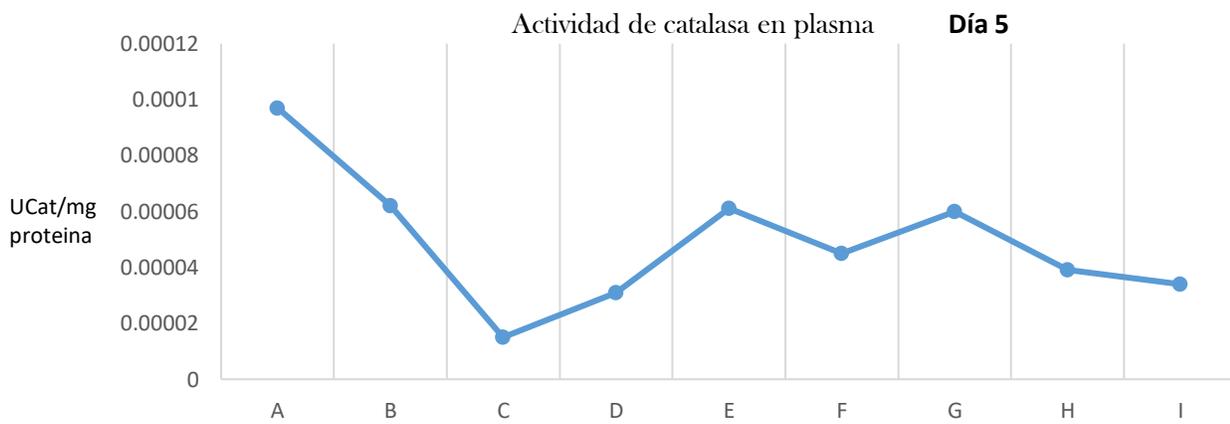
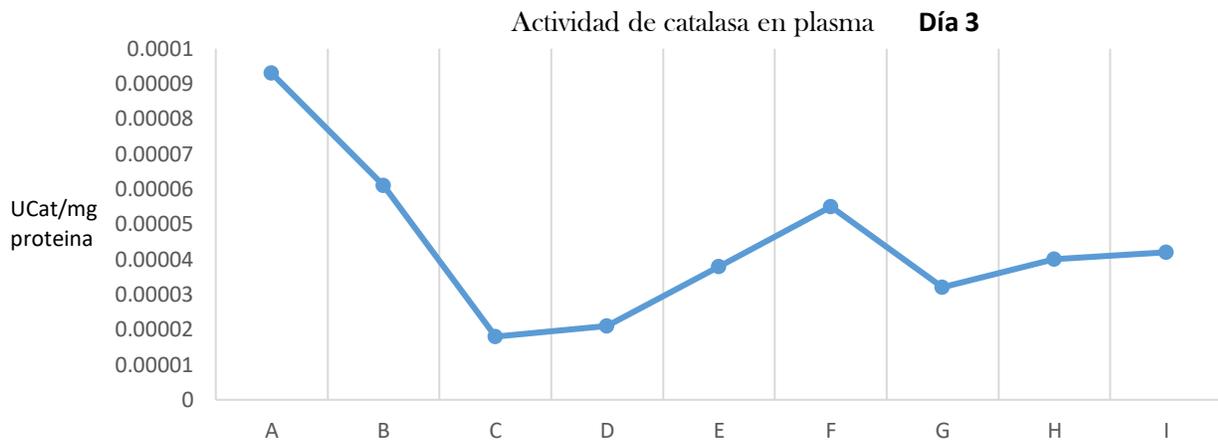
Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, fundamentalmente hacia los radicales hidroxilo y superóxido, especies altamente reactivas implicadas en el inicio de la cadena de peroxidación lipídica y se ha descrito su capacidad de modificar la síntesis de eicosanoides con respuestas anti-prostanoide y anti-inflamatoria.^{(94) (115) (116)}

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 general notable de la actividad enzimática de catalasa; es decir que el tratamiento con alguno de los diferentes extractos tiene un efecto positivo al favorecer la actividad de catalasa y por ende la descomposición de un radical como el peróxido de hidrogeno (Fig. 13).

Actividad de catalasa en plasma de ratones hembra de la cepa CD-1 tratados con NiO y extractos hidroalcohólicos de *Asclepias curassavica* L. (Día 1, 3, 5, 7 y 9).

Fig. 13.





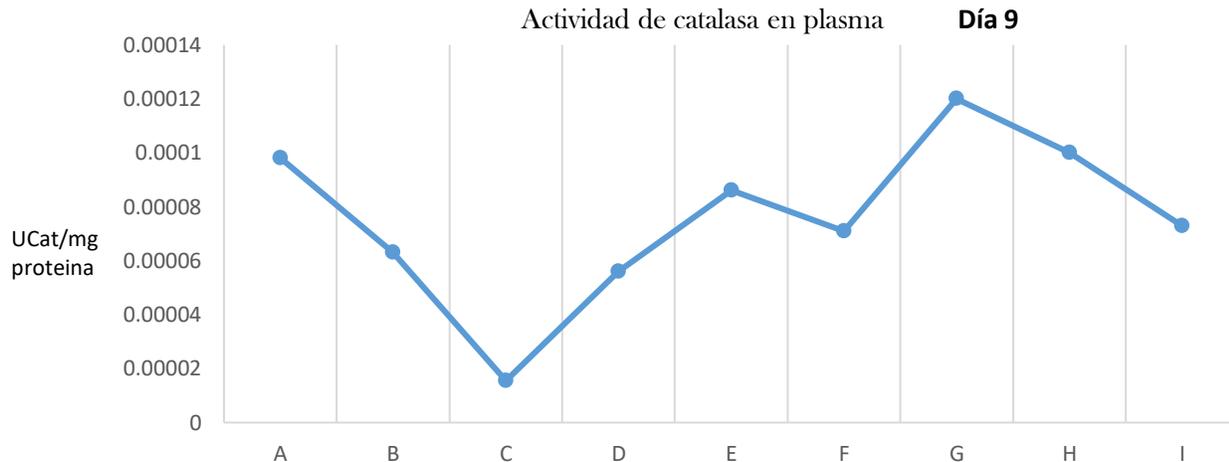


Fig. 13. Efecto de los extractos hidroalcohólicos de *A. curassavica* sobre la actividad de catalasa en plasma en ratones hembra (CD-I) inducidos a cáncer, en un periodo de 9 días. El trabajo experimental de cada grupo es el mismo que se presenta en la Tabla 8. Los valores del comportamiento grafico representan experimentos independientes realizados en el tiempo mencionado.

DISCUSIÓN

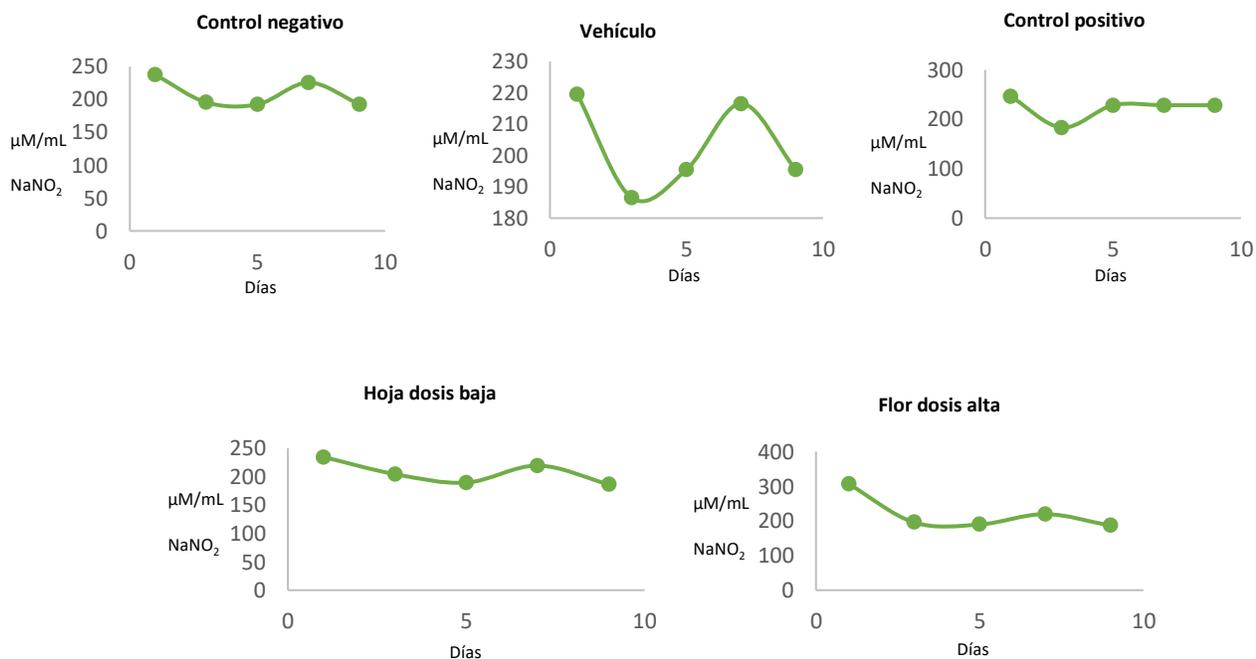
En cuanto a la investigación etnofarmacológica en la literatura se describe la utilización de *A. curassavica* para tratar padecimientos como los parásitos intestinales con una infusión de cualquiera de las partes de la planta, el látex fresco se usa para tratar malaria y vermífugo, también fue prescrito tradicionalmente como purgante, el extracto de agua caliente de tallo seco de la planta se utiliza para el asma, y se utiliza para tratar los dolores de la vesícula biliar, ⁽¹¹⁸⁾ estos tratamientos son algunos de los no mencionados durante la investigación pero que se encuentran reportados en nuestro país.

La mayoría de las pruebas de actividad biológica reportadas en la literatura científica se han realizado en extractos crudos sin examinar la naturaleza de los compuestos activos. Una de estas actividades farmacológicas es la actividad antioxidante lo cual incluso se ha probado de forma in vitro utilizando el método de tiocianato con diferentes extractos (cloroformo, acetato de etilo, metanol e hidroalcohol). El extracto hidroalcohólico exhibe la más alta actividad inhibidora de la peroxidación, sobre los otros extractos orgánicos; lo cual genera la necesidad de evaluar la actividad antioxidante de forma in vivo. ⁽¹¹⁸⁾

También podemos mencionar que la finalidad de registrar el uso etnofarmacológico de *A. curassavica* en la comunidad de Limón Chiquito Veracruz, un objetivo que no tiene una real relación con el objetivo general de este trabajo, pero forma parte de un estudio integral de las plantas que son utilizadas en esta región del Estado de Veracruz dando sustento y facilitando el entendimiento de estos usos y sus efectos en las pruebas farmacológicas.

La evaluación de nitritos de sodio presentes en el plasma sanguíneo de los ratones con los que se realizó este estudio, muestran que en el control negativo y el grupo del vehículo se mantienen estables a partir del tercer día en una concentración aproximada de 200 $\mu\text{M}/\text{mL}$ de NaNO_2 , para el grupo de control positivo la tendencia es un aumento conforme pasan los días y que inicia por arriba de los 200 $\mu\text{M}/\text{mL}$ de NaNO_2 concentración, manteniéndose en esta concentración ambos grupos; para los grupos con inducción con Oxido de níquel y tratamiento con un respectivo extracto de *Asclepias curassavica*, inician con una concentración alta de nitritos de sodio, para el tercer día han disminuido las concentraciones con respecto al inicio, pero al quinto día se presenta un efecto negativo ya que los niveles de concentración de nitritos aumentan de manera notable pero solo es repentino porque para el quinto día disminuyen logrando concentraciones bajas, incluso se presentan dos concentraciones más bajas que las presentadas por el grupo control negativo, resultando un efecto favorable para nuestra investigación. Los extractos que presentan niveles de concentración de nitritos más bajas son el de Hoja dosis baja y el de Tallo en su dosis alta. Fig. 14.

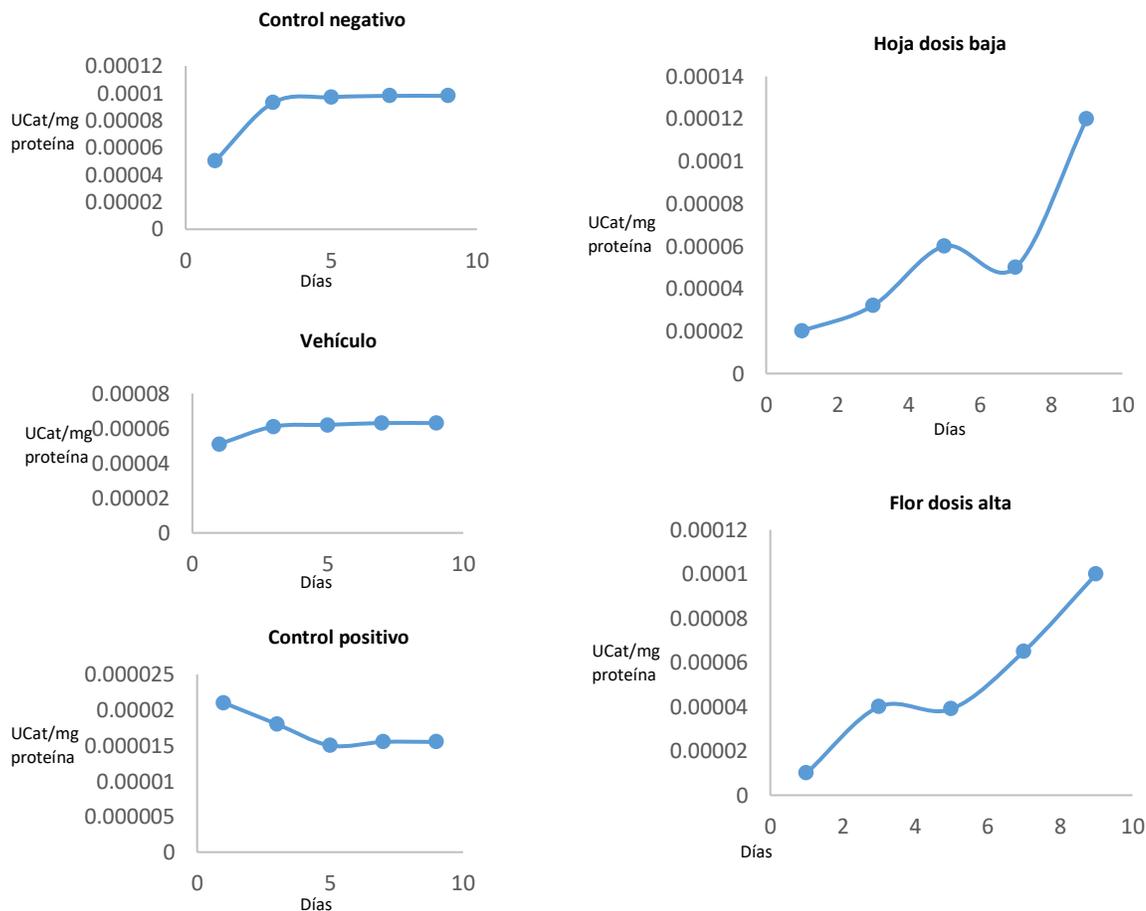
Fig. 14. Comportamiento de los grupos A, B, C, G y H respecto a la concentración de nitritos de sodio (NaNO_2) durante los nueve días de tratamiento.



En las gráficas que muestran los valores de la actividad de catalasa en plasma sanguíneo en los diferentes días del tratamiento, se observa que la actividad de catalasa es alta en el control negativo y el vehículo; en el control negativo se mantiene estable a partir del tercer día en una concentración cercana a las 0.00009 UCat/mg de proteína, mientras que el vehículo se mantiene estable aproximadamente en 0.00006 UCat/mg de proteína, estos valores manifiestan gran actividad enzimática.

Mientras que lo contrario ocurre en el control positivo en el cual la actividad disminuye hasta los 0.00002 UCat/mg de proteína e incluso continua disminuyendo conforme pasan los días; los grupos con inducción con oxido de níquel y posterior tratamiento con extractos, presentan niveles de actividad muy baja al inicio pero conforme pasan los días y reciben el tratamiento van recuperando la actividad y logran valores más altos que el grupo control negativo; los extractos que logran valores relevantes son nuevamente los de Hoja a dosis baja y el de Tallo en su dosis alta, así estos extractos también tienen resultados favorables para moléculas con bioactividad de interés en esta especie, lo que nos muestra el potencial de estos compuestos y la importancia de este tipo de investigaciones, siendo un preliminar de futuras investigaciones. Fig. 15.

Fig. 15. Comportamiento de los grupos A, B, C, G y H respecto a la actividad de catalasa en plasma durante los nueve días de tratamiento.



El estrés oxidativo persistente se ha relacionado con enfermedades cardiovasculares como el cáncer; la situación bioquímica que caracteriza al estrés oxidativo es el desequilibrio entre los radicales libres (principalmente las especies reactivas de oxígeno (ERO) y del nitrógeno (ERN)) y los mecanismos de defensa antioxidante. La administración de agentes que disminuyan o eviten estas condiciones son temas de interés en los tratamientos contra el cáncer, normalmente se emplean agentes citotóxicos, los cuales no son selectivos y afectan tanto a las células cancerígenas como a las células 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, la vincristina y vinblastina, así como el taxol y la camptotecina. 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. ^{(119) (120)}

La búsqueda de nuevos productos, de preferencia naturales que demuestren eficacia y efectos adversos en el manejo de esta enfermedad permanece de forma invariable. Las plantas se mantienen como la gran opción para obtener recursos innovadores y resolver esta problemática, así *Asclepias curassavica* L. es una planta que contiene metabolitos secundarios con los que recientemente se han realizado estudios que tienen efectos favorables ante patologías relacionadas a enfermedades cardiovasculares estos metabolitos de interés principalmente son los glicósidos cardiotónicos y los flavonoides.

Se sabe que los flavonoides inducen apoptosis al activar la caspasa 8 y Bax, inhiben la expresión del Bcl-2 y permiten la liberación de citocromo C. ⁽¹²¹⁾ También, poseen actividad anti-angiogénica, al suprimir la proliferación del factor de crecimiento vascular (VEGF). ⁽¹²²⁾ También flavonoides como la quercetina, tienen un potencial efecto quimiopreventivo frente a células cancerígenas de colon en humanos, ⁽¹²³⁾ glándula mamaria y ovario, ⁽¹²⁴⁾ en región gastrointestinal ⁽¹²⁵⁾ y en la leucemia. ^{(126) (127)} 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. ⁽¹²⁸⁾ Con lo que respecta a la prevención del cáncer de mama, puede deberse a su potente capacidad de inhibir la actividad de la aromatasa, evitando de esta forma la conversión de andrógenos en estrógenos. ⁽¹²⁹⁾

A la par, 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 quimioterapéuticos aceptables deben actuar con cierta especificidad que permita una ventana terapéutica, es decir, una situación en que la dosis empleada suponga más beneficio que los efectos secundarios tóxicos.

No obstante, el conocimiento actual de los glicósidos cardiotónicos destacando los presentes en *A. curassavica* ha llevado a ensayos en los que se demuestra la actividad citotóxica de estos compuestos esencialmente de la calotropina, calactina, asclepina, curassavicina y calotoxina en líneas celulares A549, K562, MCF-7, MDA-MB-231, HepG2, SiHa y Raji. ^{(75) (76) (77) (78) (79) (130) (131) (132) (133)}

CONCLUSIÓN

El amplio estudio de la literatura expone que *Asclepias curassavica* es una importante planta medicinal con diverso uso en la medicina tradicional y en la investigación farmacológica. Diversos estudios biológicos se han dedicado a esta especie, pero un pequeño número de ellos son útiles en la evaluación de sus usos tradicionales. La planta muestra muchos componentes naturales que son responsables de propiedades farmacológicas y medicinales. En futuros trabajos de investigación, la evaluación debe llevarse a cabo en *A. curassavica* con el fin de conocer y describir la preparación de la planta en sus aplicaciones prácticas en la medicina tradicional y las técnicas farmacológicas para el bienestar de la humanidad.

En desenlace se expone que, en condiciones experimentales el extracto hidroalcohólico (70:30) de *A. curassavica* ejerce un efecto antioxidante en un modelo murino de cáncer inducido con óxido de níquel (NiO). 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 debido a la resistencia farmacológica y los marcados efectos adversos de los agentes que actualmente se emplean para el tratamiento de una patología como el cáncer.

REFERENCIAS

- [1] Maldonado O., N. E. (Julio-diciembre de 2010). Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas.
- [2] OMS. (2012). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional. Recuperado el 7 de septiembre de 2015, de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>.
- [3] OMS. (2013). Cáncer. Recuperado el 7 de 08 de 2015, de Nota descriptiva No. 297: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>.
- [4] Mukherjee, A., Basu, S., Sarkar, N., & Ghosh, A. (2001). Advances in Cancer Therapy with Plant Based Natural Products. 8.
- [5] Cragg, D. J. (2007). Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. Vol. 70(Num. 3), p.p. 461-477.
- [6] Hirota K., M. M. (1999). Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus. A two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF-KB. (Núm. 274), 27891-27897.
- [7] Castillo R., H. P. (2003). Estrés oxidativo y daño renal. 8(Núm 1).
- [8] García Triana, B. E., Saldaña Bernabeu, A., & Saldaña García, L. (2013). El estrés oxidativo y los antioxidantes en la prevención del cáncer. Revista Habanera de Ciencias Médicas, vol. 12(núm. 2), pp. 187-196.
- [9] I.M., V. (1996). Peroxidación lipídica, antioxidantes de la dieta y enfermedad cardiovascular. (Núm. 16), 19-28.
- [10] J., H. B. (1990). Antioxidants of human extracellular fluids. 18(Núm. 280).
- [11] N., K. (1992). Mechanisms of action of biological antioxidants. 2(200), 48-54.
- [12] Pérez A., A. J. (2008). Estrés oxidativo y su implicación en distintas patologías. (Núm. 2), 45-64.
- [13] L., L. M. (2009). Estrés oxidativo y antioxidantes: como mantener el equilibrio. (Núm.17), 172-179.
- [14] Duarte, J. E. (2008). Óxido nítrico: metabolismo e implicaciones clínicas. Medicina interna de México, 24(Núm. 6), 397-406.
- [15] B., H. (1997). Antioxidants and human disease: A general introduction. 55(Núm. 1), 44-52.
- [16] Diaz, A. (2003). La estructura de las catalasas. Departamento de Bioquímica, Instituto de Fisiología Celular, 22(Núm. 2), 76-84.
- [17] Bast R., K. D. (2003). Cancer medicine (6 ed). London: American Cancer Society Hamilton.
- [18] S., J. (2003). Antioxidantes y RL en el tabaquismo. Solo-Mujeres.
- [19] SPPS. (2014). Cinco tipos de cáncer que más afectan a los mexicanos. Recuperado el 28 de 09 de 2015, de <http://www.spps.gob.mx/noticias/1445-5-tipos-cancer-mas-afectan-mexicanos.html>.
- [20] Zorrilla A., E. M. (2004). Papel de los radicales libres sobre el ADN: carcinogénesis y terapia antioxidante. 23(Núm. 1).
- [21] Aruoma OI, K. H. (1991). Oxygen free radicals and human diseases. 111.
- [22] MR., C. (1991). Free radicals in chemical carcinogenesis. 69(23).
- [23] Jaruga P, D. M. (1996). Repair of products of oxidative ADN base damage in human cells. 24.
- [24] Okamoto K, T. S. (1996). Overexpression of human mutT homologue gene messenger RNA in renal cell carcinoma: evidence of persistent oxidative stress in cancer. 65.
- [25] Shi X, J. H. (1996). Vanadium (IV)-mediated free radical generation and related 2'-deoxyguanosine hydroxylation and ADN damage. 106.
- [26] Reid TM, F. M. (1991). Endogenous mutations and cancer. 22.

- [27] Goncharova EI, N. A. (1996). Serum deprivation but not inhibition of growth per se, induces a hypermutable state in Chinese hamster G12 cells. 56.
- [28] Lo YYC, W. J. (1996). Reactive oxygen species mediated cytokine activation of c-Jun NH2-terminal kinases. 271.
- [29] Lafrenie R, S. S. (1992). Cancer cell interactions with injured oactivated endothelium. 11.
- [30] AS., S. (1992). Removing oxygen-derived free radicals delays hepatic metastases and prolongs survival in colonic cancer. A study in the rat. *Oncology*.
- [31] Guyton KZ, K. T. (1993). Oxidative mechanism in carcinogenesis. 49.
- [32] Hussain SP, A. F. (1994). Oxi-radicals induced mutagenesis of hotspot codons 248 and 249 of the human p53 gene. 9(2277).
- [33] Nakamura Y, G. T. (1998). Early Superoxide dismutase-sensitive event promotes neoplastic transformation in mouse epithelial JB6 cell. 9(203).
- [34] Dreher D, J. A. (1996). Role of oxygen free radicals in cancer development. (324).
- [35] Ahmed MI, F. S. (1999). Lipid peroxidation and antioxidant status in human cervical carcinoma. 15.
- [36] Lelkes PI, H. K. (1998). On the possible role of reactive oxygen species in angiogenesis. (454).
- [37] Maki A, B. I. (1992). Role of [Ca²⁺] in the induction of c-fos, c-jun, and c-myc mRNA in rat PTE after oxidative stress. 6.
- [38] Dreher D, J. A. (1995). Differential effects of superoxide, hydrogen peroxide and hidroxyl radical on intracellular calcium in human endothelial cells. 162.
- [39] TD., G. (1991). Malignant transformation by mutant rel proteins. 7.
- [40] Punnonen K, A. H. (1994). Anti-oxidant enzyme activities and oxidative stress in human breast cancer. 120.
- [41] Delgado, L. B. (2010). Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. *Investigación y Ciencia* (Núm. 50), 10-15.
- [42] Cetto, A. (2009). Ethnobotanical study of the medicinal plants from Tlanchinol, Hidalgo, México. (Núm. 122), 163–171.
- [43] J., G. (2009). How scientific is the science in ethnopharmacology? Historical perspectives and epistemological problems. (Núm. 122), 177–183.
- [44] E., T. L. (2006). *Fisiología vegetal*. Publicaciones Universitarias Jaume I.D.L.
- [45] Croteau, R. K. (2000). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists.
- [46] O., P. (2003). Agriculture Scientist. Obtenido de Doomar or Gular (*Ficus glomerata*) as medicinal herbs in Chattishgarh, India: botanical.com/site/column_poudhia/127_doomar.html.
- [47] G., A. (2008). *Alcaloides y compuestos nitrogenados (Manual)*. En U. d. Antioquia. Medellín: Facultad de Química Farmacéutica.
- [48] B., M. (1991). Alkaloids: Insolation and purification. *Journal on Chemical Education*. 68(700).
- [49] T., K. (1995). Alkaloid biosynthesis: The basis for metabolic engineering of medicinal plants. *Plant Cell*. 7(105).
- [50] B., G. (1975). *Flora medicinal de Colombia*. 2.
- [51] A., M. (2002). *Esteroides cardiotónicos (Manual)* Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmacéutica.
- [52] V., M. (2000). Los flavonides como promisoeres agentes preventivos y terapeuticos. 19(4).
- [53] Castro V., R. P. (2013.). Study of sesquiterpene lactones from *Milleria quinque* flora on their anti-inflammatory activity using the transcription factor NF-Kappa B as molecular target. (53).
- [54] Ávalos A., P. E. (2009). Metabolismo secundario de plantas, *Reduca (Biología)*. 2(3).

- [55] Botanical online. (2016). Recuperado el 30 de agosto de 2016, de <http://www.botanical-online.com/medicinaestaninos.htm>.
- [56] Hostettman K., M. A. (1995). Chemistry and Pharmacology of Natural Products. Saponins. New York.: Cambridge University Press.
- [57] M., M. (2001.). Saponinas Esteroides. Manual.
- [58] Cantú G., P. L. (2012). Naftoquinonas: de simples pigmentos a moléculas terapéuticas. 14(2).
- [59] G., A. (2010). Compuestos derivados del ácido shimico (Manual).
- [60] Lacy A., O. R. (2004). Studies on coumarins -related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer. 10(30).
- [61] Dupuy L., M. R. (2008). Lactonas sesquiterpénicas de las plantas *Viguiera sylvatica* y *Decachaeta thieleana* (Asteraceae) modulan la producción de óxido nítrico y la fagocitosis de macrófagos RAW. 56(3).
- [62] Humar M., G. P. (2003). Effect of sesquiterpene lactones on the expression of the activation marker CD69 and of IL-2 in T-lymphocytes in whole blood. (65).
- [63] Coll A., M. M. (2007). Lactonas Sesquiterpénicas de *Smallanthus siegesbeckius* (Heliantheae, Asteraceae). 6(5).
- [64] L., J. J. (2013). "Asclepiadaceae". Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. (Núm. 37).
- [65] Juárez J, A. C. (2007). "La familia Apocynaceae sensu lato en México: diversidad y distribución". 78(Núm. 2), 459-482.
- [66] A., D. D. (2000). Poisoned plusiines: toxicity of milkweed latex and cardenolides to some generalist caterpillars. 10(Núm. 11).
- [67] A. Mercedes F.B., V. J. (2008). Usos de las especies del genero *Asclepias* L. (Apocynaceae, Asclepiadoideae). Polibotanica (Núm. 25), p.p. 155-171.
- [68] A., C. (1981). An Integrated System of Classification of Flowering Plants. New York: Columbia University Press.
- [69] UNAM. (2015). Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. Recuperado el 22 de 10 de 2015, de http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Quiebra_muelas&id=7442
- [70] Endes, M. E. (2000). A revised Classification of the Apocynaceae. 1(Núm. 66), 12-56.
- [71] Newman, R. Y. (s.f.) Cardiac Glycosides as Novel Cancer Therapeutic Agents. (Núm. 8), 36-49.
- [72] S., M. (1990). Chemical defense in chewing and sucking insect herbivores: plant-derived cardenolides in the monarch butterfly and oleander aphid. Chemoecology, 1, 12-21.
- [73] James N., C. J. (1982). Cardenolides in the latex and leaves of seven *Asclepias* species and *Calotropis procera*. 21(9).
- [74] J., H. M. (1998). Identification and distribution of oviposition stimulants for monarch butterflies in hosts and nonhosts. 24, 891-904.
- [75] Shih-Chung Wang, M. (2009). Cytotoxicity of calotropina is through caspase activation and downregulation of anti-apoptotic proteins in K562 cells. Cell Biology International, Vol. 33(Núm. 12), p.p. 1230-1236.
- [76] Kupchan S.M., K. J. (1964). Calotropina cytotoxic principle isolated from *Asclepias curassavica* L. Science, Vol. 146(Núm. 3652), p.p. 1685-1686.
- [77] Michel C.R., C. F. (2005). Cytotoxic principles from the formosan milkweed, *Asclepias curassavica*. 68(10), p.p. 1494-1499.
- [78] Jun-Zhu Li, C.-X. C.-J.-Y. (2009). Cytotoxicity of cardenolide and cardenolide glycosides from *Asclepias curassavica*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Vol. 19(Núm. 7), p.p. 1956-1959.
- [79] G. Mena R., E. C. (2009). In vitro cytotoxic activity of nine plants used in Mayan traditional medicine. Journal of Ethnopharmacology (Núm. 462), p.p. 465-121.
- [80] Hart, C. C. (2010). The emerging harm of antioxidants in carcinogenesis. Future Oncol. 8(Núm. 5), 535-548.

- [81] Villaseñor R. J. (1998). Catálogo de Malezas de México. México, D.F.: UNAM, Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario y Fondo de la Cultura Económica.
- [82] Rzedoski, G. d. (2001). Flora Fanerogámica del Vale de México (2ª ed.). México: Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad.
- [83] Gonaza, M. (2000). Fundamentación química de las reacciones de coloración y precipitación en la identificación de metabólitos secundarios de plantas medicinales. Medellín: Facultad de Química Farmacéutica.
- [84] Trujillo-Perú, y. V. (1999). Farmacognosia general. España: Ed. Síntesis.
- [85] M., M. (2001). Farmacognosia y productos naturales. Cuba: Félix Varela.
- [86] C., A. (2001). Introducción a la química farmacéutica (2ª ed.). España: McGraw-Hill Interamericana.
- [87] Koklinski, C. (2003). Farmacognosia. Barcelona: Ediciones Omega.
- [88] Ortíz, A. C. (1995). Carcinogénesis por óxido de níquel en 2 líneas de ratones consanguíneas.
- [89] H., Z. J. (1999). Biostatistical analysis (5 ed.). New Jersey, USA.: Pearson Education.
- [90] L., F. A. (2008). Usos de las especies del género *Asclepias* L. (Apocynaceae, Asclepiadoideae), Información del Herbario Nacional de México, MEXU. 25.
- [91] N., J. V. (1985). Chemical constituents and energy content of two milkweeds, *Asclepias speciosa* and *A. curassavica*. 39(1).
- [92] Aguilar A., C. R. (1994). Herbario medicinal del Instituto Nacional del Seguro Social.
- [93] Bruneton, J. (2001). Farmacognosia: Fitoquímica, plantas medicinales. España: Acribia.
- [94] Pace-Asciak C., H. S. (1995). The red wine phenolics transresveratrol and quercetin block human platelet aggregation in eicosanoid synthesis: implication for protection against coronary heart disease.
- [95] B., H. (1983). Flavonoids. A class of natural products of high pharmacological potency. (32).
- [96] Kim HP, S. K. (2004). Antiinflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. (96).
- [97] Sakata K, H. Y. (2003). Inhibition of inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase by flavonoid hesperidin in mouse macrophage cell line. (199).
- [98] Stahl W., Ale-Agha N. y Polidori M.C. (2002). Non-antioxidant properties of carotenoids. (383).
- [99] JL., H. A. (1978). Comparative mutagenesis of plants flavonoids in microbial system. (58).
- [100] Birt DF, H. S. (2001). Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. (90).
- [101] L., T. (2005). Wealth of the rainforest, pharmacy to the world. (Raintree Nutrition, Inc. Austin, TX.) Recuperado el 12 de septiembre de 2016, de <http://www.rain-tree.com/plistbot.htm>
- [102] N., T. W. (2008). Steroidal glycosides from the roots of *Asclepias curassavica*. 56(3).
- [103] Abe F, M. e. (1992). Cardenolide glycosides from the seeds of *Asclepias curassavica*. Vol. 40(Num. 11), p.p. 2917- 2920.
- [104] Tsutoma W., K. S. (2008). New cardenolides and acetylated lignan glycosides from aerial parts of *Asclepias curassavica*. 56(8).
- [105] Fumiko A., Y. M. (1992). Cardenolide Glycosides from the Seeds of *Asclepias curassavica*. 40(11).
- [106] Mukherjee, A. B. (2001). Advances in Cancer therapy with plant based Natural Products. 8, 1467-1486.
- [107] Prassas, I. D. (2008). Novel Therapeutic Applications of Cardiac Glycosides. 7(11).
- [108] Catherine C., C. W. (2002). Antibacterial activity of some Peruvian medicinal plants from the Callejon de Huaylas. 79(133).

- [109] Navarro G., G. A. (2003). Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. (87).
- [110] S., D. V. (2011). Antifungal activity of traditional medicinal plants from Tamil Nadu, India. (204).
- [111] Vischnewski, W. C. (1999). 15Hydroxyeremantholide and derivatives from *Eremanthus arboreus*. (50).
- [112] Willuhn, G. P. (1984). Helenalinund 11a13-dihydrohelenalinester aus Blüten von *Arnica montana*. (50).
- [113] García-Piñeres, A. V. (2001). Cysteine 38 in p65/NF-kB plays a crucial role in DNA binding inhibition by sesquiterpene lactones. 276 (97).
- [114] Humar, M. A. (2003). Effect of sesquiterpene lactones on the expression of the activation marker CD69 and of IL-2 in T lymphocytes in whole blood. (65).
- [115] Yang K, L. S. (2000). Chemoprevention studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethane-treated mouse colon. (21).
- [116] Geleijnse JM, L. L. (2002). Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam study. (75).
- [117] Albert A., S. I. (2010). Chemopreventive potential of β Sitosterol in experimental colon cancer model - an In vitro and In vivo study. 10(24).
- [118] S. Raja, et al. (2014). *Asclepias Curassavica*: A Review of Ethnomedical, Phytochemical and Pharmacological Information. Indo American Journal of Pharm Research. 4 (04).
- [119] Hileman EO, L. J. (2004). Intrinsic oxidative stress in cancer cells: a biochemical basis for therapeutic selectivity. (53).
- [120] Sharma A, T. M. (2009). Study of antioxidant levels in patients with multiple myeloma. (50).
- [121] Stachowicz-Stencel T., S. (2011). Multiple primary cranio-spinal tumours in a 13-year-old female with neurofibromatosis type 2 management strategy. (27).
- [122] Jang HS., K. S. (2005). Flavonoids purified from *Rhus verniciflua* Stokes actively inhibit cell growth and induce apoptosis in human osteosarcoma cells.
- [123] Deog K, L. L. (2005). Chemical structure of flavonols in relation to modulation of angiogenesis and immune-endothelial cell adhesion. (17).
- [124] Ranelletti FO, R. R. (1992). Growth-inhibitory effect of quercetin and presence of type-II estrogen binding sites in human colon-cancer cell lines and primary colorectal tumors. (50).
- [125] Scambia G, R. F. (1990). Inhibitory effect of quercetin on OVCA 433 cells and presence of type II estrogen binding sites in primary ovarian tumors and cultured cell. (62).
- [126] Yoshida M, S. T. (1990). The effects of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells. (260).
- [127] Yoshida M, Y. M. (1992). Quercetin arrests human leukemic T-cells in late G1 phase of the cell cycle. (52).
- [128] Ren W, Q. Z. (2001). Tartary buckwheat flavonoid activates caspase 3 and induces HL-60 cell apoptosis. (23).
- [129] Myhrstad MC, C. H. (2002). Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the gamma-glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. (32).
- [130] Pouget C, F. C. (2002). Synthesis and aromatase inhibitory activity of flavanones. (19).
- [131] Zhang Y.H., W. Y. (2000). The use of ^{13}C NMR in the structure analysis of C21 steroidal glycosides in the Asclepiadaceae. 5(12).
- [132] Jun-Zhu Li, H.-Y. L.-J.-J.-X. (2008). Six new C21 steroidal glycosides from *Asclepias curassavica*. Steroids, Vol. 73(6).
- [133] James N.S., C. J. (1982). Cardenolides in the latex and leaves of seven *Asclepias* species and *Calotropis procera*. Phytochemistry. 21(9).