



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

**Actividad antioxidante de *Hyptis verticillata* Jacq. en
un modelo de cáncer de la cepa CD-1**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

PRESENTA:

PACHECO HERNÁNDEZ ANGEL FRANCISCO

DIRECTORA: M. EN C. CATALINA MACHUCA RODRIGUEZ

ASESOR: M. EN C. ERNESTO MENDOZA VALLEJO

ASESORA: MTRA. MARIA JUDITH VILLAVICENCIO MACIAS

SINODAL: BIOL. AIDA ZAPATA CRUZ

SINODAL: DRA. YOLANDA CORDOVA GALAVIZ



CIUDAD DE MÉXICO

AGOSTO 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Terapia Molecular (L-7, P.1.) de la unidad multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ) de la FES-Zaragoza, UNAM; bajo la dirección de la M. en C. Catalina Machuca Rodríguez.

Dedicatorias

A mi familia.

A mi madre Reina, mi mayor motivación e inspiración. Gracias por todo.

A mi padre Ricardo, por todo el amor y apoyo brindado. Gracias.

A mi hermano Ricardo, por todo el amor y apoyo brindado. Gracias.

Los amo.

Agradecimientos

A Gabriela por tu presencia y apoyo durante muchos años. Gracias.

A la Mtra. Catalina Machuca por su apoyo, y enseñanza durante este tiempo. Se lo agradezco.

A los sinodales por su atención y enseñanza en el desarrollo de esta tesis. Gracias.

En general, a mis amistades por la compañía, la ayuda experimental, y el apoyo. Los aprecio mucho.

Índice

Índice de figuras e imágenes	7
1. Resumen	8
2. Marco teórico	9
2.1 Cáncer	9
2.2 Cáncer de mama	10
2.3 Ratones CD-1 como modelo de experimentación <i>in vivo</i>	10
2.4 Estrés Oxidativo y especies reactivas de oxígeno en cáncer	11
2.4.1 Especies reactivas de nitrógeno en cáncer	12
2.4.2 Mecanismos de detoxificación de especies reactivas	13
2.5 Metabolitos secundarios	13
2.5.1 Compuestos fenólicos	14
2.5.2 Compuestos nitrógeno / azufre	15
2.5.3 Terpenos	15
2.6 <i>Hyptis verticillata</i> Jacq.	16
2.6.1 El papel de <i>Hyptis verticillata</i> Jacq. en cáncer	17
3. Justificación	19
4. Hipótesis	20
5. Objetivos	20
6. Material y métodos	21
6.1 Lugar de recolecta de <i>Hyptis verticillata</i> Jacq.	21
6.2 Registro etnobotánico	21
6.3 Procesamiento del material de recolecta	21
6.4 Obtención de extractos de <i>Hyptis verticillata</i> Jacq.	21
6.4.1 Extractos Acuosaos	21
6.4.2 Extractos hidroalcohólicos	22
6.4.3 Extractos secos	22
6.5 Rendimiento de extractos secos	23
6.6 Determinación de azúcares totales	23
6.7 Tamizaje fitoquímico preliminar	23
6.7.1 Compuestos fenólicos	24
6.7.2 Compuestos de Nitrógeno – Azufre	25
6.7.3 Terpenoides	25

6.8 Cuantificación de metabolitos secundarios.....	26
6.8.1 Compuestos fenólicos.....	27
6.8.2 Compuestos de nitrógeno-azufre	27
6.8.3 Terpenos.....	28
6.9 Organización y manejo de grupos de ratones CD-1	29
6.10 Inducción de cáncer de mama a ratones CD-1.....	30
6.11 Tratamiento con extractos de <i>Hyptis verticillata</i> Jacq. a ratones CD-1.....	30
6.12 Obtención de plasma sanguíneo de ratones CD-1	30
6.13 Obtención de homogenado de hígado de ratones CD-1	30
6.14 Análisis de marcadores de estrés oxidativo	31
6.14.1 Cuantificación de nitritos por el método de Griess – Saltzman.....	31
6.14.2 Actividad enzimática de catalasa por el método de Chance y Maehly	32
6.14.3 Cuantificación de proteína total por el método de Biuret	32
6.14.4 Cuantificación de peroxidación lipídica	33
6.15 Análisis estadístico	33
7. Resultados.....	34
7.1 Datos etnobotánicos.....	34
7.2 Rendimiento de extractos secos de <i>Hyptis verticillata</i> Jacq.	36
7.3 Cuantificación de azúcares totales	36
7.4 Tamizaje fitoquímico preliminar	37
7.5 Cuantificación de metabolitos secundarios.....	39
7.6 Medición de la concentración de nitritos en plasma sanguíneo y homogenado de hígado de ratones CD-1	39
7.7 Actividad de catalasa en plasma sanguíneo y homogenado de hígado de ratones CD-1.....	41
7.8 Cuantificación de peroxidación lipídica en plasma sanguíneo y homogenado de hígado de ratones CD-1	43
8. Discusión de resultados.....	46
9. Conclusiones	51
10. Referencias.....	52

Índice de figuras e imágenes

Figura 1. Morfología de <i>Hyptis verticillata</i> Jacq.	17
Tabla 1. Estudios farmacológicos de <i>Hyptis verticillata</i> Jacq.	18
Tabla 2. Preparación de extractos hidroalcohólicos de <i>Hyptis verticillata</i> Jacq.	22
Tabla 3. Características y distribución de los grupos experimentales de ratones hembra CD-1.	29
Figura 2. Curva de calibración de cuantificación de nitritos por el método de Griess – Saltzman.	31
Figura 3. Curva de calibración de cuantificación de proteína por el método de Biuret.	32
Figura 4. Porcentaje de los principales usos de <i>Hyptis verticillata</i> Jacq. en la localidad de Limón Chiquito, Veracruz.	34
Tabla 3. Características de administración en el uso de <i>Hyptis verticillata</i> Jacq. en diversas patologías en la localidad de Limón Chiquito, Veracruz.	35
Tabla 4. Porcentajes de rendimiento de los extractos secos de <i>Hyptis verticillata</i> Jacq. ..	36
Figura 5. Concentración de azúcares totales de los extractos de <i>Hyptis verticillata</i> Jacq.	36
Tabla 5. Determinación de metabolitos secundarios en extractos acuosos de <i>Hyptis verticillata</i> Jacq.	37
Tabla 6. Determinación de metabolitos secundarios en extractos hidroalcohólicos de <i>Hyptis verticillata</i> Jacq.	38
Tabla 7. Concentraciones de metabolitos secundarios en los extractos de <i>Hyptis verticillata</i> Jacq.	39
Figura 6. Efecto de los extractos de <i>Hyptis verticillata</i> Jacq. sobre la concentración de nitritos en plasma sanguíneo de ratones hembra de la cepa CD-1.	40
Figura 7. Efecto de los extractos de <i>Hyptis verticillata</i> Jacq. sobre la concentración de nitritos en homogenado de hígado de ratones hembra de la cepa CD-1.	41
Figura 8. Efecto de los extractos de <i>Hyptis verticillata</i> Jacq. sobre la actividad enzimática de catalasa en plasma sanguíneo de ratones hembra de la cepa CD-1.	42
Figura 9. Efecto de los extractos de <i>Hyptis verticillata</i> Jacq. sobre la actividad enzimática de catalasa en homogenado de hígado de ratones hembra de la cepa CD-1.	43
Figura 10. Efecto de los extractos de <i>Hyptis verticillata</i> Jacq. sobre la concentración de MDA en plasma sanguíneo de ratones hembra de la cepa CD-1.	44
Figura 11. Efecto de los extractos de <i>Hyptis verticillata</i> Jacq. sobre la concentración de MDA en homogenado de hígado de ratones hembra de la cepa CD-1.	45

1. Resumen

En la actualidad, el cáncer de mama representa un grave problema de salud pública, siendo la principal causa de mortalidad entre las tumores malignas que padece la población femenina a nivel mundial. En 2022 fallecieron 670,000 personas por cáncer de mama en todo el mundo. En las últimas décadas, el estrés oxidativo ha cobrado gran importancia en el proceso de carcinogénesis, dada la capacidad de las especies reactivas de reaccionar con distintas biomoléculas que generan daños al ADN. Se han descrito diversas moléculas capaces de modular esta condición, tal como los metabolitos secundarios presentes en plantas. En este sentido el uso de terapias con plantas medicinales podría regular el estrés oxidativo implicado en el origen, promoción y progresión del cáncer. Las especies del género *Hyptis*, son consideradas plantas medicinales con una fuente importante de componentes bioactivos. Se ha determinado que algunos metabolitos secundarios presentes en *Hyptis verticillata* Jacq. presentan actividades anticancerígenas en modelos de estudio. Atendiendo estas consideraciones, la presente tesis evaluó el potencial antioxidante de *Hyptis verticillata* Jacq. sobre el estrés oxidativo en un modelo murino de cáncer de mama.

Se elaboró el registro de datos etnobotánicos y la colecta de *Hyptis verticillata* Jacq. en la localidad de Limón Chiquito, Veracruz, México. Se cuantificaron por espectrofotometría de luz UV-Visible los metabolitos secundarios identificados en extractos acuosos e hidroalcohólicos de *H. verticillata* Jacq. Se indujo cáncer de mama a grupos específicos de ratones hembras CD-1 a través de la administración de 7, 12-dimetilbenzantraceno (DMBA). Finalmente, se determinó la actividad de los extractos de *Hyptis verticillata* Jacq. sobre marcadores de estrés oxidativo (nitritos, lipoperoxidación y enzima catalasa) en hígado y sangre periférica de ratón.

Se registró el uso medicinal de *Hyptis verticillata* Jacq. en cáncer de mama en la comunidad. Se identificaron 7 grupos de metabolitos secundarios presentes en *Hyptis verticillata* Jacq.: alcaloides, esteroides y polifenoles, determinados en la literatura, y cumarinas, glicósidos cardiotónicos, saponinas y taninos, grupos no determinados dentro del perfil fitoquímico, en extractos acuosos e hidroalcohólicos de hoja, tallo, flor, raíz y planta completa. Por último, el tratamiento de planta completa hidroalcohólico (PCH) de *Hyptis verticillata* Jacq. sugiere una respuesta prooxidante al aumentar los valores de nitritos, inhibir la actividad de catalasa y aumentar las cantidades de malondialdehído (MDA) presentes en las muestras de plasma sanguíneo de ratones con inducción de cáncer de mama. De tal manera, *Hyptis verticillata* Jacq. puede considerarse una especie con capacidad de modular el estrés oxidativo presente en ratones hembras CD-1 con inducción cancerígena mamaria.

2. Marco teórico

2.1 Cáncer

El cáncer es una de las principales enfermedades que aqueja la población mundial. Según datos del Observatorio Mundial del Cáncer (CIIC), 10 tipos de cáncer representan alrededor de dos tercios de las muertes en 2022 en 185 países evaluados (OMS, 2024).

Se considera un conjunto de enfermedades establecidas principalmente por un crecimiento celular incontrolado, llegando a generar un tumor, y una posible diseminación de las células cancerosas a otras partes del cuerpo a través de los sistemas circulatorio y linfático (Cooper, 2000). Su origen es de carácter multifactorial a partir de cualquier tipo celular. Por acción de diversos estímulos, las células pueden sufrir cambios genéticos específicos que les permiten escapar a los mecanismos de regulación celular relacionados principalmente con la división celular y muerte celular programada (Fernald & Kurokawa, 2013). En consecuencia, las células hijas pueden llegar a conservar estas características y acumular mutaciones subsecuentes que generan distintas subpoblaciones celulares malignas con diferentes capacidades, lo que puede aumentar el riesgo de una mala prognosis en los pacientes (Sánchez, 2013).

Las mutaciones adquiridas en cáncer son consecuencia de múltiples factores definidas generalmente por una predisposición genética, estilo de vida o factores ambientales. Existen factores de carácter endógeno integrados comúnmente por: genes, hormonas, estrés oxidativo, etc., asimismo, hay factores exógenos generalmente conformados por: agentes químicos, agentes infecciosos, radiación, entre otros (Lutz & Fekete, 1996).

Se han determinado una serie de características presentes en la mayoría de los procesos carcinogénicos como lo son: una proliferación celular incontrolada, evasión a la diferenciación celular, resistencia a la muerte celular, inmortalidad replicativa, angiogénesis, y metástasis (Hanahan & Weinberg, 2011). Las células cancerosas suelen estar bloqueadas en una etapa temprana de la diferenciación y así evadir las restricciones de división celular presentes en las células ya diferenciadas (De la Garza & Juárez, 2013).

Dentro de los tipos de cáncer más frecuentes en la población se encuentran el cáncer de pulmón, de próstata, y de mama, siendo este último el más frecuente en la población mundial femenina (Mattiuzzi & Lippi, 2019). Por lo que resulta un punto importante de investigación.

2.2 Cáncer de mama

El cáncer de mama se define como un tumor maligno que se origina en las células del seno. Se considera una enfermedad de alta complejidad en las sociedades actuales ya que representa la neoplasia maligna más frecuente y la principal causa de muerte por cáncer en las mujeres a nivel mundial (OMS, 2024). En México, es la tumoración maligna con mayor tasa de defunción en mujeres mayores de 30 años, según datos recopilados del año 2022 (INEGI, 2024). Su incidencia no es dependiente del sexo. Los mecanismos precisos por lo que el cáncer de mama se desarrolla no se han establecido concretamente, sin embargo, se han descrito múltiples factores que contribuyen a la iniciación o desarrollo de este tipo de neoplasias (Lester, 2007).

Las neoplasias malignas de mama se clasifican en distintos subtipos que proporcionan un mejor estudio y tratamiento. Esta clasificación se basa en caracteres moleculares como la expresión de receptores hormonales y factores de crecimiento, se determina la activación de receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR), y del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). De esta manera, se han establecido cuatro subtipos: Luminal A (ER+/PR+/HER2-/bajo Ki-67); Luminal B (ER+/PR+/HER2-/+/alto Ki-67); Sobreexpresión de HER2 (ER-/PR-/HER2+) y cáncer de mama triple negativo (TNBC) (ER-/PR-/HER2-) (Al-thoubaity, 2020).

Los tratamientos difieren acorde a los subtipos moleculares. Entre los tratamientos empleados, se puede realizar la resección quirúrgica de la mama, terapia hormonal, quimioterapia, o radioterapia (Moo et al., 2018). A pesar de la implementación de nuevas estrategias terapéuticas, un alto porcentaje de pacientes con cáncer de mama adquieren resistencia a la terapia antitumoral generando recurrencia tumoral, y metástasis que compromete la vida del paciente (Gonzalez-Angulo et al., 2007). El cáncer de mama en etapa metastásica se considera incurable con las terapias disponibles actuales (Harbeck et al., 2019).

2.3 Ratones CD-1 como modelo de experimentación *in vivo*

Los sistemas de modelo *in vivo* como ratones posibilitan la obtención de características relevantes de la biología del cáncer. Los ratones son ampliamente utilizados en estudios de cáncer de mama ya que comparten muchas similitudes fisiológicas con los humanos, además, se emplean en las investigaciones por su tamaño, manejo, tiempo de vida, y su tasa de reproducción rápida. Asimismo, es posible el acceso a las secuencias genómicas para una posible caracterización (Manning et al., 2016).

Los ratones de la cepa CD-1 son provenientes de un grupo original de ratones suizos, formado por ratones albinos machos y hembras derivados de una cepa no endogámica.

Los modelos de inducción de cáncer de mama en sistemas *in vivo* incluyen el uso de compuestos químicos, animales transgénicos, radiaciones ionizantes y trasplantes de células tumorales. Los compuestos químicos tumorales se emplean dada su facilidad de

uso y control, sin embargo, suelen ser altamente tóxicos para los humanos, y pueden llegar a generar tumores en otros tejidos (Khazaei et al., 2018).

Se ha documentado el uso de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) para el desarrollo de cáncer de mamá en modelos experimentales como ratones y ratas. Dentro de los PAH, el 7, 12-dimetilbenzantraceno (DMBA) es uno de los principales agentes que induce cáncer de mama dada su interacción con el ADN. Es un compuesto altamente lipofílico que requiere la activación metabólica para su carcinogenicidad (Clarke, 1997). En las células mamarias, el DMBA es metabolizado a metabolitos polares, con la formación de epóxidos con una gran capacidad de dañar el ADN, adicionando residuos de adenina y guanina (Arroyo et al., 2010). El DMBA puede inducir tumoraciones de tipo carcinoma ductal o papilar (Russo et al., 1990).

2.4 Estrés Oxidativo y especies reactivas de oxígeno en cáncer

El estrés oxidativo es una condición que suele estar presente en distintos tipos de cáncer, incluido el de mama (Tas et al., 2005). Se genera por el desequilibrio entre especies reactivas y moléculas antioxidantes, resultando en un exceso de especies reactivas capaces de alterar la señalización y el control redox, y generar así un daño molecular (Sies & Jones, 2007).

El incremento de especies reactivas es perjudicial en células normales, bajo un estrés ambiental sostenido, las especies reactivas de oxígeno (ROS) incrementan, generando un daño a las funciones y estructura de la célula llegando a inducir mutaciones somáticas y transformación neoplásica (Wiseman & Halliwell, 1996). En células malignas puede contribuir a un crecimiento acelerado y a una supervivencia que se correlaciona con un fenotipo agresivo y resistente a la terapia (Devi et al., 2014). Además, concentraciones elevadas de especies reactivas pueden llegar a inducir apoptosis en las células malignas, mientras que concentraciones bajas podrían favorecer la progresión cancerígena al inducir alteraciones epigenéticas y senescencia (Gorrini et al., 2013). De tal manera, las especies reactivas tienen un papel importante en diversos eventos tales como la proliferación celular, diferenciación y migración (Ralph et al., 2010).

Las especies reactivas comúnmente se dividen en dos grupos dada su naturaleza, las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las especies reactivas de nitrógeno (RNS). Brevemente, las ROS se integran por moléculas derivadas del oxígeno que incluyen radicales libres y especies no radicales. Radicales como el superóxido (O_2^-), hidroxilo ($OH^\bullet$) y peroxilo ($ROO^\bullet$) son moléculas altamente electrofílicas, de vida corta, y con un electrón desapareado en su capa exterior (Jones, 2008), lo que les confiere inestabilidad molecular y un considerable grado de reactividad con lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Valko et al., 2004). Las moléculas reactivas de oxígeno no radicales se integran por el ácido hipocloroso ($HOCl$), el ozono (O_3), el oxígeno singlete (O_2) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Jones, 2008). El H_2O_2 es una molécula con una elevada actividad oxidante en presencia de metales de transición, su prolongada vida media y alta

capacidad de difusión lipídica la convierten en un mediador esencial en la señalización celular (Vaquero & Molero, 2005).

Las ROS son productos principalmente de procedencia endógena resultado de un metabolismo celular normal y con un papel importante en la estimulación de vías de señalización, en respuesta a cambios de condiciones ambientales intracelulares y extracelulares (Khandrika et al., 2009). Las mitocondrias generan la mayor cantidad de ROS a través de la cadena de transporte de electrones (Reuter et al., 2010). También, las especies reactivas de oxígeno se pueden generar ante estímulos externos tales como irradiación por luz ultravioleta, rayos X y rayos gamma (Valko et al., 2004).

El estrés oxidativo se determina comúnmente mediante los productos de reacción de radicales libres en tejidos y fluidos corporales. Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en las membranas celulares son objetivos de las ROS que los oxidan durante el proceso de peroxidación lipídica (LPO). Los productos resultantes de la LPO, como el malondialdehído (MDA), el 4 - hidroxinonenal (4-HNE) y la acroleína se han determinado como marcadores de estrés oxidativo (Gaweł et al., 2004). Por su parte, los radicales hidroxilos reaccionan con el ADN provocando cambios en la desoxirribosa. Los metabolitos resultantes de este daño oxidativo al ADN son el timinaglicol y la 8-hidroxidesoxiguanosina (8-OHdG) (Klaunig et al., 1998). Además, enzimas como GSH o catalasa, moléculas antioxidantes asociadas a ROS, y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) también se han establecido como marcadores de estrés oxidativo (Carmo et al., 2022).

2.4.1 Especies reactivas de nitrógeno en cáncer

Las especies reactivas de nitrógeno (RNS) son moléculas de nitrógeno asociadas con oxígeno (Alhasawi et al., 2019). En los sistemas biológicos, las RNS se forman a partir del óxido nítrico (NO) que interactúa con ROS, como en la formación de peroxinitritos a partir de la reacción de NO y superóxido (Patel et al., 1999).

La enzima óxido nítrico sintetasa produce NO a partir de L-Arginina, utilizando NADPH y oxígeno como sustratos. El NO puede producirse también por macrófagos inducidos por estímulos inmunológicos o inflamatorios (Hernández et al., 2006). Su vida media y su acción biológica son muy cortas, ya que es rápidamente oxidado a nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-). Es una molécula con una elevada capacidad de difusión a través de la membrana por lo que puede causar daño en los tejidos adyacentes (Lundberg et al., 2008).

El exceso de especies reactivas de nitrógeno (RNS) se denomina estrés nitrosativo, el cual puede causar reacciones de nitrosilación que pueden alterar la estructura de las proteínas y afectar su función (Ridnour et al., 2004). La cantidad de NO producida está estrechamente relacionada a algunos eventos biológicos como cáncer (Xu et al., 2002).

2.4.2 Mecanismos de detoxificación de especies reactivas

Las especies reactivas se regulan comúnmente por la actividad de enzimas como: la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa, y catalasa (Patlolla et al., 2009).

De hecho, los radicales superóxidos formados en ambos lados de la membrana mitocondrial interna son detoxificados a H_2O_2 con la ayuda principal de la enzima superóxido dismutasa (SOD), y posteriormente el H_2O_2 a agua por medio de la enzima catalasa (Cadenas & Davies, 2000). Por su parte, la enzima glutatión peroxidasa (GPx) es capaz de reducir hidroperóxidos usando glutatión (GSH) como sustrato. El glutatión también capta O_2 y OH^- (Pérez & Pérez, 2000).

Además de las enzimas, existen otras moléculas que actúan en los mecanismos de detoxificación de las especies reactivas, como péptidos, vitaminas A, C, y E (Brieger et al., 2012), y algunas moléculas antioxidantes como los metabolitos secundarios. Los antioxidantes poseen una afinidad mayor para interactuar con los radicales libres, ya que su estructura se compone por un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilos lo que les permite atrapar el electrón desapareado o ceder protones para estabilizar el radical (Wei & Ho, 2006).

2.5 Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios son moléculas orgánicas sintetizadas principalmente por las plantas en respuesta al estrés. Estas moléculas pueden ejercer una amplia gama de efectos sobre la propia planta o sobre otros organismos (Teoh, 2015).

Son derivados del metabolismo primario por lo que no están involucrados en el crecimiento y desarrollo normal de un organismo (Agostini-Costa et al., 2012). Actúan en la defensa de las plantas como antimicrobianos, atrayentes o repelentes (Teoh, 2015).

En la literatura se han descrito alrededor de 50.000 metabolitos secundarios en las plantas (Teoh, 2015). Se clasifican generalmente en base a su origen biosintético conformado por tres grupos: compuestos fenólicos (ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos, estilbenos, flavonoides, taninos y ligninas), terpenos (glicósidos cardiotónicos, carotenoides, esteroides, saponinas), y compuestos que contienen nitrógeno / azufre (alcaloides) (Zaynab et al., 2018), (Nawrot-Chorabik et al., 2022). Los compuestos fenólicos se forman principalmente a través de la vía del ácido shikímico, los terpenos se derivan del pirofosfato de isopentenilo (IPP), y finalmente los alcaloides son biosintetizados a partir de aminoácidos (Zaynab et al., 2018).

Los metabolitos secundarios se emplean principalmente en productos farmacéuticos, aditivos alimenticios, y materiales industriales. Además, la investigación científica de metabolitos secundarios resulta importante en contra de diversas enfermedades (Tiwari & Rana, 2015).

2.5.1 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos se forman principalmente a través de la vía del ácido shikímico. Entre los principales compuestos fenólicos se encuentran cumarinas, flavonoides, polifenoles, y taninos (Nawrot-Chorabik et al., 2022).

Las cumarinas simples, como la umbeliferona se biosintetizan a partir de la vía de los fenilpropanoides mediante un paso clave de *ortohidroxilación*. Este grupo se distribuye en varias familias de plantas y se puede encontrar en semillas, flores, hojas, raíces tallos y frutos (Hussain et al., 2018). Se les atribuyen diversas actividades biológicas como antibacterianas, antioxidantes, antiinflamatorias, etc. (Shimizu, 2014).

La biosíntesis de flavonoides se origina a partir de la vía fenilpropanoide, que produce una gama de diferentes metabolitos secundarios, tales como ácidos fenólicos, ligninas, lignanos, y estilbenos (Andersen & Markham, 2005). Catalizan el transporte de electrones en la fase luminosa de la fotosíntesis (Martinez et al., 2002), y controlan los niveles de auxinas reguladoras del crecimiento, además de conferir coloración. Se encuentran en frutos, plantas y semillas (Jiménez et al., 2009). Se han sugerido efectos antibacterianos, virales, y anticancerígenos para este grupo de metabolitos. También, mediante la inducción de los sistemas protectores enzimáticos, y la quelación de metales previenen la generación de radicales libres (S. Kumar & Pandey, 2013).

Los polifenoles son derivados de la vía del shikimato (Tsao, 2010). Existen alrededor de 8.000 moléculas identificadas (Harborne & Williams, 2000). Su estructura se encuentra determinada con al menos un anillo aromático bencénico al que está unido uno o más grupos hidroxilo (Mercado et al., 2013). Proveen color a las hojas, frutas y flores, y a su vez tienen propiedades antimicrobianas, antimicóticas, de protección solar, quelan metales tóxicos pesados y tienen propiedades antioxidantes ante los radicales libres generados (Bautista, 2015). La capacidad antioxidante que presentan los polifenoles reduce el riesgo de enfermedades asociadas al estrés oxidativo como el cáncer (Bautista, 2015).

Los taninos son moléculas solubles en agua, y cuentan con un peso molecular entre 500-3000 Daltones (D). Las vías del ácido shikímico y malonato son las principales rutas metabólicas de la síntesis de estos metabolitos (Hassanpour et al., 2011). Son capaces de precipitar alcaloides, albuminoides y gelatina (Amarowicz, 2007). Se subdividen en dos grupos: taninos hidrolizables y condensados. Los taninos hidrolizables son polifenoles de carbohidratos como la glucosa y los ácidos carboxílicos fenólicos. Los taninos condensados, por su parte, no se hidrolizan con ácidos minerales y requieren mayores concentraciones acídicas, así como tiempos prolongados para su hidrólisis (García, 2004). Los taninos pueden emplearse terapéuticamente en compuestos antidiarreicos, hemostáticos y antihemorroides; presentan actividad antiinflamatoria por lo que ayudan a controlar la gastritis, esofagitis, enteritis y trastornos intestinales irritantes (Kumar & Upadhyaya, 2012).

2.5.2 Compuestos nitrógeno / azufre

Los compuestos de nitrógeno – azufre se integran por los alcaloides. Los alcaloides son grupo muy diverso de metabolitos secundarios con un estimado de 20000 moléculas distintas, distribuidas en aproximadamente 20 % de plantas vasculares registradas (Matsuura & Fett-Neto, 2015).

Son compuestos que contienen un átomo de nitrógeno de bajo peso molecular en un anillo heterocíclico, por lo que son típicamente alcalinos (Matsuura & Fett-Neto, 2015). Comparten un origen común a partir de metabolitos primarios como aminoácidos o bases y se les ha considerado como productos terminales del metabolismo de nitrógeno (Guirimand et al., 2010).

En la planta, en ocasiones se encuentran restringidos a ciertos órganos o partes; o estar distribuidos en todo el organismo vegetal (Domínguez, 1988). Dentro de las funciones biológicas de estos metabolitos, se ha sugerido que intervienen en el crecimiento vegetal, por su capacidad de formar quelatos o intervenir en fenómenos de óxido-reducción. Asimismo, muchos alcaloides son tóxicos, ya que actúan como componentes de defensa en plantas contra patógenos y predadores (Guirimand et al., 2010). A veces estos efectos de toxicidad pueden ser nocivos o beneficiosos dependiendo del contexto ecológico o farmacológico. De tal manera, se les atribuyen actividades antiinflamatorias, anestésicas, analgésicas, sedantes, antisépticas, eméticas, emolientes y diuréticas (Matsuura & Fett-Neto, 2015).

2.5.3 Terpenos

Los terpenos se integran principalmente por esteroides, glicósidos cardiotónicos, y saponinas.

Los esteroides en plantas se clasifican en dos categorías: fitoesteroles y brasinoesteroides. Los fitoesteroles son un grupo de alcohol-esteroides, son polvos blancos con olor suave característico, insolubles en agua y solubles en alcoholes. Se les atribuyen propiedades reductoras del colesterol y preventivas de cáncer (Sultan, 2015). Por otro lado, los brasinoesteroides son un grupo de fitohormonas esteroides polihidroxiladas que contribuyen al desarrollo, crecimiento y productividad de las plantas, con capacidad de modular el estrés biótico y abiótico de las plantas (Manghwar et al., 2022).

Los glicósidos cardiotónicos son compuestos derivados de esteroides. Estos metabolitos contienen en su estructura un anillo insaturado de lactona que define las dos clases de glicósidos cardiotónicos: los cardenólidos (con lactona 2-furanona) y los bufadienólidos (con lactona 2-pirona) (Calderón et al., 2013). Los glicósidos cardiotónicos son sustancias amargas, solubles en agua o alcoholes de bajo peso molecular (Woods, 1986). Se encuentran en diversas partes de las plantas como hojas, raíces, y corteza (Domínguez,

1988). Algunos glicósidos cardiotónicos se utilizan en cardiología para el tratamiento de congestión cardíaca y algunos tipos de arritmias, ya que aumentan la contractilidad de la fibra muscular y el volumen minuto (Morsy, 2017). Estos metabolitos presentan actividades anticancerígenas (Calderón et al., 2013).

Finalmente, las saponinas se han reportado en más de 100 familias, y 500 géneros (Negi et al., 2013). Contienen en su estructura una aglicona esteroide o triterpenoide, y una o más cadenas de azúcar (Güçlü-Ustündağ & Mazza, 2007). Según la estructura de la aglicona, las saponinas se clasifican como neutrales o ácidas, siendo las saponinas neutrales derivadas de esteroides, y las saponinas ácidas poseen estructura triterpenoide (Desai et al., 2009). Debido a su naturaleza anfifílica, las saponinas son compuestos activos de superficie con propiedades espumosas, detergentes, de humectación y emulsión (Domínguez, 1988). Además, son sustancias polares, con alto peso molecular (Negi et al., 2013). Muchas saponinas presentan actividad antimicrobiana (Desai et al., 2009), actúan en el sistema de defensa de plantas para contrarrestar patógenos y herbívoros (Yoong et al., 2014). También, presentan actividad hemolítica sobre eritrocitos ya que hinchon y rompen estas células (Güçlü-Ustündağ & Mazza, 2007). Las saponinas presentan actividad terapéutica de tipo hemolítica, molusquicida, antiinflamatoria, antifúngica, antibacteriana, antiparasitaria, antitumoral, y antiviral (Yoong et al., 2014).

2.6 *Hyptis verticillata* Jacq.

Hyptis verticillata Jacq. es una planta perteneciente a la familia Lamiaceae. El género *Hyptis* se conforma por plantas comúnmente medicinales con una fuente importante de componentes bioactivos (Picking et al., 2013).

Hyptis verticillata Jacq. es originaria de Centroamérica, con una distribución que abarca principalmente desde Florida a México, Colombia, y las islas del Caribe (Picking et al., 2013). En México, se ha registrado en los estados de Hidalgo, Puebla, Oaxaca, San Luis Potosí y Veracruz. Habita climas cálidos y semicálidos desde el nivel del mar hasta los 760 m (Martínez et al., 2017).

Hyptis verticillata Jacq. recibe diferentes nombres según la región en que se encuentra. Se le nombra como barrehorno, escobilla, epazotillo, hierba del negro, hierba martin, mosote, o vara negra (CONABIO, 2024).

Morfológicamente, son hierbas o arbustos erectos, con una altura aproximada de un 1m a 2.5m. Cuenta con tallos ramificados y leñosos, hojas opuestas, membranáceas, de color verde oscuras, lanceoladas, con bordes dentados, y de tamaño entre los 2cm a 13cm de largo, con follaje aromático y amargo (Fig. 1). Cuentan con una inflorescencia laxa, y verticilastros en las axilas de las hojas con flores. Las flores son pequeñas, casi sésiles de alrededor de 3 mm. Flores de color blanco a púrpura. Cuenta con frutos en forma de nueces oblongas, redondo-truncado en el ápice, diminutamente reticulada, de tamaño aproximado de 1 a 1.5 mm (Fig. 1) (Martínez et al., 2013).



A

B

Figura 1. Morfología de *Hyptis verticillata* Jacq. Fig. 1A: Flores de *Hyptis verticillata* Jacq. Fig. 1B: Hojas de *Hyptis verticillata* Jacq. Fotografías tomadas en la localidad de Limón Chiquito, Veracruz, México.

En la literatura, se ha determinado una amplia gama de usos de *Hyptis verticillata* Jacq. contra diferentes padecimientos, desde su uso en condiciones que afectan el sistema respiratorio, el aparato gastrointestinal, enfermedades ginecológicas, el sistema musculoesquelético y algunas afecciones en la piel (Picking et al., 2013).

Se han aislado y caracterizado algunos metabolitos secundarios de *Hyptis verticillata* Jacq.: 17 lignanos, 1 alcaloide, 3 monoterpenos, 3 sesquiterpenos, 11 diterpenos, 4 triterpenos, 1 polifenol y 2 flavonoides (Picking et al., 2013).

2.6.1 El papel de *Hyptis verticillata* Jacq. en cáncer

Las especies pertenecientes al género *Hyptis* cuentan con componentes bioactivos con actividad insecticida, antimicrobiana, y anticancerígena (McNeil et al., 2011).

Muchos de los metabolitos secundarios aislados y caracterizados de *Hyptis verticillata* Jacq. hasta la fecha tienen propiedades terapéuticas. Se han determinado 42 fitoquímicos, de los cuales 21 tienen algún tipo de actividad anticancerígena. Este último grupo de moléculas presenta efectos antimitóticos, antiproliferativos, antitumorales, antimutagénicos, citotóxicos, antioxidantes y antiinflamatorios (Picking et al., 2013) (Tabla 1).

Trabajo de investigación	Actividad farmacológica	Modelo experimental	Parte de la planta utilizada	Tipo de extracto utilizado
Isolation and characterization of cytotoxic principles from <i>Hyptis verticillata</i> Jacq. (German, 1971).	Anticancerígena - Citotóxica	<i>In vitro</i> (Línea celular de leucemia P1534)	Hoja Seca	Acuoso
Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants (Rojas et al., 1992).	Antibacteriana y antifúngica	<i>In vitro</i> (En bacterias <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus Subtilis</i> , <i>Escherichia Coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and y hongo <i>Candida albicans</i>).	Partes aéreas secas	Extracto crudo Metanólico
Biological and Pharmacological activities and further constituents of <i>Hyptis verticillata</i> (Kuhnt et al., 1995).	Antiinflamatoria	<i>In vivo</i> (Ensayo HET-CAM)	Hoja seca	Extracto crudo de acetona
The bioassay-guided isolation of growth inhibitors of adult T-cell leukemia (ATL), from the Jamaican plant <i>Hyptis verticillata</i> , and NMR characterization of hyptoside (Hamada et al., 2012).	Anticancerígena Citotóxica	<i>In vitro</i> (Línea celular de leucemia – S1T)	Partes aéreas Secas	Lignanos aislados

Tabla 1. Estudios farmacológicos de *Hyptis verticillata* Jacq. Características de una serie de trabajos realizados sobre *Hyptis verticillata* Jacq. y su actividad a base de extractos o metabolitos aislados sobre diversas patologías tales como el cáncer en diversos modelos experimentales.

3. Justificación

El cáncer de mama representa un grave problema de salud global, ya que es la principal tumoración maligna en incidencia y mortalidad en la población femenina. En México, se ha establecido el cáncer de mama como la tumoración maligna con mayor tasa de defunción en mujeres adultas. Estudios sugieren que en este tipo de neoplasias malignas el estrés oxidativo es de gran importancia, dada su capacidad de reaccionar con distintas biomoléculas que dañan el ADN. En modelos experimentales, se han descrito diversas moléculas capaces de modular esta condición, tal como los metabolitos secundarios presentes en plantas. En este sentido el uso de terapias con plantas medicinales podría regular el estrés oxidativo implicado en el origen, promoción y progresión del cáncer.

Se ha determinado que algunos grupos de metabolitos secundarios presentes en *Hyptis verticillata* Jacq. como alcaloides, saponinas, y polifenoles, presentan actividades anticancerígenas. Atendiendo estas consideraciones, la presente tesis evaluó el potencial antioxidante de *Hyptis verticillata* Jacq. sobre el estrés oxidativo en un modelo murino de cáncer de mama.

4. Hipótesis

Hyptis verticillata Jacq. disminuirá el estrés oxidativo en un modelo de cáncer de mama *in vivo*, a través de los metabolitos secundarios presentes en la especie.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad antioxidante de extractos orgánicos de *Hyptis verticillata* Jacq. sobre marcadores de estrés oxidativo en ratones hembra CD-1.

5.2 Objetivos particulares

- Conocer el uso medicinal de *Hyptis verticillata* Jacq.
- Determinar la concentración de metabolitos secundarios identificados en extractos acuosos e hidroalcohólicos de *Hyptis verticillata* Jacq.
- Evaluar la actividad de extractos de *Hyptis verticillata* Jacq. sobre marcadores de estrés oxidativo (nitritos, lipoperoxidación y enzima catalasa) en hígado y sangre periférica de ratón.

6. Material y métodos

6.1 Lugar de recolecta de *Hyptis verticillata* Jacq.

Los ejemplares de *Hyptis verticillata* Jacq. analizados en la presente tesis se recolectaron en la localidad de Limón Chiquito, situada en el Municipio de Cazones, en el estado de Veracruz, México (20° 40' 44.4'' N, 97° 16' 43.5'' O a 15 msnm).

Se seleccionaron ejemplares sanos en etapa de floración. Se validaron los ejemplares por medio del herbario MEXU, UNAM.

6.2 Registro etnobotánico

Se elaboró un registro de datos etnobotánicos de *Hyptis verticillata* Jacq. en la localidad de recolecta, a través de entrevistas breves a personas locales, basado en la metodología TRAMIL (Robineau, 1984). Se recopilieron principalmente datos sobre usos tradicionales o terapéuticos de la especie de estudio, tipos de administración, efectos adversos, así como sexo y edad de las personas entrevistadas.

6.3 Procesamiento del material de recolecta

Los ejemplares se lavaron exhaustivamente con agua destilada para remover cualquier tipo de impureza. Posteriormente, cada planta se separó en hojas, tallo, flor y raíz (un ejemplar se conservó completo para su posterior determinación).

6.4 Obtención de extractos de *Hyptis verticillata* Jacq.

6.4.1 Extractos Acuosa

Los extractos acuosos de la planta se generaron por medio de la decocción individual de sus partes separadas. Se emplearon 100 g de cada estructura de *Hyptis verticillata* Jacq. seleccionada para su decocción en 1 L de agua destilada por 10 minutos. Las cantidades empleadas se establecieron de acuerdo a los datos recopilados por el registro etnobotánico.

Los extractos acuosos obtenidos se almacenaron en frascos ámbar a 4°C para su conservación.

6.4.2 Extractos hidroalcohólicos

Las partes de *Hyptis verticillata* Jacq. separadas se trituraron individualmente por medio de morteros de porcelana con pistilo. Posteriormente, a las muestras se les adicionó una solución de etanol-agua (3:1). Las cantidades utilizadas se establecieron según los datos recopilados por el registro etnobotánico (Tabla 2).

Los extractos hidroalcohólicos obtenidos se almacenaron en frascos ámbar a temperatura ambiente para su mantenimiento.

Parte de la Planta	Muestra (g)	Etanol / Agua (mL)
Hoja	100 g	750 / 250 mL
Tallo	100 g	750 / 250 mL
Flor	100 g	750 / 250 mL
Raíz	100 g	750 / 250 mL
Planta completa	50 g	375 / 125 mL

Tabla 2. Preparación de extractos hidroalcohólicos de *Hyptis verticillata* Jacq. El extracto de planta completa se mantuvo con una proporción de etanol / agua igual al resto de extractos en relación a los gramos (g) obtenidos de ejemplar en la colecta.

6.4.3 Extractos secos

Tanto los extractos acuosos e hidroalcohólicos generados a partir de *Hyptis verticillata* Jacq. se depositaron individualmente en cristalizadores, y se colocaron en campanas de extracción para su secado.

Posteriormente, se recuperó el extracto seco de los cristalizadores raspando el material vegetal, el cual se almacenó de forma individual nuevamente en frascos ámbar a temperatura ambiente. Se obtuvieron un total de 10 extractos secos (5 acuosos y 5 hidroalcohólicos).

6.5 Rendimiento de extractos secos

Se determinó el rendimiento de los extractos secos obtenidos de *Hyptis verticillata* Jacq. mediante la siguiente fórmula:

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

Donde P es el peso del extracto seco obtenido (g) y m es el peso del material vegetal (g) (Tolosa & Cañizares, 2002).

6.6 Determinación de azúcares totales

Se determinaron las cantidades de azúcares totales en los extractos de *Hyptis verticillata* Jacq. mediante el método de fenol-sulfúrico (DuBois et al., 2002). Dicha técnica se basa principalmente en la sensibilidad que presentan los carbohidratos a ácidos fuertes y altas temperaturas generadas por los reactivos de fenol (5 %) y ácido sulfúrico concentrado. De tal manera, se generan productos derivados del furano que se condensan (con ellos mismos, o fenoles) formando compuestos coloridos analizados por espectrofotometría (Nielsen, 2010).

Se realizó una curva de calibración de glucosa de 10-100 µg/L. Los extractos de estudio, y la curva de calibración se trataron con 0.3 mL de fenol y 1.8 mL de ácido sulfúrico. La lectura de absorbancia se realizó a 490 nm.

6.7 Tamizaje fitoquímico preliminar

Se realizó un análisis fitoquímico cualitativo para determinar la presencia de diversos grupos de metabolitos secundarios en *Hyptis verticillata* Jacq. Brevemente, las reacciones consistieron principalmente en cambios químicos de algún grupo funcional de la estructura del metabolito, formación de otros compuestos que pueden producir cambios o pérdida de coloración, o precipitación de conjugados (Bilbao, 1997).

A partir de cada extracto seco obtenido, se prepararon soluciones individuales con una concentración de extracto de 0.01 g/mL en agua destilada.

Para la identificación de los metabolitos secundarios presentes en los extractos de *Hyptis verticillata* Jacq. se tomaron alícuotas individuales de 500 µl de solución de extracto, utilizadas en las reacciones específicas descritas a continuación.

6.7.1 Compuestos fenólicos

6.7.1.1 Cumarinas

La identificación de cumarinas se realizó mediante la prueba de hidroxamato férrico que reconoce la estructura γ -lactona (Carvajal et al., 2009). Se basa en la formación de un complejo entre el ácido hidroxámico formado y el cloruro férrico (Domínguez, 1988). Se preparó una solución de clorhidrato de hidroxilamina 2 % etanol e hidróxido de potasio. La solución se calentó hasta la formación de una espuma de color rojizo, se enfrió y se añadieron un par de gotas de ácido clorhídrico y cloruro férrico. La formación de una coloración violeta indica la presencia de este grupo de metabolitos (Hinojosa et al., 2013).

6.7.1.2 Flavonoides

La reacción de Shinoda se empleó para la identificación de flavonoides. Se añadieron 2 limaduras de magnesio y gotas de HCl concentrado hasta observar una coloración anaranjada, rosa, roja azulosa o violeta (Domínguez, 1988). El anillo de gamma benzopirona presente en flavonoides reacciona con el HCl concentrado y magnesio (Bilbao, 1997).

6.7.1.3 Polifenoles

La presencia de polifenoles se analizó mediante la reacción de Folin-Ciocalteu. Este método se basa en la capacidad que tienen los fenoles para reaccionar con los agentes oxidantes de molibdato y tungstato sódico. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos formados en óxidos de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), los cuales son cromógenos de color azul intenso (Julkunen-Tiitto, 1985). Se añadieron 500 μ l de reactivo Folin-Ciocalteu a las muestras de extracto, y 2 mL de carbonato de sodio.

6.7.1.4 Taninos

La identificación de taninos comúnmente emplea la capacidad de estos metabolitos de unirse a las proteínas y precipitarlas. Los taninos se identificaron por medio del reactivo de gelatina-sal. Se disolvieron 0.25 g de grenetina en 25 mL de solución de cloruro de sodio al 10%, lo que produce un precipitado blanco en presencia de taninos. Estos precipitados muestran coloraciones verdes, azules o negras tras la adición de cloruro férrico al 10 % en agua destilada (Carvajal et al., 2009).

6.7.2 Compuestos de Nitrógeno – Azufre

6.7.2.1 Alcaloides

Los alcaloides se pueden identificar dada su capacidad para formar sales al combinarse principalmente con yodo, yoduro de potasio, yoduro de bismuto, mercurio, y con ácidos de metales pesados, como el silicotúngstico, cloroplatínico y fosfomolibdico. Se realizaron 3 reacciones independientes para determinar la presencia de estos metabolitos en los extractos de estudio. Las muestras se acidularon con HCl (diluido) previo a la adición de los reactivos.

Reactivo de Dragendorff: se disolvieron 4 g de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 10 mL de HNO_3 al 30 % y 13.6 g de KI en 25 mL de agua. Las soluciones se mezclaron, y se dejó reposar por 24 horas, se decantó la solución y se aforó con agua a 50 mL. La prueba es positiva con la formación de un precipitado color anaranjado-marrón.

Reactivo de Mayer: se disolvieron 0.68 g de HgCl_2 en 30 mL de agua y 2.5 g de KI en 5 mL de agua. Las soluciones se mezclaron, y se aforó a 50 mL con agua destilada. La prueba es positiva si se presenta un precipitado de color blanco o color crema.

Reactivo de Wagner: se disolvieron 0.635 g de yodo sublimado y 1 g de yoduro de potasio en 10 mL de agua; la solución se aforó a 50 mL con agua destilada. La prueba es positiva con la formación de un precipitado color anaranjado-marrón (Domínguez, 1988).

6.7.3 Terpenoides

6.7.3.1 Esteroides

El reactivo de Lieberman-Burchard se utilizó para la identificación de esteroides, se genera una reacción entre el anhídrido acético con el núcleo esteroide o triterpenoide presente en estos metabolitos. La solución consistió en 25 mL de anhídrido acético con 25 mL de cloroformo, con la adición de unas gotas de ácido sulfúrico, y se sometió a un calentamiento de 110°C durante 10 min. Los esteroides están presentes si se observan coloraciones rojas, azules o verdes en cualquier tonalidad (Xiong et al., 2007).

6.7.3.2 Glicósidos cardiotónicos

La identificación de glicósidos cardiotónicos se basa en la presencia de la molécula 2-desoxiazúcar. Se realizaron 2 reacciones independientes. Keller-Killiani: se disolvieron 500 µl de sulfato férrico al 5 % en 49.5 mL de ácido acético glacial. Se añadió 1 mL a las muestras, y dos gotas de ácido sulfúrico. La prueba es positiva si se observa una coloración azul. Baljet: Solución 1: se disolvieron 0.25 g de ácido pícrico en 25 mL de etanol. Solución 2: se disolvieron 2.5 g de hidróxido de sodio en 25 mL de agua destilada. Las soluciones se mezclaron, y se agregaron 4 gotas de reactivo a las muestras. La prueba es positiva si se muestra una coloración anaranjada o rosa oscura (Domínguez, 1988).

6.7.3.3 Saponinas

Las saponinas se pueden identificar mediante la prueba de espuma, que aprovecha la naturaleza anfifílica de estas moléculas dada por la presencia de una aglicona soluble en lípidos y de una cadena de azúcar soluble en agua (Negi et al., 2013). Se adicionaron 3 mL de muestra a un tubo de ensayo, se tapó y agitó vigorosamente. La formación de espuma debe de ser estable por lo menos 30 minutos para poder establecer la presencia de saponinas (Domínguez, 1988).

6.8 Cuantificación de metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios identificados en los extractos de *Hyptis verticillata* Jacq. se cuantificaron por espectrofotometría de luz UV-Visible a través de reacciones específicas. Las lecturas se determinaron por medio de espectrofotómetro.

A partir de los extractos secos, se prepararon soluciones individuales con una concentración de extracto de 0.01 g/mL en agua destilada. Posteriormente, se utilizaron alícuotas de 50 µl de los extractos para las reacciones empleadas.

6.8.1 Compuestos fenólicos

6.8.1.1 Cumarinas

Se realizó una curva de calibración a partir de una solución patrón de Umbeliferona (0.1 g de Umbeliferona en 5 mL de metanol, y se aforó a 50 mL con agua destilada). La absorbancia se leyó a 320 nm (Osório & Martins, 2004).

6.8.1.2 Polifenoles

La cuantificación de polifenoles se llevó a cabo por la reacción de Folin-Ciocalteu descrita anteriormente, que produce cromógenos de color azul intenso. Se realizó una curva de calibración a partir de una solución estándar de ácido gálico 2 mM. La absorbancia se leyó a 760 nm (Muñoz et al., 2017).

6.8.1.3 Taninos

Los taninos se cuantificaron con el uso de polivinilpolipirrolidona (PVPP), que es un polímero insoluble en medio acuoso que precipita los taninos (García, 2004). Una vez obtenidos los taninos, se realizó el método de Folin Ciocalteu, empleando una curva de calibración con una solución patrón de ácido tánico (0.1 mg/mL). Se midió la longitud de onda a 760 nm (Muñoz et al., 2017).

6.8.2 Compuestos de nitrógeno-azufre

6.8.2.1 Alcaloides

La concentración de alcaloides se determinó mediante el método de Shamsa (Shamsa et al., 2008), el cual consiste en la formación de un complejo de transferencia de carga alcaloide - verde de bromocresol a pH 4.7. Se realizó una curva de calibración a partir de una solución patrón de cafeína (0.1 g/mL). La longitud de onda se midió a 420nm.

6.8.3 Terpenos

6.8.3.1 Esteroides

La cuantificación de esteroides se llevó a cabo a través de la reacción Lieberman-Buchard descrita anteriormente. Se realizó una curva de calibración a partir de una solución patrón de colesterol 10 mM. Se midió la absorbancia a 620 nm.

6.8.3.2 Glicósidos cardiotónicos

Los glicósidos se cuantificaron mediante su reacción con picrato de sodio, compuesto que reacciona con la molécula 2-desoxiazúcar lo que genera la formación de cromóforos. Se realizó una curva de calibración con una solución estándar de digoxina (0.04 mg/mL). En 5 mL de solución, se añadieron 3 mL de solución de picrato de sodio. Se dejó incubar por 30 minutos, y se midió la absorbancia a 495 nm. La concentración de glicósidos cardiotónicos se determinó mediante la siguiente fórmula:

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

Sea: C_{Mx} = Cantidad de glucósidos cardiotónicos en la muestra, C_{St} = Concentración del estándar usado en el análisis, A_{Mx} = Absorbancia de la muestra, A_{St} = Absorbancia del estándar, FD = Factor de dilución de la muestra (Abrego & Honles, 2012).

6.8.3.3 Saponinas

Las saponinas se cuantificaron mediante el proceso de hidrólisis ácida, generada por anhídrido acético y ácido sulfúrico al 16%. Este proceso provoca la separación de la aglicona y los carbohidratos presentes en la estructura de las saponinas. Sustancias como el cloroformo reaccionan con productos de deshidratación de las agliconas generando compuestos coloreados. Se realizó una curva de calibración a partir de una solución patrón de sapogenina (20 mg/mL). La absorbancia se leyó a 485 nm (Ramos et al., 2014).

6.9 Diseño experimental

El modelo experimental *in vivo* se integró por 60 ratones hembras CD-1, de un mes de edad. Los ratones se distribuyeron en 10 grupos de estudio (6 ratones por grupo) para un manejo experimental específico (Tabla 3).

Grupo	Condición	Régimen de administración
1	Control	Ratones hembra en desarrollo normal
2	Vehículo	Administración vía oral (25 µl) de aceite de oliva durante 15 días
3	Extracto de hoja acuoso	Administración vía oral (25 µl) de extracto de hoja acuoso durante 15 días
4	Extracto de raíz acuoso	Administración vía oral (25 µl) de extracto de raíz acuoso durante 15 días
5	Extracto de planta completa hidroalcohólico	Administración vía oral (25 µl) de extracto de planta completa hidroalcohólico durante 15 días
6	Extracto de flor acuoso	Administración vía oral (25 µl) de extracto de flor acuoso durante 15 días
7	DMBA + Extracto de hoja acuoso	Administración previa vía oral (25 µl) de carcinógeno DMBA diluido en aceite de oliva + Administración vía oral (25 µl) de extracto de hoja acuoso durante 15 días
8	DMBA + Extracto de raíz acuoso	Administración previa vía oral (25 µl) de carcinógeno DMBA diluido en aceite de oliva + Administración vía oral (25 µl) de extracto de raíz acuoso durante 15 días
9	DMBA + Extracto de planta completa hidroalcohólico	Administración previa vía oral (25 µl) de carcinógeno DMBA diluido en aceite de oliva + Administración vía oral (25 µl) de extracto de planta completa hidroalcohólico durante 15 días
10	DMBA	Administración previa vía oral (25 µl) de carcinógeno DMBA diluido en aceite de oliva

Tabla 3. Características y distribución de los grupos experimentales de ratones hembra CD-1. La administración del agente carcinogénico DMBA se realizó en los grupos de ratones designados a la edad de 45 días. Los tratamientos y el vehículo dados a los ratones se administraron a partir de los 135 días de edad.

El uso y manejo de animales de laboratorio se realizó mediante las normas establecidas por la ley mexicana de protección animal para el uso de animales de experimentación (NOM-062-ZOO-199).

6.10 Inducción de cáncer de mama a ratones CD-1

La inducción de cáncer de mama se realizó en grupos seleccionados de ratones hembras de 45 días de edad (grupos 7, 8, 9, 10), periodo en que se inicia la organogénesis activa en la glándula mamaria, con un alto índice en la proliferación de lóbulos (DMBA actúa en los alveolos) y una mayor probabilidad de desarrollo del carcinoma (Arroyo et al., 2010). La inducción consistió en la administración de 2.63 mg de 7, 12-dimetilbenzantraceno (DMBA) por cada 26 g de peso de ratón, a cada organismo, una dosis única por vía oral. El DMBA se disolvió previamente en aceite de oliva dadas sus propiedades lipofílicas, a una temperatura de 27°C.

Una vez administrado el DMBA, los ejemplares se monitorearon durante 90 días, registrando características de anomalías y peso.

6.11 Tratamiento con extractos de *Hyptis verticillata* Jacq. a ratones CD-1

90 días posteriores a la inducción de carcinoma, se procedió a administrar ciertos extractos de *Hyptis verticillata* Jacq. a los grupos de ratones definidos (grupos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9). Los tratamientos seleccionados consistieron en la administración de una dosis diaria (25 µl) vía oral durante 15 días a cada organismo. Se monitorearon los ejemplares durante este periodo, registrando características de anomalías y peso. El tiempo de administración de los tratamientos y la dosis se determinó mediante los datos obtenidos por el registro etnobotánico, en relación con el peso de los ratones. Se llevó a cabo un registro semanal continuo, detallando observaciones y peso de los organismos.

6.12 Obtención de plasma sanguíneo de ratones CD-1

Una vez finalizado el periodo de administración de tratamientos, los ejemplares biológicos se sacrificaron por decapitación. La sangre se vertió individualmente en tubos Vacutainer con EDTA, y se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 minutos. El plasma sanguíneo obtenido de cada organismo se mantuvo en hielo.

6.13 Obtención de homogenado de hígado de ratones CD-1

Los hígados de los organismos sacrificados se extrajeron, se lavaron y perfundieron con solución salina de NaCl al 0.9%. Se registró peso y tamaño de cada hígado. Posteriormente, se trituraron mediante morteros con pistilo de manera individual, adicionando solución buffer TRIS-HCl pH 7.5 (5 mL por cada gramo de hígado) y 50 µl de 2-mercaptoetanol.

El macerado obtenido se filtró con una capa doble de gasas y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante resultante se mantuvo en hielo.

Los ejemplares sacrificados se diseccionaron, y se realizó un registro con características de bazo y pulmón, tumoraciones presentes y anomalías. En caso de presencia, las tumoraciones malignas se documentaron y extirparon, y se mantuvieron en formol para un posterior análisis.

6.14 Análisis de marcadores de estrés oxidativo

Todas las muestras obtenidas de plasma sanguíneo y tejido de hígado homogenado de ratón se analizaron mediante las pruebas de marcadores de estrés oxidativo.

6.14.1 Cuantificación de nitritos por el método de Griess – Saltzman

Los nitritos son el único producto estable resultante de la autooxidación del óxido nítrico (NO) en soluciones acuosas, por ello son cuantificables.

El reactivo de Griess – Saltzman consistió en la mezcla de una solución de N-1-(naftil) etilendiamina dihidrocloruro (0.2 % p/v en agua) con una solución de sulfanilamida (1 % en ácido fosfórico al 5%).

Se realizó una curva patrón de NaNO_2 1 mM con un volumen final de 1 mL, y se añadieron a las muestras de la curva 2 mL de reactivo de Griess – Saltzman (Fig. 2). Se leyó la absorbancia a 540nm. Para las muestras de estudio se tomaron 100 μL y se llevaron a un volumen de 1 mL, posteriormente se continuó con el mismo procedimiento aplicado a la curva patrón. La concentración se expresó como μmoles de nitrito/L (Adames et al., 2009).



Figura 2. Curva de calibración de cuantificación de nitritos por el método de Griess – Saltzman. El método de Griess – Saltzman se basa en la formación de un cromóforo de color violeta generado mediante la diazoación de sulfanilamida con nitritos, seguido de una conjugación con una amina bicíclica como la N-1-(naftil) etilendiamina dihidrocloruro, en un medio ácido (Tenorio et al., 2005).

6.14.2 Actividad enzimática de catalasa por el método de Chance y Maehly

La actividad enzimática se puede evaluar en función de la velocidad de reacción que las enzimas presentan. El método de Chance y Maehly se basa en la capacidad de la enzima catalasa para degradar el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en una molécula de agua y $\frac{1}{2}$ de oxígeno. Esta reacción se llevó a cabo colocando 1 mL de solución amortiguadora PBS con peróxido de hidrógeno 30 mM y 25 μL de muestra. La absorbancia se leyó a 240 nm en un espectrofotómetro UV (UNICO, S-2150 UV) (Maehly & Chance, 1954).

La actividad de catalasa se calculó mediante las lecturas de cambios de absorbancia por minuto (ΔA_{240}), como una pendiente de la parte lineal de la gráfica de A_{240} contra el tiempo, siguiendo la siguiente ecuación:

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

Donde ϵ es el coeficiente de extinción molar del H_2O_2 a 240 nm ($37.36 \mu\text{mol}^{-1} \text{ mL Abs}$); y FD es el factor de dilución: sustrato/muestra ($1000 \text{ mL}/25 \mu\text{L}$).

La ecuación se ajustó dadas la concentración de proteína de cada muestra (determinada por el método de Biuret), utilizando la siguiente fórmula:

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

6.14.3 Cuantificación de proteína total por el método de Biuret

El método de Biuret se basa en la formación de un complejo de Cu^{2+} con los grupos NH de los enlaces peptídicos. Se tomaron alícuotas de 100 μL de las muestras obtenidas de plasma e hígado para su análisis individual. Se elaboró una curva patrón de albúmina de huevo (10 mg/mL) (Fig. 3). Se le adicionó 4 mL de reactivo de Biuret, reposando en la obscuridad por 20min. Se leyó la absorbancia a 545 nm (Mahesha, 2012).



Figura 3. Curva de calibración de cuantificación de proteína por el método de Biuret. La reacción ocurre en medio básico, y se identificada por una coloración violeta, proporcional al número de proteínas.

6.14.4 Cuantificación de peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica implica la conversión oxidativa de ácidos grasos insaturados. Es medida mediante la producción de malondialdehído, que al reaccionar con ácido tiobarbitúrico forma un complejo coloreado (Arroyo et al., 2010).

En 100 μ l de muestra, se añadieron 100 μ l de buffer TRIS-HCl, 100 μ l de sulfato de hierro, y 100 μ l de ácido ascórbico. La solución se llevó al volumen de 1 mL con agua destilada, y se incubó a 37°C durante 15 min. Posteriormente se añadió a la solución 1 mL de TCA y 2 mL de TBA, para su incubación a 100°C por 15 min. Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm por 10 min para la obtención del sobrenadante. Se leyó la absorbancia a 532 nm (Murube, 2014).

La concentración de malondialdehído se calculó utilizando su coeficiente de extinción molar dada la siguiente ecuación:

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

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

6.15 Análisis estadístico

Los datos de los grupos de ratones se presentaron como media $\pm$ SEM. Se analizaron las muestras mediante análisis de ANOVA a través del programa IBM SPSS Statistics 25, y el criterio mínimo de diferencia estadísticamente significativa (*) se fijó en $p < 0.05$.

7. Resultados

7.1 Datos etnobotánicos

Se realizaron un total de 21 entrevistas en la localidad de recolecta de *Hyptis verticillata* Jacq., correspondientes a 9 hombres (43%) y 12 mujeres (57%), con un rango de edad de 24 a 72 años. El registro etnobotánico mostró que los usos principales de *Hyptis verticillata* Jacq. en la localidad pertenecen tanto a aspectos culturales, como terapéuticos. De manera que, *Hyptis verticillata* Jacq. comúnmente es empleada contra los cólicos, y en "limpias". Se determinó un registro en el uso de la especie contra el cáncer de mama (Fig. 4).

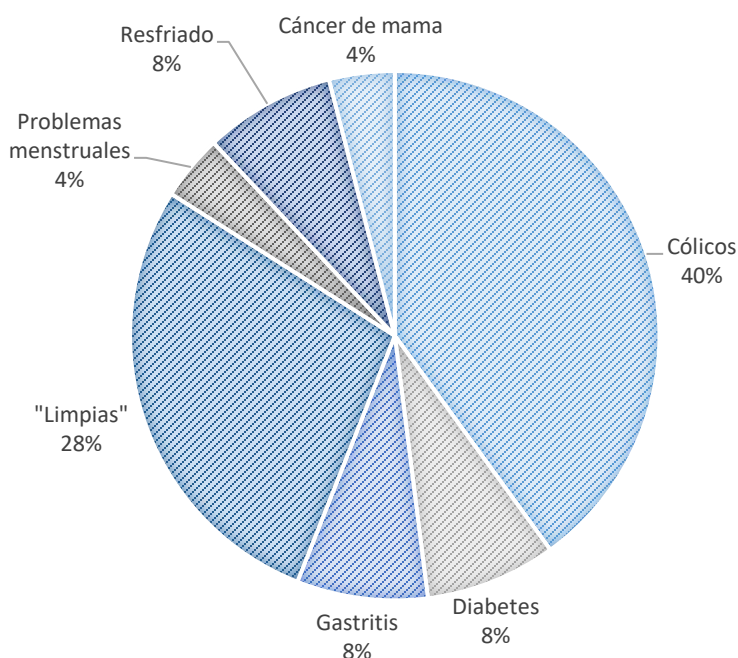


Figura 4. Porcentaje de los principales usos de *Hyptis verticillata* Jacq. en la localidad de Limón Chiquito, Veracruz.

El uso de *Hyptis verticillata* Jacq. contra los diversos padecimientos en la localidad se basa en dos de sus estructuras: hojas (62 % de los casos) y raíz (38 % de los casos).

El modo de preparación de la planta (previo a su uso) consistió principalmente a manera de té, ingerido. Asimismo, la duración del tratamiento comúnmente es de una semana. No se obtuvo reporte de efectos nocivos tras el uso de la planta en la localidad (Tabla 3).

Uso	Parte utilizada	Modo de preparación	Duración tratamiento
Resfriado	Hojas o raíz	Té	1 semana
Cólicos	Hojas	Té	3 semanas
Cólicos, diabetes, cólicos	Hojas	Té	1 – 3 meses
Cólicos	Hojas	Té	1 semana
Cólicos, resfriado	Raíz		1 – 2 meses
Dolor	Hojas	Hervida	3 días
Cólicos, diabetes	Raíz	Té	Al notar mejoría
Cólicos, menstruación	Raíz	Té	1 semana
Cólicos	Hojas	Té	1 semana
Gastritis	Hojas	Té	1 dosis
Cólicos	Hojas	Té	3 días
Gastritis	Raíz	Té	1 dosis
Cáncer de mama	Raíz	Decocción	3 semanas

Tabla 3. Características de administración en el uso de *Hyptis verticillata* Jacq. en diversas patologías en la localidad de Limón Chiquito, Veracruz. El modo de preparación en la localidad del tratamiento de raíz de *Hyptis verticillata* Jacq. contra el cáncer de mama consiste en un puño (aproximadamente 50 g) de materia vegetal (Raíz) en 2 L de agua, esta se calienta y se deja evaporar hasta alcanzar aproximadamente la mitad del volumen total (1 L). La administración es como agua de tiempo.

7.2 Rendimiento de extractos secos de *Hyptis verticillata* Jacq.

Se determinó el rendimiento de los extractos secos generados a partir de *Hyptis verticillata* Jacq. De manera general, se obtuvo un mayor rendimiento en los extractos acuosos, comparados con los hidroalcohólicos.

Extracto seco	Rendimiento de los extractos (%)			
	Hoja	Flor	Raíz	Planta completa
Acuoso	4.736	2.229	.930	.387
Hidroalcohólico	4.535	2.534	1.050	1.033

Tabla 4. Porcentajes de rendimiento de los extractos de *Hyptis verticillata* Jacq.

7.3 Cuantificación de azúcares totales

La determinación de azúcares totales en los extractos de *Hyptis verticillata* Jacq. se llevó a cabo mediante el método de fenol-sulfúrico. El extracto de flor hidroalcohólico presentó la mayor concentración de carbohidratos entre los extractos analizados; contrariamente, el extracto de hoja acuoso contó con el nivel más bajo de concentración (Fig. 5).

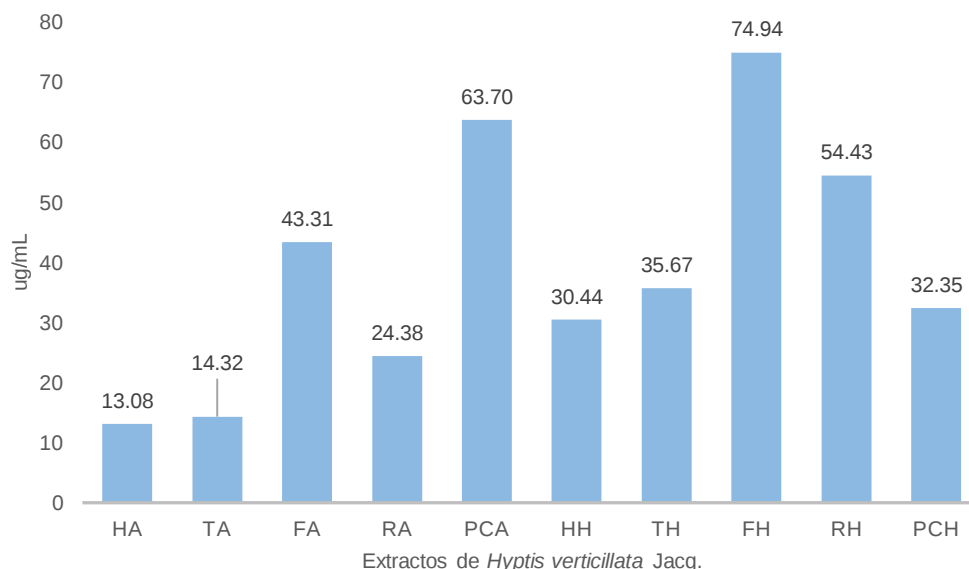


Figura 5. Concentración de azúcares totales de los extractos de *Hyptis verticillata* Jacq. La concentración de azúcares se expresa $\mu\text{g/mL}$. Sea: HA= hoja acuoso, TA= tallo acuoso, FA= flor acuoso, RA= raíz acuoso, PCA= planta completa acuoso, HH= hoja hidroalcohólico, TH= tallo hidroalcohólico, FH= flor hidroalcohólico, RH= raíz hidroalcohólico, PCH= planta completa hidroalcohólico.

7.4 Tamizaje fitoquímico preliminar

La identificación de metabolitos secundarios presentes en los extractos de *Hyptis verticillata* Jacq. se realizó a partir de los extractos secos y consistió en reacciones de coloración, y precipitación de conjugados. Se identificaron un total de 7 metabolitos secundarios en los extractos acuosos: alcaloides, cumarinas, esteroides, glicósidos cardiotónicos, polifenoles, saponinas y taninos. Los flavonoides representaron el único grupo ausente en este tipo de extractos (Tabla 5).

Metabolito secundario	Ensayo	<u>Extractos acuosos</u>				
		Hoja	Tallo	Flor	Raíz	Planta C.
Alcaloides	Dragendorff	+++	+	+++	+	+++
	Mayer	++	+	++	+	++
	Wagner	+++	+	+++	+	+++
Cumarinas	Hidróxido de Sodio	+	+	-	+	-
Esteroides	Lieberman-Burchard	+	+	-	+	-
Flavonoides	Shinoda	-	-	-	-	-
Glicósidos cardiotónicos	Baljet	++	+	+	++	++
	Keller-Killiani	+	+	+	+	+
Saponinas	Espuma	+++	++	++	++	++
Polifenoles	Folin-Ciocalteu	+++	+++	+++	+++	+++
Taninos	Gelatina-sal	+	+	+	+	+

Tabla 5. Determinación de metabolitos secundarios en extractos acuosos de *Hyptis verticillata* Jacq. Leyenda en cantidades: +++ Abundante, ++ Presencia relativamente abundante, + Presencia escasa, - Ausencia.

Asimismo, en los extractos hidroalcohólicos se identificaron 7 metabolitos secundarios: alcaloides, esteroides, cumarinas, glicósidos cardiotónicos, saponinas, polifenoles y taninos. Se determinó la ausencia de flavonoides (Tabla 6).

Metabolito secundario	Ensayo	Extractos hidroalcohólicos				
		Hoja	Tallo	Flor	Raíz	Planta C.
Alcaloides	Dragendorff	++	+	++	+	++
	Mayer	+	-	++	+	+
	Wagner	+	+	+	+	++
Cumarinas	Hidróxido de Sodio	+	+	+	+	+
Esteroides	Lieberman-Burchard	-	+	-	+	+
Flavonoides	Shinoda	-	-	-	-	-
Glicósidos cardiotónicos	Baljet	+	+	++	+	++
	Keller-Killiani	+	+	+	+	+
Saponinas	Espuma	++	++	++	++	++
Polifenoles	Folin-Ciocalteu	+++	+++	+++	+++	+++
Taninos	Gelatina-sal	+	+	+	+	+

Tabla 6. Determinación de metabolitos secundarios en extractos hidroalcohólicos de *Hyptis verticillata* Jacq. Leyenda en cantidades: +++ Abundante, ++ Presencia relativamente abundante, + Presencia escasa, - Ausencia.

7.5 Cuantificación de metabolitos secundarios

Las cantidades de metabolitos secundarios presentes en los extractos evaluados se cuantificaron por espectrofotometría de luz UV-Visible por medio de reacciones específicas. Los niveles de concentración de saponinas en ambos tipos de extracto de *Hyptis verticillata* Jacq. resultaron con mayor concentración respecto a los demás grupos de metabolitos secundarios (Tabla 7).

	Extracto	Alcaloides	Cumarinas	Esteroides	Glicósidos	Saponinas	Polifenoles	Taninos
Acuosos	Hoja	0.058	0.002	0.112	0.017	6.145	0.001	0.036
	Tallo	0.056	0.002	0.400	0.008	7.968	0.015	0.043
	Flor	0.037	0	0	0.015	27.916	0.012	0.045
	Raíz	0.071	0.001	0.102	0.008	12.656	0.008	0.025
	Planta C.	0.047	0	0	0.008	15.885	0.016	0.026
Hidroalco- hólicos	Hoja	0.049	0.002	0	0.004	6.302	0.009	0.035
	Tallo	0	0.003	0.614	0.007	7.760	0.008	0.048
	Flor	0.094	0.003	0	0.011	8.854	0.014	0.049
	Raíz	0.094	0.001	0.539	0.009	2.447	0.010	0.064
	Planta C.	0.097	0.002	0.468	0.007	5.260	0.008	0.043

Tabla 7. Concentraciones de metabolitos secundarios en los extractos de *Hyptis verticillata* Jacq. Las concentraciones de metabolitos secundarios se expresaron en mg/mL. Los extractos sombreados se implementaron como tratamiento para los grupos de ratones correspondientes.

7.6 Medición de la concentración de nitritos en plasma sanguíneo y homogenado de hígado de ratones CD-1

Se evaluaron los marcadores de estrés oxidativo en las muestras obtenidas de plasma y homogenado de hígado de ratones hembra CD-1 tras sus respectivos tratamientos.

La concentración de nitritos en plasma sanguíneo no mostró diferencias significativas entre los grupos de ratones sin inducción cancerígena tratados con los extractos de *Hyptis verticillata* Jacq. respecto a la condición control (Fig. 6). Por otra parte, los grupos de ratones sometidos al carcinógeno DMBA y tratados con los extractos seleccionados no mostraron diferencias significativas en los valores de nitritos respecto al grupo DMBA, sin embargo, los extractos acuosos de hoja y raíz, y el extracto hidroalcohólico de planta completa aumentaron la concentración de nitritos a valores cercanos a los normales (control) (Fig. 6).

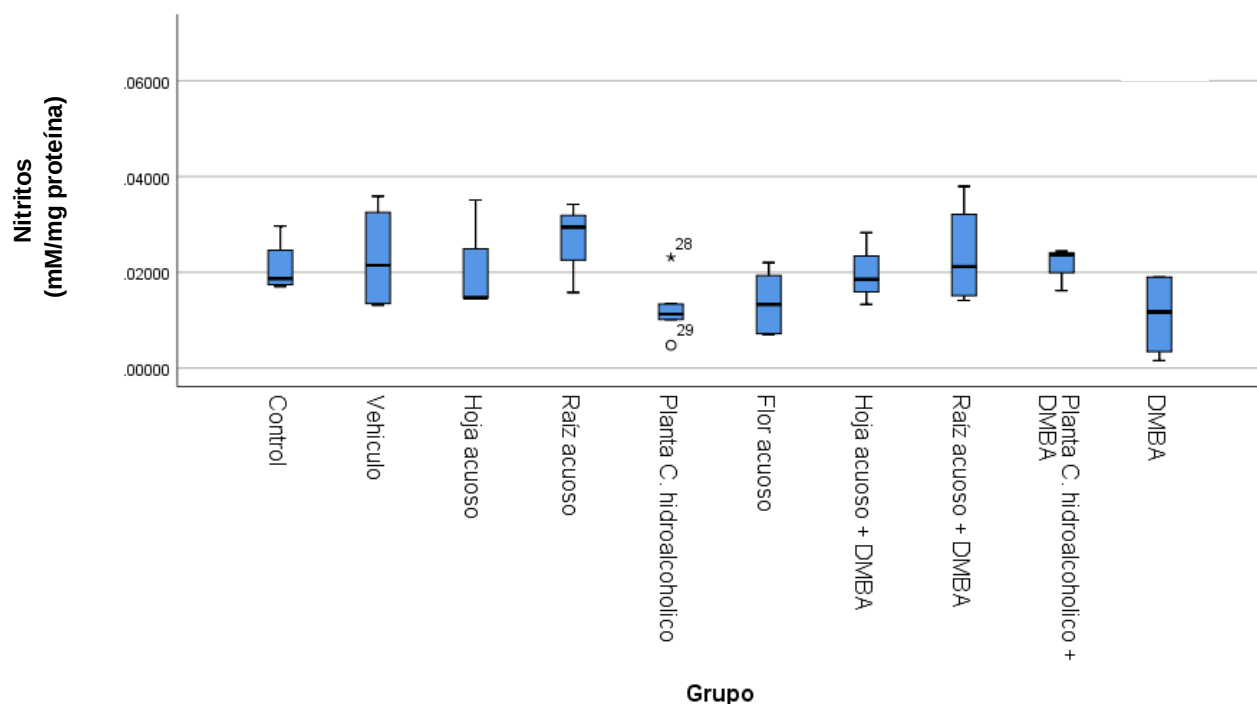


Figura 6. Efecto de los extractos de *Hyptis verticillata* Jacq. sobre la concentración de nitritos en plasma sanguíneo de ratones hembra de la cepa CD-1. La concentración de nitritos se expresó en mM/mg proteína. El criterio de diferencia estadísticamente significativa (*) se fijó en $p < 0.05$.

Los valores de nitritos en las muestras de homogenado de hígado no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de ratones en condiciones normales y tratados con los extractos, respecto a la condición control (Fig. 7). Por otra parte, los grupos sometidos al carcinógeno DMBA y al tratamiento con los extractos, no mostraron diferencia significativa en la concentración de nitritos respecto al grupo DMBA, no obstante, el extracto raíz acuoso aumentó los valores de nitritos en esta condición (Fig. 7).

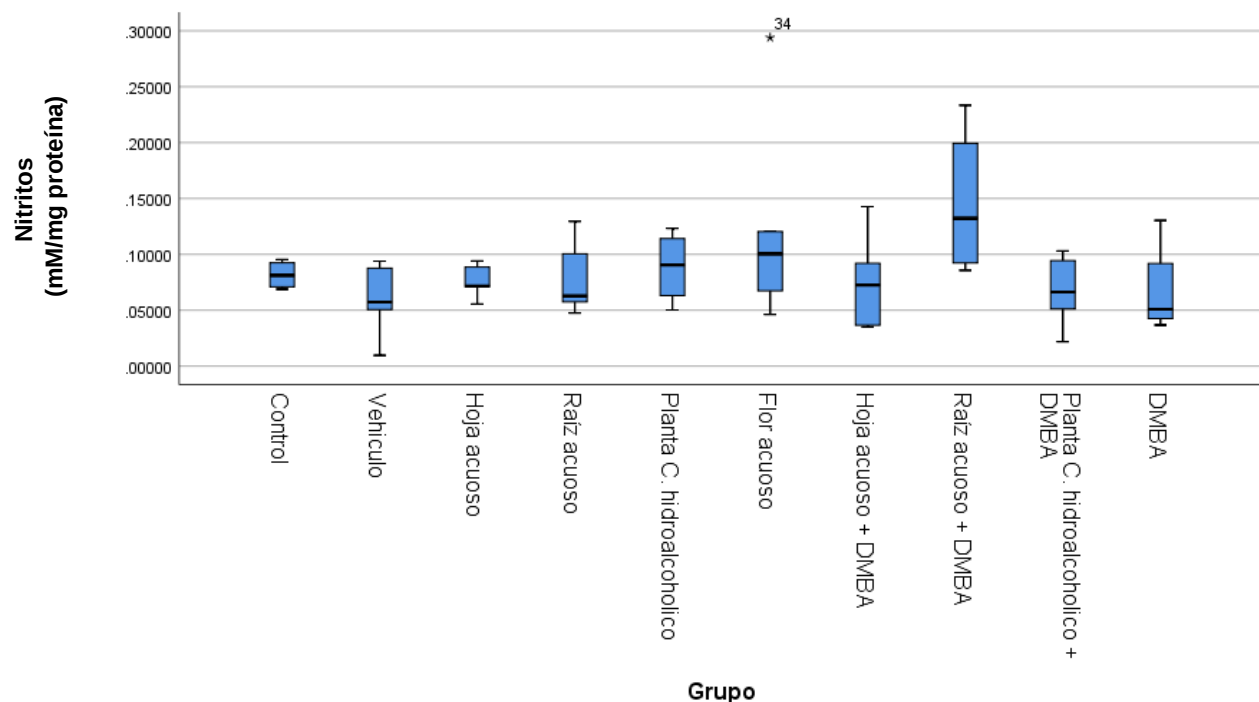


Figura 7. Efecto de los extractos de *Hyptis verticillata* Jacq. sobre la concentración de nitritos en homogenado de hígado de ratones hembra de la cepa CD-1. La concentración de nitritos se expresó en mM/mg proteína. El criterio de diferencia estadísticamente significativa (*) se fijó en $p < 0.05$.

7.7 Actividad de catalasa en plasma sanguíneo y homogenado de hígado de ratones CD-1

En plasma sanguíneo, no se observó diferencia significativa en la actividad de catalasa en los grupos de condición normal y tratados con extracto respecto al control (Fig. 8). Por otra parte, en condiciones carcinogénicas, el extracto de planta completa hidroalcohólico mostró una disminución significativa en la actividad de catalasa respecto al grupo DMBA, el extracto de raíz también disminuyó la actividad enzimática en esta condición (Fig. 8).

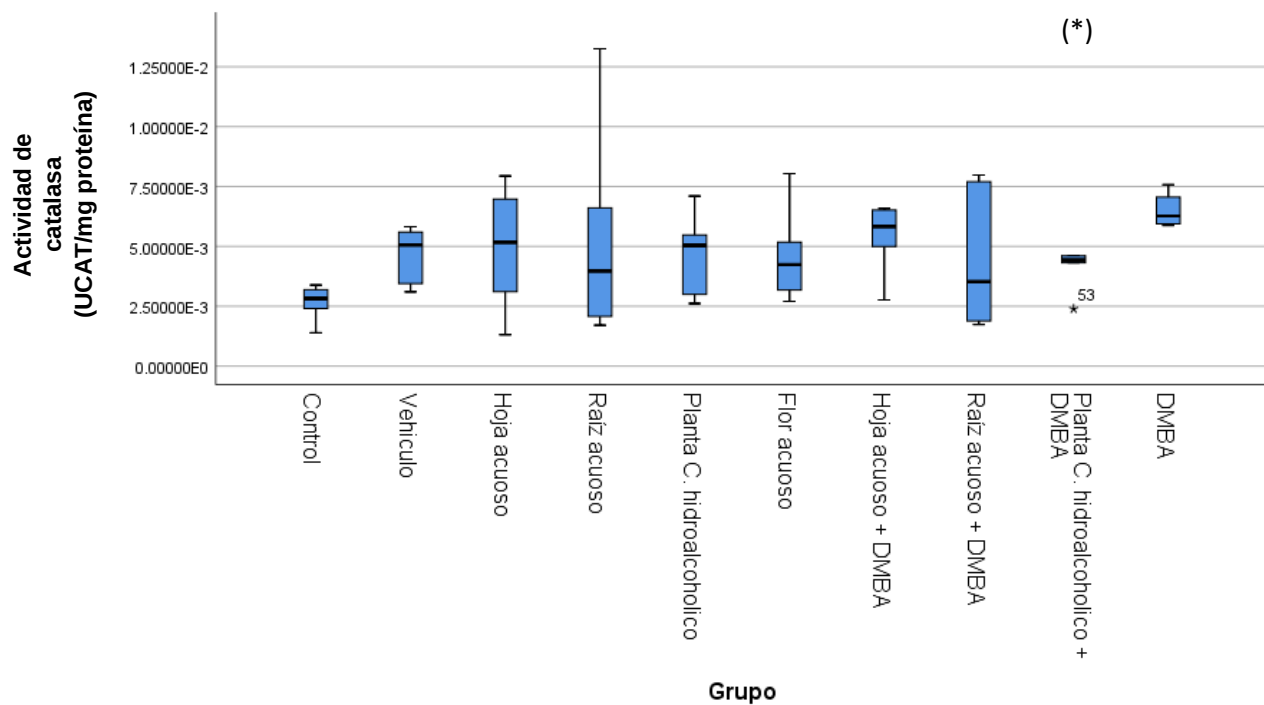


Figura 8. Efecto de los extractos de *Hyptis verticillata* Jacq. sobre la actividad enzimática de catalasa en plasma sanguíneo de ratones hembra de la cepa CD-1. La actividad de catalasa se expresó en UCAT/mg de proteína. El criterio de diferencia estadísticamente significativa (*) se fijó en $p < 0.05$.

En homogenado de hígado, los grupos de ratones en condiciones normales y tratados con los extractos no mostraron diferencias significativas en la actividad enzimática de catalasa respecto al grupo control, aunque se puede observar un aumento en la actividad de catalasa en los tratamientos acuosos de hoja y raíz en tal condición. (Fig. 9). En condiciones carcinogénicas, los grupos de planta completa hidroalcohólico y raíz acuoso disminuyeron la actividad de catalasa respecto al grupo DMBA (Fig. 9).

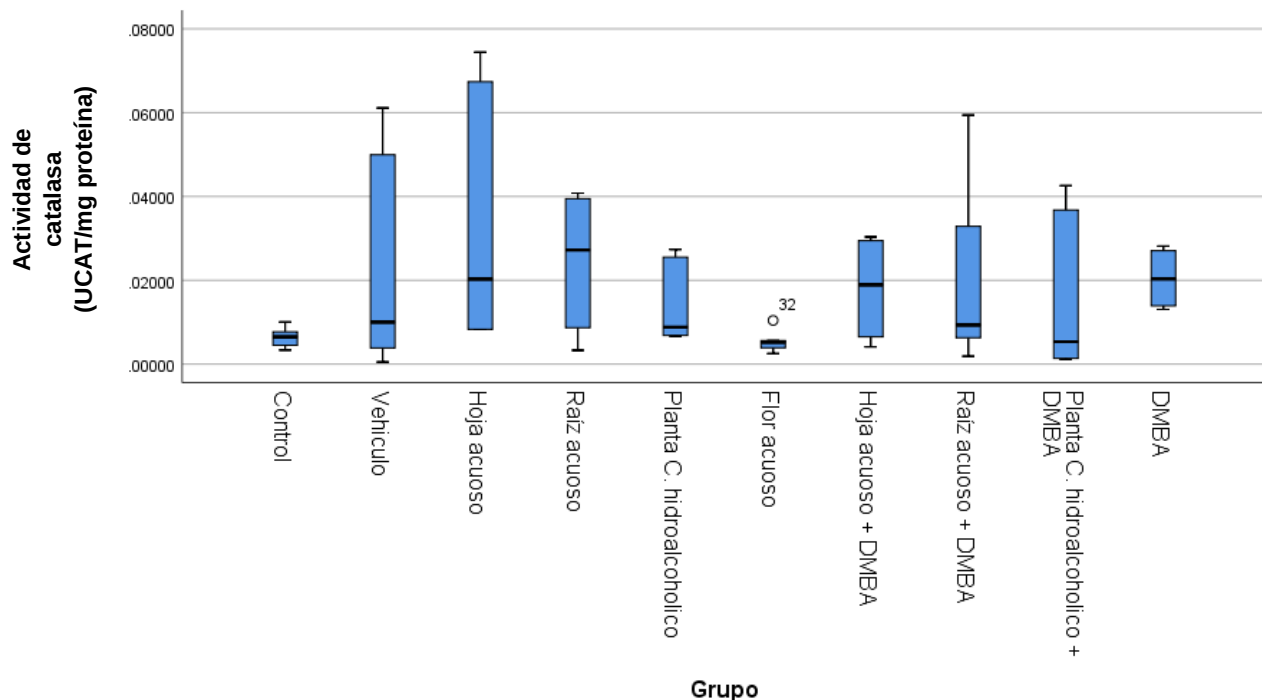


Figura 9. Efecto de los extractos de *Hyptis verticillata* Jacq. sobre la actividad enzimática de catalasa en homogenado de hígado de ratones hembra de la cepa CD-1. La actividad de catalasa se expresó en UCAT/mg de proteína. El criterio de diferencia estadísticamente significativa (*) se fijó en $p < 0.05$.

7.8 Cuantificación de peroxidación lipídica en plasma sanguíneo y homogenado de hígado de ratones CD-1

En plasma sanguíneo, en condiciones normales, los grupos tratados con extractos no mostraron diferencias significativas en los valores de MDA respecto al grupo control (Fig. 10). Por otra parte, el extracto de planta hidroalcohólico en ratones con inducción de cáncer aumentó la concentración de MDA de manera significativa respecto al grupo DMBA (Fig. 10). También, los tratamientos acuosos de raíz y hoja, en la misma condición, aumentaron la concentración de MDA (Fig. 10).

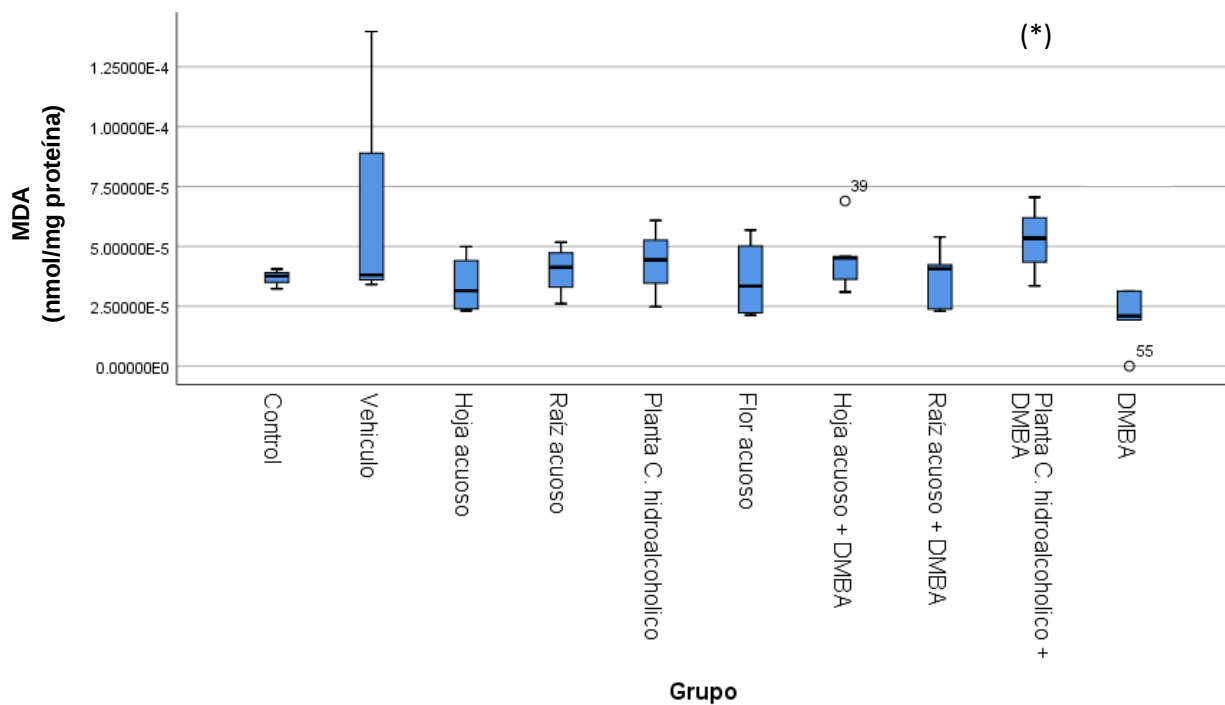


Figura 10. Efecto de los extractos de *Hyptis verticillata* Jacq. sobre la concentración de MDA en plasma sanguíneo de ratones hembra de la cepa CD-1. La concentración de MDA se expresó en nmol/mg proteína. El criterio de diferencia estadísticamente significativa (*) se fijó en $p < 0.05$.

En homogenado de hígado, en condiciones normales, los grupos con tratamiento de extracto no mostraron diferencias significativas en los valores de MDA respecto al grupo control (Fig. 11). Por otra parte, en condiciones carcinogénicas, el extracto acuoso de hoja y el extracto hidroalcohólico de planta completa disminuyeron de forma significativa la concentración de MDA respecto al grupo DMBA (Fig. 11).

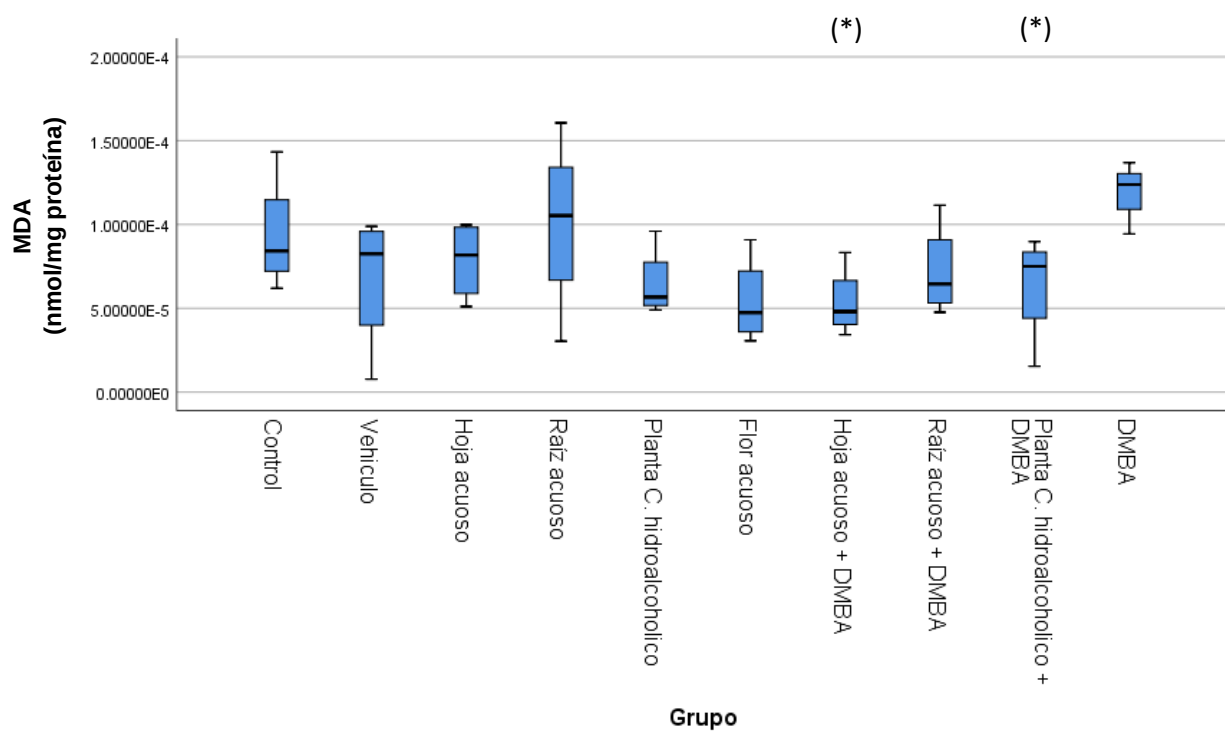


Figura 11. Efecto de los extractos de *Hyptis verticillata* Jacq. sobre la concentración de MDA en homogenado de hígado de ratones hembra de la cepa CD-1. La concentración de MDA se expresó en nmol/mg proteína. El criterio de diferencia estadísticamente significativa (*) se fijó en $p < 0.05$.

8. Discusión de resultados

El conocimiento de las comunidades que coexisten con las especies medicinales resulta un pilar fundamental en la investigación y desarrollo de fármacos contra enfermedades que aquejan las sociedades (Zambrano et al., 2015). Mediante el registro etnobotánico de *Hyptis verticillata* Jacq. en la localidad de Limón Chiquito, Veracruz, se registraron diferentes usos de la especie de estudio en la comunidad. Se determinó el uso de *Hyptis verticillata* Jacq. en aspectos culturales y terapéuticos (Fig. 4). Terapéuticamente, *Hyptis verticillata* Jacq. es empleada en la comunidad en padecimientos tales como cólicos, gastritis y diabetes, destacando su uso contra el cáncer de mama (Fig. 4) (Tabla 3). En la literatura, se ha descrito el uso de *Hyptis verticillata* Jacq. en patologías de la piel, sistema músculo esquelético, sistema reproductor femenino, sistema respiratorio y tracto gastrointestinal (Picking et al., 2013), de manera que, *Hyptis* no cuenta con antecedentes directos en el tratamiento de cáncer de mama, sin embargo, se han sugerido propiedades anticancerígenas de fitoquímicos presentes en la especie (Picking et al., 2013). También, se ha descrito el uso de *Hyptis verticillata* Jacq. en desórdenes gastrointestinales en la región de Oaxaca, México (Heinrich et al., 1992), y su actividad en la diabetes, ya que por medio de extractos etanólicos es capaz de reducir los niveles de glucosa en sangre y de hemoglobina glucosilada en ratas diabéticas (Ogar et al., 2018). De manera que, esta información corrobora los usos terapéuticos de *Hyptis verticillata* Jacq. en la comunidad, por lo que *Hyptis verticillata* Jacq. puede ser considerada una especie de uso medicinal dentro de esta región.

Las partes empleadas de *Hyptis verticillata* Jacq. en la localidad son las hojas y la raíz (Tabla 3). De hecho, se ha reportado el uso de hojas de *Hyptis verticillata* Jacq. a manera de infusión en problemas gastrointestinales (Heinrich et al., 1992), mientras que la raíz es utilizada en padecimientos como vómito, asma y dolor de cuerpo (Alonso et al., 2012). No se determinaron contraindicaciones en el uso terapéutico de la especie en la localidad, sin embargo, se ha referido actividad abortiva (Coe, 2008), por lo que su utilización no es recomendable durante el embarazo. El uso de *Hyptis verticillata* Jacq. resulta de gran importancia en la salud de la comunidad, dada su fácil obtención y disposición, por ello, la información descrita abre un preámbulo en el interés científico para la validación de las propiedades atribuidas a esta especie.

Las especies del género *Hyptis*, son consideradas plantas medicinales con una fuente importante de metabolitos secundarios (Picking et al., 2013). De modo que, se generaron extractos orgánicos de *Hyptis verticillata* Jacq. para ser analizados. La cuantificación de azúcares totales de los extractos de *Hyptis verticillata* Jacq. por el método de Dubois mostró una mayor cantidad de azúcares totales presente en los extractos hidroalcohólicos en comparación con su correspondiente acuoso (misma parte de la planta), a excepción del extracto de planta completa (Fig. 5). La cantidad de azúcares presente en plantas se asocia con la biosíntesis de metabolitos secundarios (Murthy et al., 2014), lo que sugiere una mayor cantidad de metabolitos secundarios derivados de azúcares en los extractos hidroalcohólicos, como aquellos metabolitos secundarios derivados de la ruta del ácido shikímico (Tabla 7).

Existen pocos reportes del perfil fitoquímico de *Hyptis verticillata* Jacq., se ha documentado la presencia y el aislamiento de metabolitos secundarios como: alcaloides, flavonoides, esteroides, y polifenoles (Picking et al., 2013). Atendiendo estas consideraciones, el tamizaje fitoquímico de los extractos de *Hyptis verticillata* Jacq. permitió la identificación de 7 grupos de metabolitos secundarios presentes tanto en los extractos acuosos (Tabla 5) como en los extractos hidroalcohólicos (Tabla 6). Destacando la presencia de: cumarinas, glicósidos cardiotónicos, saponinas y taninos, grupos que no han sido determinados dentro del perfil fitoquímico de *Hyptis verticillata* Jacq. Asimismo, se corroboró la presencia de: alcaloides, esteroides y polifenoles; identificados en otras investigaciones. Por lo que el presente estudio puede contribuir a una mayor caracterización del perfil fitoquímico de *Hyptis verticillata* Jacq.

Dentro de este marco, se evaluó el potencial antioxidante de los extractos de *Hyptis verticillata* Jacq. mediante la medición de marcadores de estrés oxidativo (nitritos, actividad de catalasa y peroxidación lipídica) en grupos de ratones hembra de la cepa CD-1.

El estrés oxidativo contribuye al desarrollo del cáncer. Se ha determinado que concentraciones elevadas de especies reactivas pueden llegar a inducir apoptosis en las células malignas, mientras que concentraciones bajas podrían favorecer la progresión cancerígena al inducir alteraciones epigenéticas y senescencia (Gorrini et al., 2013). En complemento, durante el desarrollo de cáncer, después de la transición epitelio mesénquima (EMT), las altas concentraciones de óxido nítrico (NO) y las bajas concentraciones de ROS mantienen la homeostasis de las células tumorales. Posteriormente, estos niveles se invierten después de la transición mesénquima epitelio (MET) una vez establecidas las células malignas en el sitio metastásico (Monteiro et al., 2019). Los nitritos en estrés oxidativo son producto del metabolismo de NO. En la presente tesis, se determinaron valores menores de concentración de nitritos en los grupos de ratones sometidos al carcinógeno DMBA respecto al grupo control (valores normales) (Fig. 6) lo que puede ser explicado por los procesos anteriormente descritos. De este modo, se sugiere una condición de estrés oxidativo presente en los grupos de ratones DMBA.

En plasma sanguíneo, la concentración de nitritos en los grupos de ratones sometidos al agente carcinogénico DMBA y tratados con los extractos de *Hyptis verticillata* Jacq. (raíz acuoso, hoja acuoso, planta completa hidroalcohólico) no presentó diferencias significativas respecto al grupo control DMBA, sin embargo, los extractos acuosos de hoja y raíz, y el extracto hidroalcohólico de planta completa aumentaron la concentración de nitritos en esta condición (Fig. 6), también, raíz acuoso en homogenado de hígado (Fig. 7). Se ha descrito que algunos de los grupos de metabolitos secundarios previamente determinados y cuantificados en los extractos (Tabla 7) podrían intervenir en esta regulación de nitritos. De hecho, las concentraciones de alcaloides presentes en los tratamientos (extractos) (Hoja Acuoso - 0.58 mg/mL, Raíz Acuoso - 0.71 mg/mL, Planta Completa Hidroalcohólico - 0.97 mg/mL), podrían modular esta respuesta. Por ejemplo, un fármaco obtenido de la rama de morera a base de polihidroxicalconoides regula el estrés nitrosativo en ratas diabéticas (Li et al., 2023). Además, diversos estudios han

documentado el potencial regulatorio sobre el estrés oxidativo de glicósidos cardiotónicos (Hoja Acuoso - 0.17 mg/mL, Raíz Acuoso - 0.008 mg/mL, Planta Completa Hidroalcohólico - 0.007 mg/mL) en otros tipos de cáncer, como en el cáncer de próstata a través de la administración de ouabaína en células PC-3 induciendo una producción sostenida de ROS y apoptosis (Huang et al., 2004), y también, en cáncer de hígado por medio de lanatósido C que induce estrés oxidativo alterando las vías ERK y Akt y una consecuente estimulación de la apoptosis (Durmaz et al., 2016). También, se ha demostrado la regulación de estrés oxidativo de polifenoles (Hoja Acuoso - 0.001 mg/mL, Raíz Acuoso - 0.008 mg/mL, Planta Completa Hidroalcohólico - 0.008 mg/mL) en una amplia gama de cánceres, incluyendo el cáncer de mama. La biochanina A, un isoflavonoide purificado del trébol rojo (*Trifolium pratense*) mostró actividad preventiva contra el cáncer de mama aumentando los niveles de actividad enzimática de SOD, CAT, GPx, GST y DT-diaforasa (DTD), y con una reducción en la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) y peroxidación lipídica (LPO) en ratas prepúberes con una exposición a agentes cancerígenos mamarios (Mishra et al., 2008). Asimismo, los taninos (Hoja Acuoso - 0.036 mg/mL, Raíz Acuoso - 0.025 mg/mL, Planta Completa Hidroalcohólico - 0.043 mg/mL) como el ácido tánico presentan actividad anticancerígena en cáncer de piel de ratón, a través de la reducción del estrés oxidativo, proteína COX-2, iNOS, PCNA (antígeno nuclear de células proliferantes) y citocinas proinflamatorias como IL-6 (Majed et al., 2015). Por último, las saponinas triterpenoides (Hoja Acuoso - 6.145 mg/mL, Raíz Acuoso - 12.656 mg/mL, Planta Completa Hidroalcohólico - 5.260 mg/mL) de *Ardisia gigantifolia* causan la muerte celular en células de cáncer de mama triple negativo al aumentar la generación de especies reactivas de oxígeno, activar ERK y AKT e inducir la apoptosis a través de la vía intrínseca (Mu et al., 2020). En general, puede sugerirse un papel prooxidante de los metabolitos secundarios presentes en los extractos dado que aumentan los valores de especies reactivas en esta condición, sin embargo, como se mencionó, algunos metabolitos también presentan capacidades antioxidantes que pueden contribuir a evitar el desarrollo de la malignidad celular, por lo que resulta importante realizar estudios adicionales que complementen dicha información.

En lo que respecta a la actividad de catalasa, esta aumento en los organismos bajo la administración del agente carcinogénico respecto al grupo control (valores normales) (Fig. 8) (Fig. 9), ya que degrada O_2 y descompone H_2O_2 , disminuyendo así las elevadas cantidades de ROS tras la inducción cancerígena. Como respuesta adaptativa, la actividad de catalasa disminuye al regularizarse ROS. Se ha establecido, que las células malignas sobreviven al estallido oxidativo regulando positivamente el sistema de defensa antioxidante (Sznarkowska et al., 2016), lo que podría sugerir una mayor actividad de la enzima catalasa en los organismos bajo proceso carcinogénico mamario.

En plasma sanguíneo, en condiciones carcinogénicas, el extracto de planta completa hidroalcohólico mostró una disminución significativa en los valores de la actividad de catalasa respecto al grupo control DMBA, también el extracto de raíz acuoso disminuyó la actividad enzimática en esta condición (Fig. 8). En homogenado de hígado, en condiciones carcinogénicas, los extractos de planta completa hidroalcohólico y raíz acuoso disminuyeron la actividad de catalasa respecto al grupo DMBA (Fig. 9). Se ha

reportado que el bloqueo de los sistemas de defensa antioxidante de las células cancerosas aumenta el daño oxidativo inducido por ROS, lo que provoca la muerte de las células cancerosas mediante apoptosis (Sznarkowska et al., 2016). Así, se ha demostrado que el Farnesiferol C un tipo de cumarina sesquiterpénica (Planta Completa Hidroalcohólico - 0.002 mg/mL, Raíz Acuoso – 0.001 mg/mL) presenta actividad inhibitoria sobre catalasa hepática bovina mediante inhibición de tipo mixto (Yekta et al., 2018). También, los flavonoides un tipo de polifenoles (Planta Completa Hidroalcohólico - 0.008 mg/mL, Raíz Acuoso – 0.008 mg/mL), tienen efecto inhibidor sobre catalasa, siendo la estructura de los flavonoles más favorable en cuanto a afinidad de unión a catalasa y propiedades inhibitoras (Majumder et al., 2017). Por lo tanto, los grupos de metabolitos secundarios presentes en los extractos de planta hidroalcohólico y raíz acuosos podrían intervenir en la respuesta inhibitoria de catalasa en ratones con inducción cancerígena mamaria según lo anteriormente descrito.

Finalmente, se evaluó la concentración de malondialdehído (MDA) en los grupos de ratones. La lipoperoxidación implica la conversión de ácidos grasos poliinsaturados a peróxidos de lípidos o MDA como producto principal (Mylonas & Kouretas, 1999). En condiciones de carcinogénesis, el extracto de planta completa hidroalcohólico aumentó la concentración de MDA de manera significativa respecto al grupo DMBA, en plasma sanguíneo (Fig. 10). Esta respuesta proporciona un efecto prooxidante, otorgado posiblemente por la producción sostenida de ROS por metabolitos como glicósidos cardiotónicos (Planta Completa Hidroalcohólico – 0.007 mg/mL) (Huang et al., 2004) y saponinas (Planta Completa Hidroalcohólico - 5.260 mg/mL) (Mu et al., 2020). Contrariamente, el extracto acuoso de hoja, y el extracto hidroalcohólico de planta completa disminuyeron de forma significativa la concentración de MDA en los organismos con inducción de cáncer en comparación con el grupo DMBA, en homogenado de hígado (Fig. 11). Se ha descrito que, taninos (Hoja acuoso - 0.036 mg/mL, Planta Completa Hidroalcohólico – 0.043 mg/mL) como el ácido tánico, atenúan la formación de MDA, lo que sugiere un fuerte potencial antioxidante (Hong et al., 1995). Asimismo, las saponinas (Hoja Acuoso - 6.145 mg/mL, Planta Completa Hidroalcohólico - 5.260 mg/mL) de los frutos de *Solanum anguivi* (SAS) redujeron significativamente el nivel de malondialdehído sérico y hepático en ratas normales (Elekofehinti et al., 2012). En este sentido, *Hyptis verticillata* Jacq. al ser una fuente de metabolitos secundarios con potencial uso como agentes antioxidantes puede ayudar a prevenir y retardar el daño oxidativo y, por lo tanto, enfermedades consecuentes. No obstante, en condiciones cancerígenas, el tratamiento de planta completa hidroalcohólico de *Hyptis verticillata* Jacq. parece ejercer una respuesta prooxidante más completa al aumentar los valores de nitritos, inhibir la actividad de catalasa y aumentar la concentración de MDA en las muestras de plasma sanguíneo. Esta respuesta podría favorecer efectos anticancerígenos como la activación de vías apoptóticas. Las afirmaciones anteriores reflejan la importancia que representan estos grupos fitoquímicos en un prometedor papel terapéutico contra diversas enfermedades. De manera que, es fundamental la realización de estudios complementarios enfocados en la caracterización y aislamiento de compuestos fitoquímicos de *Hyptis verticillata* Jacq. que permitan brindar un panorama mayor del papel de *Hyptis verticillata* Jacq. en cáncer de mama. Así, *Hyptis verticillata* Jacq. puede considerarse una especie con capacidad de

modular el estrés oxidativo presente en ratones hembras CD-1 con inducción cancerígena mamaria.

La presente tesis permite tener un antecedente de cómo los metabolitos secundarios presentes en los extractos de *Hyptis verticillata* Jacq. actúan en la regulación de estrés oxidativo en ratones de la cepa CD-1 con inducción de cáncer de mama.

El conocimiento científico de *Hyptis verticillata* Jacq. puede proporcionar ayuda al desarrollo de las preparaciones medicinales locales, respecto a eficacia, seguridad, y uso sustentable de la especie, por lo que la variabilidad geográfica y medioambiental y su impacto en los niveles de fitoquímicos son también áreas de investigación.

9. Conclusiones

- *Hyptis verticillata* Jacq. es una especie de uso medicinal dentro de la región de Limón Chiquito, Veracruz, México.
- Se identificaron 7 grupos de metabolitos secundarios presentes en *Hyptis verticillata* Jacq.: alcaloides, esteroides y polifenoles, identificados en otras investigaciones, y cumarinas, glicósidos cardiotónicos, saponinas y taninos, grupos no determinados dentro del perfil fitoquímico en extractos acuosos e hidroalcohólicos.
- Las saponinas son el grupo de metabolitos secundarios con la concentración más elevada determinada, tanto en extractos acuosos como hidroalcohólicos de *Hyptis verticillata* Jacq.
- El tratamiento de planta completa hidroalcohólico de *Hyptis verticillata* Jacq. sugiere una respuesta prooxidante al aumentar los valores de nitritos, inhibir la actividad de catalasa y aumentar las cantidades de MDA presentes en las muestras de plasma sanguíneo de ratones con inducción de cáncer de mama.

10. Referencias

- Abrego, C. A., & Honles, J. (2012). Identificación, cuantificación y determinación de la actividad citotóxica de los glucósidos cardiotónicos procedentes de las raíces y flores de plumeria rubra (flor de mayo), stemmadenia donnell-smithii (cojon de puerco) y thevetia ahouia (cojon de costa de hojas largas) de la familia apocynaceae [Bachelor, Universidad de El Salvador]. <https://oldri.ues.edu.sv/id/eprint/2048/>
- Adames, H., Solís, J. P., Müller, A., & Galleguillos, M. (2009). Determinación de nitrito como metabolito estable del óxido nítrico en el líquido sinovial de articulación metacarpofalángica equina. *Archivos de medicina veterinaria*, 41(3), 255–259. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2009000300010>
- Agostini-Costa, T., Vieira, R., Bizzo, H., Silveira, D., & Gimenes, M. (2012). Secondary Metabolites. <https://doi.org/10.5772/35705>
- Alhasawi, A., Legendre, F., Jagadeesan, S., Appanna, V., & Appanna, V. (2019). Chapter 10 - Biochemical Strategies to Counter Nitrosative Stress: Nanofactories for Value-Added Products. En S. Das & H. R. Dash (Eds.), *Microbial Diversity in the Genomic Era* (pp. 153–169). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814849-5.00010-1>
- Alonso, A., Jose Maldonado-Miranda, J., Zarate-Martinez, A., Jacobo-Salcedo, M. del R., Fernández-Galicia, C., Alejandro Figueroa-Zuñiga, L., Abel Rios-Reyes, N., Angel de León-Rubio, M., Andrés Medellín-Castillo, N., Reyes-Munguia, A., Méndez-Martínez, R., & Carranza-Alvarez, C. (2012). Medicinal plants used in the Huasteca Potosina, México. *Journal of Ethnopharmacology*, 143(1), 292–298. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.06.035>
- Al-thoubaity, F. K. (2020). Molecular classification of breast cancer: A retrospective cohort study. *Annals of Medicine and Surgery*, 49, 44–48. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2019.11.021>
- Amarowicz, R. (2007). Tannins: The new natural antioxidants? *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109, 549–551. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200700145>
- Andersen, O. M., & Markham, K. R. (Eds.). (2005). *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420039443>
- Arroyo, J., Bonilla, P., Ráez, E., Barreda, A., & Huamán, O. (2010). Efecto quimioprotector de *Bidens pilosa* en el cáncer de mama inducido en ratas. *Anales de la Facultad de Medicina*, 71, 153–160. <https://doi.org/10.15381/anales.v71i3.88>
- Bautista, M. K. D. (2015). Perspectiva actual de los polifenoles en México. *Entretexos*, 7(21), Article 21. <https://doi.org/10.59057/iberoleon.20075316.201521404>
- Bilbao, M. del R. (1997). *Análisis fitoquímico preliminar: Química de productos naturales* (Primera edición). Universidad del Quindío.
- Brieger, K., Schiavone, S., Miller, F. J., & Krause, K.-H. (2012). Reactive oxygen species: From health to disease. *Swiss Medical Weekly*, 142, w13659. <https://doi.org/10.4414/smw.2012.13659>

- Cadenas, E., & Davies, K. J. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology & Medicine*, 29(3–4), 222–230. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(00\)00317-8](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(00)00317-8)
- Calderón, J. M., Burgos Morón, E., & López Lázaro, M. (2013). The Cardiac Glycosides Digitoxin, Digoxin and Ouabain Induce a Potent Inhibition of Glycolysis in Lung Cancer Cells. <https://idus.us.es/handle/11441/53613>
- Carmo, M. do, da Silva Santos Oliveira, A. S., da Silva, L. A. A., Primo, M. G. S., & de Carvalho Lira, V. B. (2022). Biological Indicators of Oxidative Stress [Malondialdehyde, Catalase, Glutathione Peroxidase, and Superoxide Dismutase] and Their Application in Nutrition. En V. B. Patel & V. R. Preedy (Eds.), *Biomarkers in Nutrition* (pp. 833–856). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-031-07389-2_49
- Carvajal, L., Sierra, N., Hata Uribe, Y., & Rueda, D. (2009). Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de Cupatá (*Strychnos schultesiana* Krukoff). *Revista Colombia Forestal*, 12, 161. <https://doi.org/10.14483/udistrital.jour.colomb.for.2009.1.a11>
- Catherine Sánchez, N. (2013). Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cáncer. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 24(4), 553–562. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(13\)70659-X](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(13)70659-X)
- Clarke, R. (1997). Issues in experimental design and endpoint analysis in the study of experimental cytotoxic agents in vivo in breast cancer and other models. *Breast Cancer Research and Treatment*, 46(2–3), 255–278. <https://doi.org/10.1023/a:1005938428456>
- Coe, F. G. (2008). Rama midwifery in eastern Nicaragua. *Journal of Ethnopharmacology*, 117(1), 136–157. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.01.027>
- CONABIO. (2024). Hyptis verticillata—Ficha informativa. <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/lamiaceae/hyptis-verticillata/fichas/ficha.htm>
- Cooper, G. M. (2000). The Development and Causes of Cancer. En *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sinauer Associates. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>
- De la Garza, J. G., & Juárez, P. (2013). El cáncer (J. Ancer Rodríguez, R. G. Garza Rivera, R. Villareal Elizondo, M. C. Salinas Carmona, & C. J. Garza Acuña, Eds.; 8; Número 8). Universidad Autónoma de Nuevo León. <http://cienciaactualcance.uanl.mx/>
- Desai, S., Desai, D. G., & Kaur, H. (2009). Saponins and their biological activities. *Pharma Times*, 41, 13–16.
- Devi, G. R., Allensworth, J. L., Evans, M. K., & Sauer, S. J. (2014). Chapter 1—The Role of Oxidative Stress in Breast Cancer. En V. Preedy (Ed.), *Cancer* (pp. 3–14). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405205-5.00001-5>
- Domínguez, X. A. (1988). *Métodos de investigación fitoquímica*. Editorial Limusa.
- DuBois, M., A., E., Hamilton, J. K., Rebers, P., & Smith, F. (2002). Calorimetric Dubois Method for Determination of Sugar and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>

- Durmaz, I., Guven, E. B., Ersahin, T., Ozturk, M., Calis, I., & Cetin-Atalay, R. (2016). Liver cancer cells are sensitive to Lanatoside C induced cell death independent of their PTEN status. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 23(1), 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2015.11.012>
- Elekofehinti, O., Adanlawo, I., Fakoya, A., Saliu, J., & Shodehinde, S. (2012). Saponins from *Solanum anguivi* fruits exhibit antioxidant potential in Wistar rats. *Annals of Biological Research*.
- Fernald, K., & Kurokawa, M. (2013). Evading apoptosis in cancer. *Trends in cell biology*, 23(12), 620–633. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.07.006>
- García, D. E. (2004). Principales factores antinutricionales de las leguminosas forrajeras y sus formas de cuantificación. *Pastos y Forrajes*, 27(2), Article 2.
- Gaweł, S., Wardas, M., Niedworok, E., & Wardas, P. (2004). Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. *Wiadomosci Lekarskie (Warsaw, Poland: 1960)*, 57(9–10), 453–455.
- German, V. F. (1971). Isolation and characterization of cytotoxic principles from *Hyptis verticillata* jacq. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 60(4), 649–650. <https://doi.org/10.1002/jps.2600600442>
- Gonzalez-Angulo, A. M., Morales-Vasquez, F., & Hortobagyi, G. N. (2007). Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 608, 1–22. https://doi.org/10.1007/978-0-387-74039-3_1
- Gorrini, C., Harris, I. S., & Mak, T. W. (2013). Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 12(12), 931–947. <https://doi.org/10.1038/nrd4002>
- Güçlü-Ustündağ, O., & Mazza, G. (2007). Saponins: Properties, applications and processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(3), 231–258. <https://doi.org/10.1080/10408390600698197>
- Guirimand, G., Courdavault, V., St-Pierre, B., & Burlat, V. (2010). Biosynthesis and Regulation of Alkaloids. En *Plant developmental biology-biotechnological perspectives*, (Vol. 2, pp. 139–160). https://doi.org/10.1007/978-3-642-04670-4_8
- Hamada, T., White, Y., Nakashima, M., Oiso, Y., Fujita, M. J., Okamura, H., Iwagawa, T., & Arima, N. (2012). The Bioassay-Guided Isolation of Growth Inhibitors of Adult T-Cell Leukemia (ATL), from the Jamaican Plant *Hyptis verticillata*, and NMR Characterization of Hyptoside. *Molecules*, 17(8), 9931–9938. <https://doi.org/10.3390/molecules17089931>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., & Cardoso, F. (2019). Breast cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>
- Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481–504. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00235-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00235-1)

- Hassanpour, S., Maheri-Sis, N., Eshratkhah, B., & baghbani mehmandar, F. (2011). Plants and secondary metabolites (Tannins): A Review. *Int. J. Forest, Soil and Erosion*, 1, 47–53.
- Heinrich, M., Rimpler, H., & Barrera, N. A. (1992). Indigenous phytotherapy of gastrointestinal disorders in a lowland Mixe community (Oaxaca, Mexico): Ethnopharmacologic evaluation. *Journal of Ethnopharmacology*, 36(1), 63–80. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(92\)90062-v](https://doi.org/10.1016/0378-8741(92)90062-v)
- Hernández, Á., Iglesias, R., Alonso, N., Calvo, B., & Martin-Gil, F. J. (2006). Síntesis e implicaciones fisiológicas del óxido nítrico. *Revista electrónica Diagnóstico in vitro*, 4/76.
- Hinojosa, J., Gutiérrez Lomelí, M., Siller López, F., Rodríguez Sahagún, A., Morales Del Río, J. A., Guerrero Medina, P. J., & Toro Sánchez, C. L. del. (2013). Screening fitoquímico y capacidad antiinflamatoria de hojas de *tithonia tubaeformis*. *Biotecnia*, 15(2), 53–60.
- Hong, C. Y., Wang, C. P., Huang, S. S., & Hsu, F. L. (1995). The inhibitory effect of tannins on lipid peroxidation of rat heart mitochondria. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 47(2), 138–142. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1995.tb05766.x>
- Huang, Y.-T., Chueh, S.-C., Teng, C.-M., & Guh, J.-H. (2004). Investigation of ouabain-induced anticancer effect in human androgen-independent prostate cancer PC-3 cells. *Biochemical Pharmacology*, 67(4), 727–733. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2003.10.013>
- Hussain, M. I., Qamar Abbas, S., & Reigosa, M. J. (2018). Activities and Novel Applications of Secondary Metabolite Coumarins. *Planta Daninha*, 36, e018174040. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582018360100016>
- INEGI. (2024). Estadísticas a propósito del Día Mundial contra el Cáncer. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. INEGI. <https://www.inegi.org.mx/app/saladeprensa/noticia.html?id=8823>
- Jiménez, C. I. E., Martínez, E. Y. C., & Fonseca, J. G. (2009). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Revista de la Facultad de Medicina*, 52(002), Article 002. <https://revistas.unam.mx/index.php/rfm/article/view/14770>
- Jones, D. P. (2008). Radical-free biology of oxidative stress. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 295(4), C849–C868. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00283.2008>
- Julkunen-Tiitto, R. (1985). Chemotaxonomical screening of phenolic glycosides in northern willow twigs by capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 324, 129–139. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)81312-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)81312-1)
- Khandrika, L., Kumar, B., Koul, S., Maroni, P., & Koul, H. K. (2009). Oxidative stress in prostate cancer. *Cancer Letters*, 282(2), 125–136. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.12.011>
- Khazaei, M., Akbaribazm, M., Naseri, L., & Khazaei, M. (2018). METHODS OF INDUCING BREAST CANCER IN ANIMAL MODELS: A SYSTEMATIC REVIEW WCRJ 2018; 5 (4): e1182. 5, 1182.

Klaunig, J. E., Xu, Y., Isenberg, J. S., Bachowski, S., Kolaja, K. L., Jiang, J., Stevenson, D. E., & Walborg, E. F. (1998). The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*, 106(Suppl 1), 289–295.

Kuhnt, M., Pröbstle, A., Rimpler, H., Bauer, R., & Heinrich, M. (1995). Biological and pharmacological activities and further constituents of *Hyptis verticillata*. *Planta Medica*, 61(3), 227–232. <https://doi.org/10.1055/s-2006-958061>

Kumar, P., & Upadhyaya, K. (2012). Tannins are Astringent. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1(3), 45–50.

Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, 2013, 162750. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>

Lester, J. (2007). Breast cancer in 2007: Incidence, risk assessment, and risk reduction strategies. *Clinical Journal of Oncology Nursing*, 11(5), 619–622. <https://doi.org/10.1188/07.CJON.619-622>

Li, C., Liu, Q., Ji, W., Fu, Y., Cao, H., Huan, Y., Lei, L., Gao, X., Chen, L., Feng, C., Zhang, L., Li, P., Liu, Y., Liu, S., & Shen, Z. (2023). New anti-diabetic drug *Morus alba* L. (Sangzhi) alkaloids (SZ-A) improves diabetic nephropathy through ameliorating inflammation and fibrosis in diabetic rats. *Frontiers in Medicine*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1164242>

Lundberg, J. O., Weitzberg, E., & Gladwin, M. T. (2008). The nitrate–nitrite–nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(2), 156–167. <https://doi.org/10.1038/nrd2466>

Lutz, W. K., & Fekete, T. (1996). Endogenous and exogenous factors in carcinogenesis: Limits to cancer prevention. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 68(2), 120–125. <https://doi.org/10.1007/BF00381244>

Maehly, A. C., & Chance, B. (1954). The assay of catalases and peroxidases. *Methods of Biochemical Analysis*, 1, 357–424. <https://doi.org/10.1002/9780470110171.ch14>

Mahesha, H. B. (2012). Estimation of protein by biuret method.

Majed, F., Rashid, S., Khan, A. Q., Nafees, S., Ali, N., Ali, R., Khan, R., Hasan, S. K., Mehdi, S. J., & Sultana, S. (2015). Tannic acid mitigates the DMBA/croton oil-induced skin cancer progression in mice. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 399(1–2), 217–228. <https://doi.org/10.1007/s11010-014-2248-3>

Majumder, D., Das, A., & Saha, C. (2017). Catalase inhibition an anti cancer property of flavonoids: A kinetic and structural evaluation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 929–935. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.100>

Manghwar, H., Hussain, A., Ali, Q., & Liu, F. (2022). Brassinosteroids (BRs) Role in Plant Development and Coping with Different Stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1012. <https://doi.org/10.3390/ijms23031012>

Manning, H. C., Buck, J. R., & Cook, R. S. (2016). Mouse Models of Breast Cancer: Platforms for Discovering Precision Imaging Diagnostics and Future Cancer Medicine.

Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine, 57 Suppl 1(Suppl 1), 60S-8S. <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.157917>

Martínez, M., Bedolla-García, B., Cornejo-Tenorio, G., Fragoso-Martínez, I., García-Peña, M. del R., González-Gallegos, J. G., Lara-Cabrera, S. I., & Zamudio, S. (2017). Lamiaceae de México. *Botanical Sciences*, 95(4), Article 4. <https://doi.org/10.17129/botsci.1871>

Martínez, M., Fragoso-Martínez, I., García-Peña, M. del R., & Montiel, O. (2013). Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo. *Revista mexicana de biodiversidad*, 84(1), 30–86. <https://doi.org/10.7550/rmb.30158>

Martínez, S., González-Gallego, J., Culebras, J., & Tuñón, J. (2002). Los flavonoides: Propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp*, 17.

Matsuura, H. N., & Fett-Neto, A. G. (2015). Plant Alkaloids: Main Features, Toxicity, and Mechanisms of Action. En P. Gopalakrishnakone, C. R. Carlini, & R. Ligabue-Braun (Eds.), *Plant Toxins* (pp. 1–15). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6728-7_2-1

Mattiuzzi, C., & Lippi, G. (2019). Current Cancer Epidemiology. *Journal of Epidemiology and Global Health*, 9(4), 217–222. <https://doi.org/10.2991/jegh.k.191008.001>

McNeil, M., Facey, P., & Porter, R. (2011). Essential oils from the Hyptis genus—A review (1909-2009). *Natural Product Communications*, 6(11), 1775–1796.

Mercado, G., De la Rosa, L., Wall, A., Díaz, J., & Alvarez-Parrilla, E. (2013). Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México. *Nutrición Hospitalaria*, 28, 36–46.

Mishra, P., Kale, R. K., & Kar, A. (2008). Chemoprevention of mammary tumorigenesis and chemomodulation of the antioxidative enzymes and peroxidative damage in prepubertal Sprague Dawley rats by Biochanin A. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 312(1–2), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11010-008-9714-8>

Monteiro, H. P., Rodrigues, E. G., Amorim Reis, A. K. C., Longo, L. S., Ogata, F. T., Moretti, A. I. S., da Costa, P. E., Teodoro, A. C. S., Toledo, M. S., & Stern, A. (2019). Nitric oxide and interactions with reactive oxygen species in the development of melanoma, breast, and colon cancer: A redox signaling perspective. *Nitric Oxide*, 89, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2019.04.009>

Moo, T.-A., Sanford, R., Dang, C., & Morrow, M. (2018). Overview of Breast Cancer Therapy. *PET clinics*, 13(3), 339–354. <https://doi.org/10.1016/j.cpet.2018.02.006>

Morsy, N. (2017). Cardiac Glycosides in Medicinal Plants. <https://doi.org/10.5772/65963>

Mu, L.-H., Wang, L.-H., Yu, T.-F., Wang, Y.-N., Yan, H., Liu, P., & Yan, C. (2020). Triterpenoid Saponin AG8 from *Ardisia gigantifolia* stapf. Induces Triple Negative Breast Cancer Cells Apoptosis through Oxidative Stress Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, e7963212. <https://doi.org/10.1155/2020/7963212>

Muñoz, Ó. A., Torres-Aguirre, G. A., Núñez-Gastélum, J. A., Rosa, L. A. de la, Rodrigo-García, J., Ayala-Zavala, J. F., Álvarez-Parrilla, E., Muñoz-Bernal, Ó. A., Torres-Aguirre, G. A., Núñez-Gastélum, J. A., Rosa, L. A. de la, Rodrigo-García, J., Ayala-Zavala, J. F., &

- Álvarez-Parrilla, E. (2017). Nuevo acercamiento a la interacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con azúcares durante la cuantificación de polifenoles totales. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 20(2), 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2017.04.003>
- Murthy, H. N., Dandin, V. S., Zhong, J.-J., & Paek, K.-Y. (2014). Strategies for Enhanced Production of Plant Secondary Metabolites from Cell and Organ Cultures. En K.-Y. Paek, H. N. Murthy, & J.-J. Zhong (Eds.), *Production of Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology* (pp. 471–508). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9223-3_20
- Murube, E. M. (2014). Estrés oxidativo y respuestas fisiológicas a la acumulación de metales pesados en *Betula celtiberica* micorrizada y no micorrizada cultivada en un suelo contaminado [Master thesis]. <https://digibuo.uniovi.es/dspace/handle/10651/28018>
- Mylonas, C., & Kouretas, D. (1999). Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo* (Athens, Greece), 13(3), 295–309.
- Nawrot-Chorabik, K., Sulkowska, M., & Gumulak-Wołoszyn, N. (2022). Secondary Metabolites Produced by Trees and Fungi: Achievements So Far and Challenges Remaining. *Forests*, 13, 1338. <https://doi.org/10.3390/f13081338>
- Negi, J., Negi, P., Pant, G., Rawat, M., & Negi, S. (2013). Naturally occurring saponins: Chemistry and biology. <https://www.semanticscholar.org/paper/Naturally-occurring-saponins%3A-Chemistry-and-biology-Negi-Negi/8f4d77f476e8d886ebd874d02557cd3bd5dfcd62>
- Nielsen, S. S. (Ed.). (2010). *Food Analysis*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1478-1>
- Ogar, I., Egbung, G. E., Nna, V. U., Iwara, I. A., & Itam, E. (2018). Anti-hyperglycemic potential of *Hyptis verticillata* Jacq in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 107, 1268–1276. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.08.115>
- OMS. (2024, febrero 1). Crece la carga mundial de cáncer en medio de una creciente necesidad de servicios—OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud. <https://www.paho.org/es/noticias/1-2-2024-crece-carga-mundial-cancer-medio-creciente-necesidad-servicios>
- Osório, A., & Martins, J. (2004). Determinação de cumarina em extrato fluido e tintura de guaco por espectrofotometria derivada de primeira ordem. *Revista Brasileira De Ciencias Farmaceuticas - RBCF*, 40. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322004000400005>
- Patel, R. P., McAndrew, J., Sellak, H., White, C. R., Jo, H., Freeman, B. A., & Darley-Usmar, V. M. (1999). Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1411(2), 385–400. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(99\)00028-6](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(99)00028-6)
- Patlolla, A. K., Barnes, C., Yedjou, C., Velma, V. R., & Tchounwou, P. B. (2009). Oxidative Stress, DNA Damage, and Antioxidant Enzyme Activity Induced by Hexavalent Chromium in Sprague-Dawley Rats. *Environmental toxicology*, 24(1), 66–73. <https://doi.org/10.1002/tox.20395>

- Pérez, P. L., & Pérez, J. L. (2000). Métodos para medir el daño oxidativo. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 29(3), 192–198.
- Picking, D., Delgoda, R., Boulogne, I., & Mitchell, S. (2013). *Hyptis verticillata* Jacq: A review of its traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicology. *Journal of Ethnopharmacology*, 147(1), 16–41. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.01.039>
- Ralph, S. J., Rodríguez-Enríquez, S., Neuzil, J., Saavedra, E., & Moreno-Sánchez, R. (2010). The causes of cancer revisited: “mitochondrial malignancy” and ROS-induced oncogenic transformation - why mitochondria are targets for cancer therapy. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(2), 145–170. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2010.02.008>
- Ramos, E. F., Paz Varela, J. S., & Ortiz Sánchez, G. F. (2014). Determinación del contenido de hierro, saponinas y porfirinas en *Cassia grandis* L, procedente de Masaya, Chinandega y Jalapa durante el periodo mayo 2013, abril del 2014 [Thesis]. <http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/handle/123456789/3379>
- Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., & Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radical Biology & Medicine*, 49(11), 1603–1616. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>
- Ridnour, L., Thomas, D., Mancardi, D., Espey, M., Miranda, K., Paolocci, N., Feelisch, M., Fukuto, J., & Wink, D. (2004). The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. *Biological chemistry*, 385, 1–10. <https://doi.org/10.1515/BC.2004.001>
- Robineau, L. (1984). Encuesta sobre medicina tradicional popular en la zona rural de Zambrana y en la zona urbana marginal de Manganagua, Rep. Dominicana, noviembre 1984: Enquete sur la medecine traditionnelle populaire dans la zone rurale de Zambrana et dans la zone urbaine marginale de Manganagua, Rep. Dominicaine, novembre 1984. Université d'etat d'Haiti, TRAMIL.
- Rojas, A., Hernandez, L., Pereda-Miranda, R., & Mata, R. (1992). Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 35(3), 275–283. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(92\)90025-m](https://doi.org/10.1016/0378-8741(92)90025-m)
- Russo, J., Gusterson, B. A., Rogers, A. E., Russo, I. H., Wellings, S. R., & van Zwieten, M. J. (1990). Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 62(3), 244–278.
- Shamsa, F., Monsef, H., Ghamooshi, R., & Verdian-rizi, M. (2008). Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants. *Thai J Pharm Sci*, 32, 17–20. <https://doi.org/10.56808/3027-7922.2196>
- Shimizu, B.-I. (2014). 2-Oxoglutarate-dependent dioxygenases in the biosynthesis of simple coumarins. *Frontiers in Plant Science*, 5, 549. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00549>
- Sies, H., & Jones, D. (2007). Oxidative Stress*. En G. Fink (Ed.), *Encyclopedia of Stress* (Second Edition) (pp. 45–48). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012373947-6.00285-3>

- Sultan, A. (2015). Steroids: A Diverse Class of Secondary Metabolites. *Medicinal Chemistry*, 5. <https://doi.org/10.4172/2161-0444.1000279>
- Sznarkowska, A., Kostecka, A., Meller, K., & Bielawski, K. P. (2016). Inhibition of cancer antioxidant defense by natural compounds. *Oncotarget*, 8(9), 15996–16016. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13723>
- Tas, F., Hansel, H., Belce, A., Ilvan, S., Argon, A., Camlica, H., & Topuz, E. (2005). Oxidative stress in breast cancer. *Medical Oncology*, 22(1), 11–15. <https://doi.org/10.1385/MO:22:1:011>
- Tenorio, F., Mondragón, L., & Pastelín, G. (2005). Validation of a spectrophotometric analytical method for quantifying stable metabolites of nitric oxide in biological fluids. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 36, 31.
- Teoh, E. S. (2015). Secondary Metabolites of Plants. *Medicinal Orchids of Asia*, 59–73. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24274-3_5
- Tiwari, R., & Rana, C. (2015). Plant secondary metabolites: A review. *IJERGS*, 3, 661–670.
- Tolosa, L., & Cañizares, E. (2002). Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. *Ars Pharmaceutica (Internet)*, 43(1–2), Article 1–2.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231–1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J., & Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 266(1–2), 37–56. <https://doi.org/10.1023/b:mcbi.0000049134.69131.89>
- Vaquero, E. C., & Molero, X. (2005). Especies reactivas de oxígeno en las enfermedades inflamatorias del páncreas: ¿una posible diana terapéutica? *Gastroenterología y Hepatología*, 28(8), 473–484. <https://doi.org/10.1157/13078997>
- Wei, G.-J., & Ho, C.-T. (2006). A stable quinone identified in the reaction of carnosol, a major antioxidant in rosemary, with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *Food Chemistry*, 96(3), 471–476. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.02.041>
- Wiseman, H., & Halliwell, B. (1996). Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: Role in inflammatory disease and progression to cancer. *The Biochemical Journal*, 313 (Pt 1)(Pt 1), 17–29. <https://doi.org/10.1042/bj3130017>
- Woods, K. L. (1986). The mode of action of cardiac glycosides. *Journal of Clinical and Hospital Pharmacy*, 11(1), 11–13. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2710.1986.tb00823.x>
- Xiong, Q., Wilson, W. K., & Pang, J. (2007). The Liebermann–Burchard Reaction: Sulfonation, Desaturation, and Rearrangement of Cholesterol in Acid. *Lipids*, 42(1), 87–96. <https://doi.org/10.1007/s11745-006-3013-5>
- Xu, W., Liu, L. Z., Loizidou, M., Ahmed, M., & Charles, I. G. (2002). The role of nitric oxide in cancer. *Cell Research*, 12(5), 311–320. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290133>

Yekta, R., Dehghan, G., Rashtbari, S., Ghadari, R., & Moosavi-Movahedi, A. A. (2018). The inhibitory effect of farnesiferol C against catalase; Kinetics, interaction mechanism and molecular docking simulation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 113, 1258–1265. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.053>

Yoong, C., Salman, H. A. K., & Sulaiman, R. (2014). Extraction and quantification of saponins: A review. *Food Research International*, 59, 16–40. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.057>

Zambrano, L. F., Buenaño-Allauca, M. P., Mancera-Rodríguez, N. J., & Jiménez-Romero, E. (2015). Estudio etnobotánico de plantas medicinales utilizadas por los habitantes del área rural de la Parroquia San Carlos, Quevedo, Ecuador. *Universidad y Salud*, 17(1), 97–111.

Zaynab, M., Fatima, M., Abbas, S., Sharif, Y., Umair, M., Zafar, M. H., & Bahadar, K. (2018). Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 124, 198–202. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.08.034>