



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO
DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E
INGENIERÍA

TESIS

“Análisis fitoquímico y citotóxico de extractos de *Gnaphalium viscosum*
(Kunth) sobre líneas celulares humanas malignas de cérvix (SiHa) y mama
(Mda)”

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

Karla Anahí Hernández Gómez

DIRECTOR:

Dra. María del Carmen Valadez Vega

MINERAL DE LA REFORMA, HIDALGO, 2018



M. EN C. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO
DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR, UAEH.
P R E S E N T E

Por este conducto le comunico que el Jurado asignado a la pasante de Licenciatura en Biología **Karla Anahí Hernández Gómez** quien presenta el trabajo recepcional de tesis intitulado **“Análisis fitoquímico y citotóxico de extractos de *Gnaphalium viscosum* (Kunth) sobre líneas celulares humanas malignas de cérvix (SiHa) y mama (Mda)”**, después de revisarlo en reunión de sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del Jurado:

PRESIDENTE:	Dr. José Roberto Villagómez Ibarra
SECRETARIO	Dra. María del Carmen Valadez Vega
PRIMER VOCAL:	Dra. Liliana Mireya Aguilar Castro
SEGUNDO VOCAL:	Dr. Eduardo Osiris Madrigal Santillán
TERCER VOCAL:	M. en C. Mario Segura Almaraz
PRIMER SUPLENTE:	Dr. Manuel Sánchez Gutiérrez
SEGUNDO SUPLENTE:	Dra. Jeannett Alejandra Izquierdo Vega

Sin otro particular, reitero a usted la seguridad de mi más atenta consideración.

A T E N T A M E N T E
“AMOR, ORDEN Y PROGRESO”
Mineral de la Reforma, Hidalgo a 05 de Abril de 2018

M. en C. MAGDALENA MEZA SÁNCHEZ
COORDINADOR ADJUNTO DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA



Ciudad del Conocimiento
 Carretera Pachuca - Tulancingo km. 4.5
 Colonia Carboneras
 Mineral de la Reforma, Hidalgo, México, C.P. 42184
 Tel. +52 771 7172000 exts. 6640 y 6642, Fax 2112
 aab_icbi@uaeh.edu.mx



DEDICATORIA.

El cosmos en su profundo misterio e infinitas probabilidades de coincidir en todos los multiuniversos, me dio la oportunidad de poder conocer a dos personitas que dejaron en este inmenso punto azul, su gran luz en un breve tiempo.

Esta tesis es dedicada en memoria a mi hermana Yacel, quien a su corta edad tuvo la fortaleza de tener una batalla con el cáncer; agradezco todas las enseñanzas de vida que me dio a sus 9 añitos; jamás olvidaré el gran coraje y entusiasmo que tenias por seguir viviendo, tampoco todo lo bonito que me ofreciste, porque fuiste mi otro yo, la persona que me entendía con solo una mirada y que gozaba de compartir los grandes momentos conmigo. Me enseñaste que la vida y los sueños no se terminan con un problema minúsculo, ni menos con un cáncer, y gracias a ello, sigo de pie ante cualquier problema y con la fortaleza para cumplir mis sueños; siente este pequeño logro como el tuyo propio.

“Siempre serás mi bebé para mí”

También dedico mi tesis a mi amiga Edith quien luchó contra el cáncer y tuvo que partir. Gracias por tú linda amistad, contigo compartí muchas anécdotas, alegrías, grandes carcajadas, secretos, enojos y demás sentimientos; nunca olvidaré el apoyo que me diste cuando más lo necesite, así como tampoco la gran lección de vida que me dejaste, a partir de ahí, tuve una perspectiva muy diferente del amor y de la vida.

Este pequeño logro en mi vida quiero compartirlo en honor a tú memoria.

Gracias por todo Edith, siempre te recordaré.

“Me encantaría creer que cuando muera volveré a vivir de nuevo, que alguna parte de mi continuará, pero por más que quisiera creer en eso, todo sugiere que la vida después de la muerte no es más que una ilusión.

Me parece mejor mirar la muerte a los ojos y estar agradecido todos los días por la corta pero magnífica oportunidad que nos da la vida”

-Carl Sagan

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi mamá, que me ha dado las herramientas, los medios, el amor y apoyo para poder continuar con mi educación, sueños y metas que tengo en la vida; gracias por enseñarme a no darme nunca por vencida con los retos difíciles y motivarme a que concluyera mi tesis, espero que este pequeño paso que doy en mi vida profesional te enorgullezca; espero que la vida te deje muchos años a mi lado para poder compartir juntas mis logros y los tuyos, porque también me siento muy orgullosa de ti, gracias por todo bebé, TE AMO.

A don Hectór que me ha mostrado su apoyo incondicional y gran preocupación por mi bienestar y el de mi mamá; ha sido como un padre para mí, el cual agradezco todas las buenas acciones y consejos que me ha otorgado.

Al amor de mi vida Jaime, que me ha brindado su apoyo para poder continuar realizando mi tesis, así como, por haberme apoyado académicamente en toda la licenciatura y por otorgarme su tiempo para estudiar conmigo; has sido mi motor y fuente de inspiración para seguir adelante con mis sueños y vida preofesional. Gracias por los bellos momentos que me has dado, pero sobre todo, valoro mucho tú amor y todo lo que me das, espero que como siempre, estemos juntos para poder ver nuestros grandes logros y sueños por cumplir; quiero compartir contigo este pequeño pero importante logro en mi vida. Gracias por todo mi compañerito de aventuras, mi bola, mi amigo, mi confidente, mi bebé, TE AMO.

Gracias a mi amiga Cheli, quien ha sido una de las grandes amistades que pude haber tenido en la licenciatura y que siempre ha estado apoyándome incondicionalmente cuando más lo he necesitado; quiero compartir este logro contigo y yo poder estar ahí para ver los tuyos; espero nuestra amistad perdure por muchos años, te quiero manita.

*A **mi amix**, que ha sido como una segunda madre para mí, agradezco por haberme ofrecido su casa y su mesa cuando más lo necesite, espero nuestra amistad perdure por más años, la aprecio mucho.*

*A **mí amiga Joshua**, quien fue la que me impulso a poder seguir y concluir mí tesis, gracias por todos estos años de tú gran amistad que esta llena de anécdotas divertidas, has sido como una hermana para mí; espero que veamos juntas realizar nuestros sueños, te quiero piesillo.*

*A **mis familiares**, que nos han apoyado a mí y a mi mamá en los momentos difíciles y nos han brindado su casa para compartir buenos momentos. Gracias a: mí tía Lorena y Lupe, mis primas Enoe, Sendy, Oriely, Jazmín, tío Silvestre, Felix, Kimberly y el pequeño Santiago.*

*Agradezco a la **doctora Carmen**, por otorgarme sus conocimientos científicos, pero sobre todo, por haberme apoyado con todos los recursos necesarios que se requirieron para poder concluir este trabajo de investigación; gracias por guairme, por los consejos, regaños y buenos momentos de amistad que hemos tenido, la aprecio mucho.*

*Agradezco a la **doctora Jeannett y doctor Manuel** por haberme ayudado con parte del proyecto y por permitirme utilizar equipo de su laboratorio.*

*A **mi compañeros de laboratorio, Enrique, Gerardo, Gisela y Eli** por apoyarme en mis experimentos y compartir sus conocimientos conmigo; gracias por su linda amistad.*

*A **todos mis profesores que tuve en Biología**, que compartimos conocimientos y grandes anécdotas en campo, agradezco todo lo aprendido y el apoyo.*

*A **burbuja**, que siempre será mi compañerita fiel, la cual me ofreció su patita y encontré una nueva alegría.*

***Y SIN OMITIR a todas aquellas personas** que contribuyeron a que se realizara este proyecto y creyeron en mí y me apoyaron para seguir adelante.*

ÍNDICE GENERAL.

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	ix
I. RESUMEN	10
II. INTRODUCCIÓN	12
2.1 Cáncer: Bases moleculares y celulares	15
2.1.2 Características de las células cancerígenas	18
2.1.3 Virus DNA	19
3.1 Cáncer de cérvix	20
3.1.2 Tipos de virus de papiloma humano	21
3.1.3 Factores de riesgo del cáncer cervicouterino.....	21
4.1 Cáncer de mama.....	22
4.1.2 Tipos de cáncer de mama.....	23
4.1.3 Factores de riesgo del cáncer de mama	23
5.1 Epidemiología del cáncer.....	24
6.1 Medicina alopática y tradicional	24
7.1 Plantas: Definición de planta medicinal y sus usos en la medicina tradicional	28
7.1.2. Plantas utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento del cáncer y el uso del género <i>Gnaphalium</i>	29
8.1 Aspectos generales de <i>Gnaphalium viscosum</i> (Kunth).....	31
8.2 Composición y principios activos	32
9.1 Importancia de la evaluación citotóxica.....	34
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	36
3.1 Descripción del problema: Estadística del Cáncer cervicouterino (CaCu) y mama a nivel mundial, México y en el Estado de Hidalgo	36

IV. HIPÓTESIS	38
V. JUSTIFICACIÓN	38
VI. OBJETIVOS	39
6.1 Objetivo general.....	39
6.2 Objetivos específicos	39
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	40
7.1 Material vegetal.....	40
7.1.2 Colecta, identificación y conservación	40
7.1.3 Obtención del extracto	41
7.1.4. Bioensayo de actividad citotóxica	41
7.1.4.1 Obtención de las líneas celulares	41
7.1.4.2 Preparación del extracto vegetal para los ensayos de citotoxicidad	42
7.1.4.3 Cultivo de células	42
7.1.4.4 Determinación de viabilidad celular.....	43
7.2 Pruebas fitoquímicas.....	45
7.2.1 Actividad antioxidante	45
7.2.2 Determinación de fenoles totales (FT)	46
7.3 Saponinas	47
7.3.1 Preparación de Eritrocitos.....	47
7.3.2 Determinación de saponinas.....	47
7.3.3 Extracción	47
7.3.4 Cuantificación de saponinas	47
7.4 Determinación de taninos	48
7.5 Análisis estadístico.....	49
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
8.1 Extractos obtenidos.....	50
8.2 Actividad antioxidante	51
8.3 Determinación de fenoles totales	57
8.4 Determinación de saponinas.....	59
8.5 Determinación de taninos	61
8.6 Determinación de citotoxicidad del extracto en líneas celulares	62

VIII. CONCLUSIONES	79
X. REFERENCIAS	80

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Antineoplásicos de origen natural utilizados actualmente en la clínica..	27
Tabla 2. Herbolaria vs productos farmacéuticos	28
Tabla 3. Municipios con mayor número de defunciones por cáncer cervicouterino en mujeres de 25 años y más.....	37
Tabla 4. Líneas celulares malignas humanas empleadas en los estudios biológicos	42
Tabla 5. Concentración de los extractos de flor y hoja de <i>G. viscosum</i> (Kunth) empleadas para los ensayos de citotoxicidad	44
Tabla 6. Rendimiento de los extractos obtenidos de <i>Gnaphalium viscosum</i> (Kunth)	50
Tabla 7. Concentración en equivalentes de trolox de los extractos de hoja y flor de <i>Gnaphalium viscosum</i> (Kunth) por el método ABTS●+ y DPPH●. Los resultados son promedio de tres repeticiones ± desviación estándar.....	55
Tabla 8. Contenido de fenoles totales de extractos hoja y flor de <i>Gnaphalium viscosum</i> (Kunth) expresado en equivalentes de ácido gálico (EAG). Los resultados son promedio de tres repeticiones ± desviación estándar	57
Tabla 9. Actividad hemolítica de extractos de hoja y flor <i>Gnaphalium viscosum</i> (Kunth). Los resultados son promedio de tres repeticiones ± desviación estándar	59
Tabla 10. Contenido de taninos en los extractos hoja y flor de <i>Gnaphalium viscosum</i> (Kunth). Los resultados son promedio de tres repeticiones ± desviación estándar	61
Tabla 11. Dosis inhibitorias (DI ₅₀) de los extractos de hoja y flor de <i>G. viscosum</i> (Kunth) sobre la línea celular SiHa. Los resultados son promedio de tres repeticiones.....	64
Tabla 12. Dosis inhibitorias media (DI ₅₀) de los extractos de hoja y flor de <i>G. viscosum</i> (Kunth) sobre la línea celular Mda. Los resultados son promedio de tres repeticiones	65

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Fases de la aparición del cáncer, mostrando la adquisición de invasividad y capacidad metastásica	17
Figura 2. Progresión tumoral y generación de heterogeneidad	17
Figura 3. Características del cáncer	18
Figura 4. Genoma del virus del papiloma humano. Dividido en 3 regiones: Genes tempranos (E), genes tardíos (L), región larga de control (LCR).....	20
Figura 5. Tipos principales de células que cubren el cuello del útero son las células escamosas (exocérvix) y las células glandulares (endocérvix)	21
Figura 6. Estructura morfológica de la planta <i>Gnaphalium viscosum</i> (Kunth)	33
Figura 7. Fórmula empleada para calcular el rendimiento obtenido de los extractos	50
Figura 8. Actividad antioxidante de extracto de hoja de <i>Gnaphalium viscosum</i> (Kunth) Los resultados son el promedio de tres pruebas independientes \pm desviación estándar. Los disolventes para preparar el extracto fueron acetato de etilo (AcOEt), metanol (MeOH), y hexano	52
Figura 9. Actividad antioxidante de extracto de flor de <i>Gnaphalium viscosum</i> (Kunth) Los resultados son el promedio de tres pruebas independientes \pm desviación estándar. Los disolventes para preparar el extracto fueron acetato de etilo (AcOEt), metanol (MeOH), y hexano	53
Figura 10. Efecto Citotóxico del extracto de hoja de <i>Gnaphalium viscosum</i> (Kunth) sobre la línea celular SiHa	67
Figura 11. Efecto citotóxico de extracto de flor de <i>Gnaphalium viscosum</i> (Kunth) sobre la línea celular SiHa.....	69
Figura 12. Efecto citotóxico de extracto de hoja de <i>Gnaphalium viscosum</i> (Kunth) sobre la línea celular Mda	71
Figura 13. Efecto citotóxico de extracto de flor de <i>Gnaphalium viscosum</i> (Kunth) sobre la línea celular Mda	73

ABREVIATURAS.

µg/mL	Microgramos por mililitro
µL	Microlitro
2ⁿ	Título de hemólisis
AA	Actividad antioxidante en porcentaje
ABTS•+	Ácido 2,2' azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico
AcOEt	Acetato de etilo
DI₅₀	Dosis inhibitoria cincuenta
DMEM	Medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle medium
DPPH•	2,2 difenil-1-picrilhidracilo
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
MCC	Medio de Cultivo Completo
Mda	Línea celular de Cáncer de mama
MeOH	Metanol
<i>mg eq cat/g mtra</i>	Miligramos equivalentes de catequina por gramo de muestra
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MTT	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazolium
Na₂CO₃	Carbonato de Sodio
nm	nanómetros
PBS	Solución reguladora de fosfatos salino
SFB	Suero fetal bovino
SiHa	Línea celular de Cáncer cervicouterino
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico
U.H/mg	Unidades hemolíticas por miligramo de muestra

I. RESUMEN.

El género *Gnaphalium* pertenece a la familia Asteraceae la cual comprende una gran diversidad de especies de plantas en todo el mundo; este género comúnmente conocido como “Gordolobo” ha obtenido gran valor dentro de la medicina tradicional mexicana debido a sus propiedades medicinales que han servido para tratar enfermedades respiratorias, infecciosas y cancerígenas. Análisis fitoquímicos previos, revelan que las plantas del género *Gnaphalium* presentan metabolitos secundarios presentes en hojas, flores y tallos, entre ellos destaca el flavonoide 5-hidroxi-3,7-dimetoxiflavona, el cual ha sido reportado como un compuesto que posee efecto anti cancerígeno en células de adenocarcinoma de mama (línea MCF-7), no obstante, su estructura química le confiere la capacidad para ejercer actividad antioxidante, lo cual se le atribuye un efecto beneficioso en la prevención y tratamiento de diversas enfermedades, entre ellas el cáncer.

El presente estudio evaluó *in vitro* el contenido de metabolitos secundarios como fenoles totales, taninos y saponinas, así mismo, se determinó la actividad antioxidante y el efecto citotóxico de los extractos de hoja y flor de *Gnaphalium viscosum* (Kunth) en disolventes de diferente polaridad, acetato de etilo (AcOEt), metanol (MeOH) y hexano, los extractos fueron expuestos a diferentes concentraciones sobre las líneas celulares SiHa (Cáncer cervicouterino) y Mda (Cáncer de mama).

A partir de dichos extractos, se realizó la evaluación de la actividad antioxidante por métodos espectrofotométricos, mediante la técnica de radicales libres DPPH• y ABTS•+, utilizando Trolox como estándar. Así mismo, se realizaron técnicas espectrofotométricas y colorimétricas para determinar la presencia de saponinas, taninos y fenoles totales en la planta *G. viscosum* (Kunth); dichos compuestos se cuantificaron utilizando curvas de calibración correspondientes.

Se realizaron estudios para la evaluación de la actividad citotóxica de los extractos de hoja y flor, se evaluó por medio del ensayo de reducción de MTT empleando las líneas celulares malignas humanas Mda y SiHa; se determinó la viabilidad celular por medio de la curva dosis-respuesta (concentración del extractos

vs viabilidad celular), por último se determinó la dosis inhibitoria 50 (DI₅₀) de cada extracto.

En los resultados de actividad antioxidante, el extracto con mayor inhibición en el radical ABTS•+ lo obtuvo el extracto metanólico de hoja y flor, mostrando 92.89% (30.740 mg TEAC/g) de atrapamiento; por otra parte, la mayor capacidad antioxidante en la prueba DPPH• lo obtuvo el extracto metanólico de flor presentando un 85.53% (24.236 mg TEAC/g) de atrapamiento de dicho radical.

En lo que refiere al estudio de fenoles totales, se encontró mayor presencia de estos compuestos en el extracto metanólico de flor con 101.227 ± 2.104 mg EAG/g. En el estudio de saponinas, el extracto que presentó actividad hemolítica fue el extracto metanólico de flor, mostrando 170.940 ± 0 UH/mg. En la prueba de taninos, se obtuvo al extracto hexánico de flor con mayor contenido, mostrando 165.754 mg eq cat/g. En las pruebas de citotoxicidad, se encontró que 6 de los 12 extractos empleados tuvieron efecto citotóxico sobre las líneas SiHa y Mda. El extracto metanólico de hoja de *Gnaphalium viscosum* (Kunth) mostró mayor actividad citotóxica sobre la línea celular Mda, presentando una DI₅₀ de 238.5 µg/mL; así mismo, el extracto hexánico de hoja fue el que presentó mayor actividad citotóxica sobre la línea celular SiHa, mostrando una DI₅₀ de 346 µg/mL.

Los resultados obtenidos evidenciaron información valiosa sobre el contenido y características fitoquímicas de la planta *Gnaphalium viscosum* (Kunth), así mismo, este estudio muestra que los extractos de hoja y flor de dicha planta poseen actividad antioxidante y citotóxica. Este trabajo contribuye ampliar el conocimiento de la herbolaria medicinal, siendo el primer reporte fitoquímico y citotóxico de la especie *Gnaphalium viscosum* (Kunth), por lo que contribuye a enriquecer el conocimiento fitoterapéutico de las especies de plantas mexicanas.

Palabras clave: Gordolobo, metabolitos secundarios, cáncer, dosis inhibitoria, viabilidad celular, radicales libres, antioxidante, citotoxicidad.

II. INTRODUCCIÓN.

La medicina tradicional se basa en el conocimiento ambiental local, es adaptativa a los contextos espacio-temporales y sus poseedores son principalmente los pueblos originarios. Esta práctica tiene mayor antigüedad que cualquier otra terapia; el consumo sistemático de plantas con atributos medicinales se remonta probablemente a 2 millones de años en África (Chifa, 2010). La medicina herbolaria juega un papel importante como elemento curativo empleándose para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, dérmicas, del sistema nervioso central, cardiovasculares, diabetes cáncer, entre otras, (Noriega-Cisneros *et al.* 2012); todos estos usos muestran un panorama del potencial medicinal que poseen las plantas, por lo que no solo representa que se tengan diversas fuentes para el desarrollo de nuevos fármacos, si no, también contribuye a tener una nueva alternativa terapéutica medicinal local.

La organización Mundial de la Salud (OMS), estima que el 80% de los habitantes de países en desarrollo, depende de la medicina tradicional, principalmente de las plantas, para atender sus necesidades de salud (Ocegueda *et al.* 2005), además, en todo el mundo existe un interés creciente en las plantas medicinales, lo cual refleja el hecho en que países desarrollados, la población usuaria de productos herbolarios es de alrededor del 60% (WHO, 2002) se estima que anualmente en todo el mundo se facturan 60 000 millones de dólares en medicinas de patente elaboradas con plantas medicinales (Ocegueda *et al.* 2005). La OMS apoya el uso de la medicina tradicional y alternativa cuando está demostrado el beneficio y la existencia de mínimo riesgo para el paciente, el uso a través del tiempo demostró la inocuidad y la eficacia de la medicina tradicional. (Berdonces, 1995).

El crecimiento exponencial de la población y el incremento de la contaminación en todo el mundo, da como resultado el resurgimiento de enfermedades como la malaria y la tuberculosis, así como, la creciente incidencia del cáncer, por ello, es necesario y urgente intensificar la búsqueda de nuevas sustancias para el tratamiento de estos problemas de salud, particularmente en plantas (Paiva *et al.* 2003); gracias a la medicina tradicional y a la suma total de conocimientos, técnicas y procedimientos

basados en las teorías, las creencias y las experiencias indígenas de diferentes culturas sean o no explicables, utilizados para el mantenimiento de la salud, se puede prevenir, diagnosticar y mejorar el tratamiento para tratar enfermedades físicas y mentales (Berdonces, 1995). Esta es una estrategia bien fundamentada, ya que se ha demostrado que la posibilidad de detectar bioactividad en plantas, es mayor si para los bioensayos se seleccionan remedios herbolarios tradicionales, en cuyo caso muestran actividad del 20 al 60 % de los extractos probados; en contraste, si la selección de especies a probar es al azar, solo el 5% de los extractos son activos (Bermúdez y Velázquez, 2002). El valor que tienen las plantas de uso medicinal pone en evidencia al menos 119 medicamentos importantes como la vinblastina y la vincristina (Cragg *et al.* 1997), estos alcaloides fueron los primeros agentes clínicos, ambos compuestos fueron aislados de *Catharanthus roseus*, la cual es usada por varias culturas para el tratamiento de la diabetes (Cragg y Newman, 2003), sin embargo, estos compuestos en combinación con otros fármacos quimioterapéuticos sirven para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer incluyendo leucemias, linfomas, cáncer de testículo, cáncer de mama, pulmón y el sarcoma de Kaposi (Cragg y Newman, 2005)

Se calcula que aproximadamente el 25% de los medicamentos alopáticos contienen por lo menos una sustancia de origen vegetal (Duke, 1990) estos resultados reflejan la importancia que tienen los recursos vegetales, pero su potencial es mayor si se considera que la mayoría de las especies que componen la flora mundial no se ha investigado, sólo se ha estudiado, química o farmacológicamente una pequeña fracción de la flora que va del 5 al 15% (Duke, 1990; Soejarto *et al.* 2005); se calcula que en el mundo se han usado con fines medicinales entre 37 000 y 70 000 especies de plantas (Farnsworth y Soejarto, 1991; Huerta, 1997), considerándose que en México alrededor de 4 000 especies de plantas con flores (aproximadamente 15% de la flora total) tienen atributos medicinales, es decir, que más o menos una de cada siete especies posee alguna propiedad curativa (Ocegueda *et al.*, 2005). En el Estado de Hidalgo, a la fecha ha sido documentado el uso medicinal de 461 especies vegetales, que representan el 75% de la flora útil y el 11.5% de la flora estatal (Fuentes-Cervantes *et al.* 2013); estos datos nos dan un amplio panorama de la

riqueza florística que se tiene, no obstante, estos resultados se ven reflejados gracias al gran conocimiento empírico que poseen las comunidades indígenas sobre las propiedades medicinales que poseen las plantas. Cabe destacar que la efectividad farmacológica que poseen las plantas se debe principalmente al contenido de compuestos bioactivos, fitoquímicos o quimiopreventores, estos son moléculas que tienen una actividad biológica, que se traduce en beneficios para la salud (Narayama *et al.* 2001; Paladino y Zuritz, 2011) los cuales ejercen sus efectos una vez que ha sido ingeridos o aplicados en infusiones, cataplasmas y otras preparaciones (Gutiérrez *et al.* 2013); estos compuestos se encuentran entre las plantas, frutas y vegetales, y están agrupados en tres grupos principales: Compuestos fenólicos (Taninos, fitoestrógenos y cumarinas); compuestos nitrogenados (alcaloides, glicosidos cianogénicos, glucosinolatos, aminoácidos tóxicos, lectinas e inhibidores de proteasas); terpenos (lactonas sesquiterpénicas, glicósidos cardíacos, saponinas); algunos compuestos como los fenoles, son antioxidantes que atrapan radicales libres, estos últimos generan enfermedades crónicas como el cáncer (Narayama *et al.* 2001; Paladino y Zuritz, 2011), los taninos también forman parte de los fenoles y pueden ser condensados e hidrolizables (Isaza, 2007), algunos esteroides bloquean la acción del estrógeno en la promoción de cáncer de seno; también se encuentran las saponinas, que tienen tres propiedades distintivas que son: sabor amargo, potentes surfactantes y producen hemólisis sobre los eritrocitos (Carretero,200).

Entre los compuestos secundarios o moléculas con mayor obtención y uso terapéutico, destacan los flavonoides ya que poseen una amplia gama de actividades farmacológicas y biológicas; tanto los estudios *in vitro* como *in vivo*, han demostrado que los flavonoides poseen no sólo propiedades cardioprotectores (Perez-Vizcaino, *et al.* 2009), anti-inflamatorios (García-Lafuente *et al.* 2009), anti-microbianos (Cushnie *et al.* 2005), sino también, tiene propiedades de anti-mutagénicos y anti-tumorígenos (Le Marchand, 2002). Los flavonoides potenciales como agentes antitumorales se basan en mecanismos que incluyen la inducción de la apoptosis, la detención del ciclo celular y la modulación de las actividades de la proteína quinasa (López, 2002; Kandaswami *et al.* 2005; Kale *et al.* 2008) en las células cancerosas. Se han identificado 4 000 flavonoides hasta ahora y entre estos, muchos son conocidos por

tener actividades antitumorales (Thomas *et al.* 2012). Actualmente, se dispone de muchos fármacos quimioterapéuticos, que inducen la apoptosis en las células neoplásicas (Hickman, 1992; Zhang, 2002); sin embargo, la poca tolerancia y efectos adversos de estos fármacos, hacen que haya la necesidad de seguir buscando nuevas opciones para el tratamiento del cáncer (Couffignal *et al.* 2000); esta evidencia nos muestra el efecto que tienen los derivados de las plantas para reducir efectos colaterales (Desai *et al.* 2008).

Cabe destacar que los compuestos mencionados pueden encontrarse en toda la planta o sólo en algunas de sus estructuras (Ocegueda *et al.* 2005); los procedimientos para su obtención es a partir del fraccionamiento secuencial de los extractos y comúnmente consisten en la extracción del material seco de la planta empleando solventes de diferente polaridad como: acetato de etilo (AcOEt), metanol (MeOH), hexano, éter, etanol, cloroformo, entre otros, y la posterior evaporación de estos para obtener un extracto, una vez obtenido se da paso a la realización de bioensayos.

2.1. Cáncer: Bases moleculares y celulares.

Se puede definir al cáncer como un trastorno celular que se caracteriza por un acúmulo progresivo de células, que es consecuencia de una proliferación celular excesiva que no se compensa con una pérdida celular adecuada, y las células acaban invadiendo y dañando los tejidos del organismo (Maldonado *et al.* 2008); el cáncer se desarrolla a partir de la acumulación y selección sucesiva de alteraciones genéticas y epigenéticas, que permiten a las células sobrevivir, replicarse y evadir mecanismos reguladores de apoptosis, proliferación y del ciclo celular (Willingham *et al.* 2004). Muchos tipos de cáncer se relacionan con la producción anormal de enzimas, proteínas y hormonas, moléculas que se conocen como marcadores tumorales. Existen unos 200 tipos de células en el organismo, y si bien en un principio cualquiera puede originar un tumor, el 90% de los tumores son generados por células epiteliales, denominándose carcinomas. Los otros tipos mayoritarios de cáncer son los sarcomas, derivados de células del tejido conectivo o muscular, las leucemias, linfomas y

mielomas, originados por células de la sangre, y los neuroblastos y glicomas, que derivan de células del sistema nervioso (Muñoz, 2004).

El proceso por el cual las células normales se transforman en cancerosas se denomina **Carcinogénesis**. La comprensión de este proceso se logró principalmente por el desarrollo de técnicas de estudio genético; mediante estas, se estableció que la transformación progresiva de células normales a derivados altamente malignos se originaba en alteraciones en el material genético (mutaciones) (Hanahan y Weinberg, 2000; Mitrus *et al.* 2012). Estas mutaciones le confieren a una célula la capacidad de dividirse a una tasa mayor y generar una descendencia que conserva esta mutación (clones) (Mitrus *et al.* 2012). El rol de las alteraciones genéticas en la carcinogénesis fue puesto de manifiesto al descubrir en el genoma humano, genes homólogos a genes retrovirales relacionados previamente con el desarrollo de tumores. En células humanas normales estos genes se denominaron **Protooncogenes** y se relacionan con el crecimiento y proliferación de las células normales. Cuando se encuentran mutados se denominan **Oncogenes** y su mutación es de tipo dominante, es decir, sólo es necesario que uno de los alelos sufra una mutación para que la proteína que codifica, gane funcionalidad. Esto generalmente se traduce en aumento de supervivencia y proliferación (Weitzel *et al.* 2011). Sin embargo, estos no son los únicos genes que explican el desarrollo tumoral. Los **Genes Supresores de tumores**, controlan la proliferación, reparación celular y apoptosis (muerte celular) (Weitzel *et al.* 2011).

Cuando comienza a formarse una neoplasia, la mayor parte de sus células estarán proliferando, es decir, que su crecimiento será casi exponencial, a medida que aumenta su tamaño se va encontrando trabas, como problemas de vascularización o de aporte de nutrientes, que condiciona su crecimiento, este proceso se le conoce como **metástasis** (Figura 1), de ésta forma migran a otras zonas y proliferan de nuevo, en este punto también es importante comentar el concepto de **heterogeneidad tumoral** (Figura 2), ya que los tumores monoclonales en su origen llegan a estar formados por múltiples subpoblaciones celulares que difieren en sus propiedades genéticas, bioquímicas, inmunológicas y biológicas (como el cariotipo, la antigenidad, la inmunogenicidad, la capacidad de proliferación, la angiogénesis, la composición de

la membrana celular, la expresión de receptores, la capacidad para invadir y metastatizar (Muñoz, 2004; Kumar *et al.* 2008).

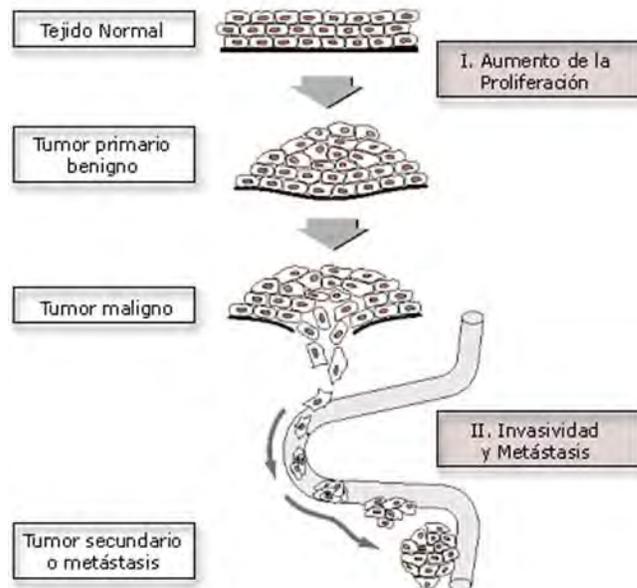


Figura 1. Fases de la aparición del cáncer, mostrando la adquisición de invasividad y capacidad metastásica.

Fuente: Muñoz, 2004.

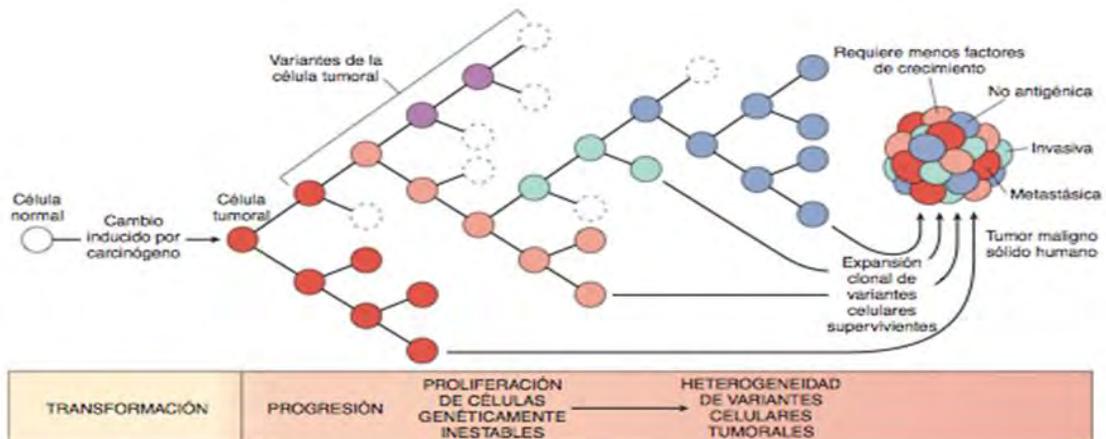


Figura 2. Progresión tumoral y generación de heterogeneidad.

Fuente: Kumar *et al.* 2008.

2.1.2. Características de las células cancerígenas.

Hanahan y Weinberg (2000), tras un exhaustivo análisis de la literatura publicada, describieron 6 características que son compartidas por las células tumorales:

1. Independencia de señales de crecimiento
2. Insensibilidad a estímulos que inhiben el crecimiento.
3. Invasividad y metástasis.
4. Evasión de apoptosis.
5. Potencial ilimitado de replicación.
6. Angiogénesis sostenida.

Estas características son adquiridas en los diversos tipos celulares por distintos mecanismos y eventos durante el proceso carcinogénico. En el año 2011, estos autores describieron dos nuevas características: reprogramación del metabolismo energético y evasión de la destrucción inmune, lo que concluye en ocho características intrínsecas de las células tumorales (Figura 3). Su desarrollo se ve favorecido por la inestabilidad genómica y la inflamación las fomenta (Hanahan y Weinberg, 2000).



Figura 3. Características del cáncer.

Fuente: Modificado por Hanahan y Weinberg, 2011.

Las mutaciones de los genes responsables de la carcinogénesis pueden ser heredadas o ser adquiridas, generalmente producto de la exposición a sustancias del ambiente (carcinógenos) (Mitrus *et al.* 2012; Weitzel *et al.* 2011), los agentes que causan cáncer pueden clasificarse en tres grupos: radiaciones, compuestos químicos y virus (Partanen *et al.* 2009).

2.1.3 Virus DNA.

Los virus oncogénicos de ADN asociados con neoplasias en humanos comprenden un diverso grupo con diferente estructura y organización del genoma, y estrategias de replicación, un ejemplo es el virus del papiloma humano (McLaughlin y Munger, 2008); estos virus son evolutivamente diferentes y tienen gran similitud en las funciones celulares que afectan la transformación, como: proliferación, diferenciación y señalización celular, senescencia y apoptosis (Boccardo y Villa, 2007).

El virus del papiloma humano contiene doble cadena circular de ADN, pertenece a la familia papilomaviridae, (Figura 4) y se asocia con casi 100% de los casos de cáncer cervicouterino y otros tumores de la región ano genital, sin embargo, todos los virus del papiloma humano tienen estructura y organización genética similar; se componen de una molécula de ADN circular de doble hebra de 8,000 pares de bases y una cápside icosaédrica compuesta de 72 capsómeros producidos de dos proteínas estructurales, y no tienen envoltura nuclear (Benuto Aguilar y Berumen Campos, 2009)

El genoma del papilomavirus humano tiene tres regiones diferenciadas (Álvarez *et al.* 2012):

a) Región larga de control (LCR), no contiene genes, contiene el punto de origen de replicación del ADN y elementos de control de la transcripción (Figura 4).

b) Región E (precoz), tiene capacidad de transformación y codifica proteínas que regula la transcripción y la replicación (Figura 4).

c) Región L (tardío) no tiene capacidad de transformación y codifica proteínas de la cápside del virus. Este virus se asocia a carcinomas epidermoides del aparato genital, sobre todo a los cánceres de cuello uterino (Figura 4).

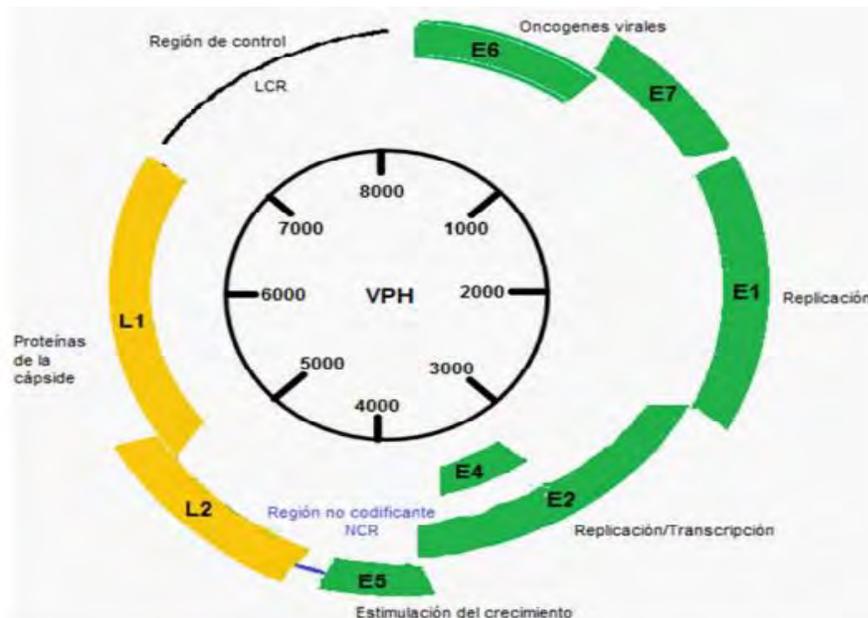


Figura 4. Genoma del virus del papiloma humano. Dividido en 3 regiones: Genes tempranos (E), genes tardíos (L), región larga de control (LCR).

Fuente: Álvarez *et al.* 2012.

3.1. Cáncer de cérvix.

El cáncer de cuello uterino o cáncer cervical se origina en las células que revisten el cuello uterino, la parte inferior del útero (matriz). Los dos tipos principales de células que cubren el cuello del útero son las células escamosas (Exocérvix) y las células glandulares (Endocérvix) (Figura 5). Estos dos tipos de células se encuentran en un lugar llamado zona de transformación. La mayoría de los cánceres de cuello uterino se originan en las células de la zona de transformación. Estas células no se tornan en cáncer repentinamente, sino que las células normales del cuello uterino primero se transforman gradualmente con cambios precancerosos, los cuales se convierten en cáncer (Vicuña *et al.* 2009).

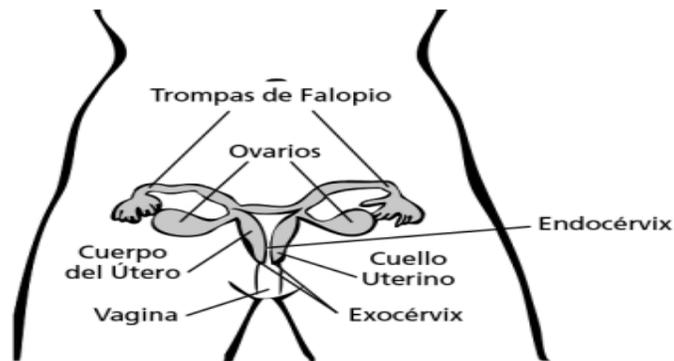


Figura 5. Tipos principales de células que cubren el cuello del útero son las células escamosas (exocérnix) y las células glandulares (endocérnix).

Fuente: IARC, 2008.

3.1.2. Tipos de virus del papiloma humano.

Actualmente se conocen más de 100 tipos de virus papiloma humanos (HPV), mostrando cada tipo un tropismo particular por sitios anatómicos específicos, siendo comunes las infecciones de piel y de mucosas del tracto oral, respiratorio y ano genital (Muñoz *et al.* 2003). La International Agency for Research on Cancer (IARC) de la OMS los clasifica como "carcinogénicos" (tipos 16 y 18), "probablemente carcinogénicos" (tipos 31 y 33), y "posiblemente carcinogénicos" (otros excepto 6 y 11) (IARC, 1995). Se ha notificado que las mujeres con citología normal pero con carga viral alta del tipo 16, corren un riesgo elevado de desarrollar neoplasias malignas intracervicales (NIC), sobre todo si la carga viral alta persiste a través del tiempo (Sun *et al.* 2002; Van Duin *et al.* 2002). La literatura menciona que la carga viral también predice la presencia de Cáncer de cérvix invasor (Lorincz *et al.* 2002).

3.1.3. Factores de riesgo del cáncer cervicouterino.

La evidencia que se tiene sobre la adquisición del virus del papiloma humano ha sido basta, sin embargo, esta evidencia no ha sido suficiente para el desarrollo del cáncer cervicouterino; la gran mayoría de las mujeres infectadas por algún tipo de VPH

oncógeno nunca presenta cáncer cervicouterino; esto sugiere que otros factores adicionales que actúan conjuntamente con el VPH influyen en el riesgo de aparición de la enfermedad (Walboomers *et al.* 1999). Cofactores como la paridad (Brinton *et al.* 1989; Thomas *et al.* 2001), el uso de anticonceptivos orales (Moreno *et al.* 2002), el tabaquismo (Hildesheim *et al.* 2001; Szarewski *et al.* 1998), la inmunosupresión particularmente la relacionada con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), la infección por otras enfermedades de transmisión sexual y la desnutrición se han asociado, en grado variable, con la aparición de cáncer invasivo del cuello uterino (Smith *et al.* 2002). Sin embargo, su función específica en la aparición del cáncer cervicouterino es poco clara aún. La edad de comienzo de las relaciones sexuales, el número de compañeros sexuales que se han tenido, los antecedentes de infecciones de transmisión sexual y otras características de la actividad sexual se vinculan con la probabilidad de contraer el VPH. Se considera que una baja condición socioeconómica es un factor de riesgo de numerosos problemas de salud, incluido el cáncer cervicouterino; en particular en entornos de bajos recursos (Silva y Beral, 1997). Algunos investigadores han postulado que las prácticas higiénicas deficientes o las malas condiciones higiénicas pueden aumentar el riesgo de infección por el VPH o de cáncer cervicouterino, no existen pruebas uniformes que sustenten esta aseveración (Murthy y Matthew, 2000; Franceschi *et al.* 2003).

4.1. Cáncer de mama.

El cáncer de mama es el crecimiento celular anormal originado en el epitelio de los conductos, o bien, en las células productoras de leche (Ortega, 2013). Algunos autores plantean que gran parte de los tumores de mama comienzan siendo una alteración de las células llamada hiperplasia típica que es una lesión benigna, luego, si se dan las condiciones podrán transformarse en una hiperplasia atípica que todavía es benigna, y de ahí evolucionar a un carcinoma *in situ* o invasor, estas dos últimas son malignas (Soto, 2006) .

4.1.2. Tipos de cáncer de mama.

El cáncer presenta diferentes tipos según el tipo de modificaciones que adquiera el tejido mamario. De acuerdo a la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) existen dos tipos principales de cáncer de mama: el carcinoma ductal (el más frecuente) el cual comienza en los ductos que llevan leche desde la mama hasta el pezón y el carcinoma lobulillar que comienza en los lobulillos que producen la leche materna (Guzmán-Santos *et al.* 2012).

4.1.3. Factores de riesgo del cáncer de mama.

Se conocen bien varios factores de riesgo del cáncer de mama, sin embargo, en la mayoría de las mujeres afectadas no es posible identificar factores de riesgo específicos. Los factores reproductivos asociados a una exposición prolongada a estrógenos endógenos, como una menarquia precoz, una menopausia tardía y una edad madura cuando el primer parto figura entre los factores de riesgo más importantes del cáncer de mama. Las hormonas exógenas también conllevan un mayor riesgo de cáncer de mama, por lo que las usuarias de anticonceptivos orales y de tratamientos de sustitución hormonal tienen más riesgo que las mujeres que no usan esos productos (Boyle y Levin, 2008; Lacey *et al.* 2009).

Autores como, Danaei *et al.* (2005), han calculado la contribución de diversos factores de riesgo modificables, exceptuando los reproductivos, a la carga global de cáncer de mama. Los autores concluyen que el 21% de todas las muertes por cáncer de mama registradas en el mundo son atribuibles al consumo de alcohol, el sobrepeso y la obesidad, y la falta de actividad física. Esa proporción fue mayor en los países de ingresos altos (27%), y el factor más importante fue el sobrepeso y la obesidad. En los países de ingresos bajos y medios, la proporción de cánceres de mama atribuibles a esos factores de riesgo fue del 18%, y la falta de actividad física fue el factor determinante más importante (10%). La diferente incidencia del cáncer de mama en los países desarrollados y los países en desarrollo puede explicarse en parte por los efectos de la alimentación, unidos a la mayor edad del primer embarazo, el menor número de partos y el acortamiento de la lactancia (Peto, 2001).

5.1. Epidemiología del cáncer.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es la primera causa de mortalidad a nivel mundial; en 2012 hubo unos 14 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes relacionadas con el cáncer (Ferlay *et al.* 2015). Los cánceres causados por infecciones víricas, tales como las infecciones por virus de las hepatitis B (VHB) y C (VHC) o por papilomavirus humanos (PVH), son responsables de hasta un 20% de las muertes por cáncer en los países de ingresos bajos y medios (Plummer *et al.* 2016). Se prevé que el número de defunciones anuales mundiales por cáncer seguirá aumentando y llegará a unos 12 millones en el 2031. En México a partir del año 2006, el cáncer de mama desplaza al cáncer cervicouterino para ubicarse como la primera causa de muerte por cáncer en la mujer. Anualmente se estima una ocurrencia de 20,444 casos en mujeres, con una incidencia de 35.4 casos por 100,000 mujeres (Dórame-López *et al.* 2017)

6.1. Medicina alopática y tradicional.

La cirugía, las radiaciones y la quimioterapia es lo que se usa en la medicina alopática para tratar a pacientes con cáncer (Stehman *et al.* 2003). En el caso de la quimioterapia, ésta es empleada como tratamiento principal cuando el tumor se encuentra en las etapas II, III y/o IV (García *et al.* 2016); esta estrategia consiste en administrar un fármaco que tenga la capacidad de inhibir el crecimiento tumoral y/o provocar la muerte celular; actualmente, el principio de acción de la mayoría de estos compuestos se basa en el mayor potencial replicativo de la célula cancerosa en comparación con el de la células sanas, por lo que estos compuestos también ocasionan la muerte de las células no cancerosas que crecen y se dividen rápidamente como lo son las de la sangre, el daño a las células sanas causa efectos secundarios que pueden ser muy graves, incluso algunas veces más severos que la misma enfermedad (Cragg *et al.* 2009); una parte de la investigación en el desarrollo de estos fármacos, en época reciente, se enfoca a encontrar medicamentos que sean específicos para las células tumorales, con lo cual se espera incrementar la eficacia del tratamiento y reducir los efectos secundarios (Loraine y Mendoza-Espinoza, 2010).

En este contexto, algunos blancos terapéuticos propuestos actualmente son: los inhibidores de la angiogénesis y de la metástasis (Loraine *et al.* 2010). Por otra parte, al explorar el conocimiento tradicional sobre el uso de las plantas en el tratamiento del cáncer desde el enfoque de la etnobotánica, se debe de tener precaución, porque a diferencia de otras enfermedades bien identificadas, como la malaria y la diabetes, el cáncer no es una entidad clínica bien definida: se habla de abscesos, callos, crecimientos, verrugas, entre otros (Cragg *et al.* 1996; Neves *et al.* 2009). Considerando lo anterior, Groce y Reeve (1996) proponen que se requiere ser sensibles a la diferencias y mantener respeto con este criterio, así el estudio de las plantas medicinales utilizadas para el tratamiento de lo que la medicina tradicional considera como cáncer, se convierte en una guía para la detección de antineoplásicos de origen vegetal. Autores, como Hostettman y Marston (1991) están de acuerdo con este enfoque consideran que las posibilidades de encontrar moléculas bioactivas aumenta el interés de estudiar las plantas usadas en la medicina tradicional.

El desarrollo de la química permitió el aislamiento de algunos de los elementos activos de las plantas y, en la mayoría de los casos, se pudo reproducir la actividad de los extractos crudos con la dosis equivalente del principio activo aislado (Henkel *et al.* 1999; Sheng-Ji, 2001) luego, se logró sintetizar estos principios activos o moléculas bioactivas estructuralmente relacionadas. Entre 1950 y 1970, se introdujeron en el mercado farmacéutico de Estados Unidos cerca de 100 nuevos fármacos antineoplásicos derivados de plantas, incluyendo a deserpidina, rescinamina, reserpina, vinblastina y vincristina; de 1971 a 1990, aparecieron en el mercado mundial etopósidos, tenipósido y glicósidos; en 1991 a 1995, se introdujeron paclitaxel, topotecán, irinotecán, y de 1996 a 2007 aparecieron, entre derivados y nuevos, 50 fármacos antineoplásicos (Cragg *et al.* 1997; Newman *et al.* 2003). La revolución de la biotecnología ha traído consigo descubrimientos en nuevas drogas, esto derivó a que se dejaran a un lado los estudios de extractos de las plantas así como, sus compuesto bioactivos, sin embargo, en épocas recientes, ha resurgido el interés por la medicina herbolaria y el desarrollo de fármacos a partir de especies vegetales como se observa en los estudios reportados recientemente.

Un estudio interesante es el trabajo descrito por el grupo de Pérez *et al.* (2010), donde llevaron a cabo estudios escalonados en pacientes con cáncer de seno en fase metastásico, para la dosificación de extractos de *Scutellaria barbata*, siendo un ejemplo claro de la sistematización científica que debe realizarse a los tratamientos de origen herbolario; otro claro ejemplo del impacto de la herbolaria en la terapéutica es el estudio realizado por Lee *et al.* (2009) donde empleó extracto estandarizado de *Rhus verniciflua* como terapia complementaria en el tratamiento del cáncer colorectal metastásico y reportan efectos positivos en la supervivencia general de los pacientes tratados, sin mostrar efectos secundarios.

Cabe destacar que durante los años cincuenta empezaron los descubrimientos de fármacos antineoplásicos a partir de productos naturales, los cuales se obtuvieron de manera indirecta debido a que eran para otras aplicaciones. El estudio de la vincapervinca de Madagascar, *Catharanthus roseus*, planta que era usada en muchas culturas para el tratamiento de la diabetes, con el fin de encontrar productos naturales antihiper glucemiantes, se descubrió que los alcaloides de la vinca, vincristina, vinblastina y sus derivados semisintéticos tenían efectos anticancerígenos (Malikov y Yunusov, 1977; Johnson, 1968). Los primeros agentes antineoplásicos extraídos como constituyentes puros y utilizados en la clínica fueron los alcaloides de la vinca, antes mencionados. En la Tabla 1 se muestran algunos de los agentes citotóxicos más comunes empleados actualmente en la clínica, su fuente de aislamiento y mecanismo de acción (Newman *et al.* 2007; Newman, 2008). El descubrimiento del paclitaxel es quizá el ejemplo más citado de la investigación de recursos medicinales que concretaron en la comercialización y prescripción de un producto natural para el tratamiento del cáncer, este compuesto fue aislado de la corteza del tejo (*Taxus brevifolia*) (Wani *et al.* 1971).

Tanto la herbolaria como la medicina alopática son prácticas terapéuticas que coexisten en grandes núcleos de población, y su aplicación oportuna y equilibrada puede ayudar a curar un grupo de enfermedades frecuentes; sin embargo, ambas alternativas terapéuticas poseen desventajas y ventajas en su uso (Tabla 2).

Tabla 1. Antineoplásicos de origen natural utilizados actualmente en la clínica.

Antineoplásicos	Mecanismo de acción	Fuente natural
<i>Alcaloides de la vinca</i> • Tipo A Vinblastina Vincristina Vindesina • Tipo B Vinorelbina	Son específicos del ciclo celular, bloquean las células que se encuentran en mitosis.	Vincapervinca de Madagascar (<i>Catharanthus roseus</i>)
<i>Taxanos</i> Paclitaxel Docetaxel	Se ligan a la subunidad β de la tubulina, bloqueando las células que se encuentran en mitosis.	Corteza del tejo (<i>Taxus brevifolia</i>)
<i>Epipodofilotoxinas</i> Tenopósido Etopósido	Se ligan a la tubulina, pero ejercen su acción citotóxica a través de inhibición de la topoisomerasa II.	Raíz de mandrágora (<i>Podophyllum peltatum</i>)
<i>Camptotecinas</i> Camptotecina Topotecán irinotecán	Inhiben la función de las topoisomerasas I y II.	Árbol chino (<i>Camptoteca acuminata</i>)

Fuente: Newman *et al.* 2007; Newman, 2008.

Tabla 2. Herbolaria vs Medicina alopática.

Medicina tradicional (herbolaria)	Medicina alopática (fármacos)
La administración oportuna y cuidadosa de la mayoría de las plantas no ocasiona efectos colaterales o secundarios.	La administración es segura, ya que está dosificada, pero con frecuencia provoca efectos secundarios,
Atiende al enfermo como un todo y no a la enfermedad.	Atiende a la enfermedad.
Costo mínimo, accesible a la mayor parte de la población.	No siempre es accesible.
Se basa en tradiciones orales	Está fundamentada científicamente.
Se combina con frecuencia con rituales mágico-religiosos.	Respeto creencias.
Se puede utilizar para la atención primaria de la salud a bajo costo.	Se incorpora a la atención primaria a mayores costos.

Fuente: Huerta, 1997.

7.1. Plantas: Definición de planta medicinal y sus usos en medicina tradicional.

Como bien se sabe, las plantas han estado presentes desde la antigüedad, siendo los pilares más importantes para el origen y evolución de diversas especies entre ellas, el *Homo sapiens*. La relación hombre-planta ha sido de suma importancia hasta la actualidad y ha permitido obtener los beneficios y múltiples usos que éstas les brinda tales como: alimenticio, comestibles, maderables, venenos, colorantes, celulosa insecticidas, ornamentales, aceites, siendo el uso medicinal el más sobresaliente (Hartmann, 2007). La gama de plantas medicinales deriva de solo una fracción de la diversidad total, lo cual sugiere que no todas las plantas tienen presentes compuestos que les otorgan sus propiedades medicinales, por ello se debe de tener claramente definido el termino de planta medicinal, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) las plantas medicinales como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos (Loraine *et al.* 2010).

El conocimiento de los pueblos indígenas ha sido primordial para la utilización de las plantas medicinales, el cual, se ha transmitido de generación en generación; lo que les ha permitido curar muchas enfermedades tales como: Afecciones en la piel, caída de cabello, caspa, fuegos, sarna, dolor de dientes y de cabeza; para enfermedades culturales como aire, espanto y mal de ojo, padecimientos del sistema circulatorio como anemia, circulación y presión arterial; del sistema digestivo como bilis, cálculos biliares y cólicos, del sistema endocrino como la diabetes, del sistema nervioso como epilepsia e insomnio, del sistema reproductor como trastornos en la matriz, para la fertilidad y para ayudar al parto; del sistema respiratorio como catarro, dolor de garganta, tos, dolor de pecho y dolor de pulmón y del sistema urinario como cálculos renales y dolor de riñones. Traumatismos como golpes, heridas y torceduras y otros padecimientos como el algodoncillo, baba, calentura, cansancio, gangrena, herida internas y hernias. También se utilizan para tratar el cáncer (Aguilar *et al.* 1996; Argueta, 1994).

7.1.2. Plantas utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento del cáncer y el uso del género *Gnaphalium*.

La gran riqueza florística de México ha llevado el interés de buscar anticancerígenos naturales en diferentes especies vegetales, con la finalidad de proporcionar y ampliar información sobre las alternativas terapéuticas para tratamiento del cáncer. En Brasil, Mans *et al.* (2000) estudiaron 500 especies de la flora local y reportaron los efectos citotóxicos de sus extractos. En Colombia Betancur- Galviz *et al.* (2002) reportaron que en ese país se emplean diez especies del género *Euphorbia* para tratar cáncer y encontraron que seis de éstas presentan citotoxicidad en células HeLa y otras líneas tumorales. Waitzel-Bucay *et al.* (2003) estudiaron a una de las hierbas del cáncer de la herbolaria mexicana, *Cuphea aequipetala* Cav. (Lythraceae) y ensayaron sus extractos en cultivos celulares, encontraron citotoxicidad ligera en células de cervix y nula en carcinoma nasofaríngeo y de colon. Por su parte, López, (2001) y López *et al.* (2002) seleccionaron cinco especies de plantas medicinales en el estado de Hidalgo como anticancerígenos, comprobaron que el extracto etanólico de *Cupressus lusitanica* Klotzsch (*Cupressaceae*) muestra efectos citotóxicos en

varias líneas celulares tumorales y demostraron que el efecto es por apoptosis, el proceso activo de muerte celular regulado genéticamente.

Las plantas del género *Gnaphalium* son conocidas por su uso para tratar tos, son llamadas comúnmente “gordolobo”; sin embargo, sus aplicaciones han llamado la atención para estudios mutagénicos (Déciga-Campos *et al.* 2007).

Diferentes especies del género *Gnaphalium* han mostrado diferentes propiedades biológicas. La especie *G. viscosum* (Kunth) muestra actividad contra bacterias gram-positivas *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes*. (Cáceres *et al.*, 1991). La distribución de este género es mundial. *G. stoechas* se encuentra en Alemania, Francia, Italia y España, se utiliza como agente adelgazante, o como agentes que sirven para la determinación de tumores y protuberancias. En la medicina homeopática, se emplea como una tintura junto con *G. polycephalum* en ciática, lumbago y algunas formas de artritis; otra especie del mismo género, *G. uliginosum* se ha empleado como astringente de garganta para disminuir la inflamación en forma de amigdalitis supurativa, aunado a este género, *G. polycephalum*, se utiliza como astringente, beneficio para las ulceraciones de la garganta y contra crecimiento anormal de tejido, las infusiones tibias son usadas para producir diaforesis, en amigdalitis supurativa, complicaciones pulmonares y leucorrea. Puede ser usado como una aplicación local como destructor de contusiones, tumores, dolencias y se administra como infusión en enfermedades de los intestinos y hemorragias. El jugo fresco tiene reputación de antivenéreo y antiafrodisiaco, la infusión fría se usa como vermífugo y las flores secas son usadas como sedantes contra la tuberculosis (Montiel-Ortega, 1999).

Una especie endémica de México es *G. oxiphyllum* Dc. Esta especie de gordolobo es utilizada en varias regiones del centro y norte del país como en el Distrito Federal, Morelos, Tlaxcala, Sonora y Estado de México para tratar enfermedades respiratorias como tos, gripa, asma, bronquitis, infecciones en la garganta y problemas pectorales. Uno de los principales usos homeopáticos es a través de mezclas (Jarabes) con diferentes plantas medicinales; el jarabe azteca incluye la especie *G. chartaceum* que se emplea como un tónico el cual incluye las siguientes especies: cuatecomate (*Crescencia alata*), gordolobo (*G. chartaceum*), ocote (*Pinus sp.*) copal

(*Vateria indica*), caña fistula (*Cassia fistula*), poleo (*Mentha pulegium*), flor del saúco (*Sambucus nigra*), flor de anacahuite (*Cordia moreslosana*), grangel, (*Grangea maderspatana*), estafiate (*Artemisia laciniata*), quina amarilla (*Chinchona flava*), flor empanadita. Este tónico se utiliza como: expectorante, antibiótico natural, tónico, antihelmíntico y antimicrobiano. Este género también es utilizado por grupos indígenas de la amazona peruana y entre estas esta *G. spicatum* que demostró solo la inhibición parcial contra *Staphylococcus aureus*. (Montiel-Ortega, 1999). Para la cura del cáncer, se recomienda en las regiones andinas de América del Sur, la bebida caliente obtenido por decocción de *G. purpureum* L. y *G. elegans* (García-Barriga, 1974).

8.1. Aspectos generales de *Gnaphalium viscosum* (Kunth).

Clasificación taxonómica de *Gnaphalium viscosum* (Kunth).

Reino: Plantae

Subreino: Traqueobionta

Supervisión: Spermatophyta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Gnaphalium*

Especie: *Gnaphalium viscosum* (Kunth)

Nombre común: Gordolobo

Fuente: Vibrans, 2009.

A. Distribución Geográfica

Se ha reportado en Baja California Sur, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luís Potosí, Sinaloa, Sonora, Tlaxcala y Veracruz (Villaseñor y Espinosa, 1998).

B. Identificación y descripción.

Descripción botánica

Basada en Cronquist, 1980; Hitchcock *et al.* 1969; Nash y Williams, 1976; Rzedowski y Rzedowski, 2001.

Existen numerosas especies de *Gnaphalium* muy parecidas, ésta se distingue de la mayoría de ellas por ser algo viscosa o pegajosa. Es una hierba anual o bianual; su tamaño es de 20 a 80 cm de alto. Su tallo es simple o medianamente ramificado por lo general densamente hojoso, erecto, con pelos glandulares, largos y erectos y además hacia el ápice con pelos largos, finos y entrecruzados. Tiene abezuelas reunidas en grupos globosos. La cabezuela es en realidad una inflorescencia formada por pequeñas flores sésiles dispuestas sobre un receptáculo plano o convexo. Sus hojas son alternas, estrechamente sagitadas; sus inflorescencias con cabezuelas reunidas en grupos globosos; los frutos y las semillas son secas e indehiscentes, contiene solo una semilla (Figura 6).

Uso medicinal.

El gordolobo es señalado para el tratamiento de diversas afecciones respiratorias, efectivo para disminuir la inflamación de garganta y tratar las posibles infecciones que se presenten, en amigdalitis, laringitis, bronquitis y procesos gripales, principalmente se le prescribe contra la tos. También se ocupa para problemas de la piel como granos, verrugas y heridas; así como, antidiarreico y trastornos del aparato digestivo como disentería, dolor de estómago, úlceras y afecciones del hígado (Cebrián, 2012).

8.2. Composición y principios activos.

Se ha aislado varios componentes de este género de planta, demostrándose la presencia de flavonoides y terpenos como sus constituyentes principales (Campos-Bedolla *et al.* 2005).



Figura 6. Estructura morfológica de la planta *Gnaphalium viscosum* (Kunth).

Fuente: Vibrans, 2009

Algunos ejemplos de estos componentes químicos son: 4,2',4'-trihidroxi-6'-metoxichalcona-4'-glucósido, 5,7-dihidroxi-3,6,8-trimetoxiflavona, sitosterol, estigmasterol, 5,8-dihidroxi-3,6,7-trimetoxiflavona, 5,8-dihidroxi-6,7-dimetoxiflavona, gnaphaliin y calycopterina (Meragelman *et al.* 2003; Guerreiro *et al.* 1982); en la especie *G. stramineum* se aisló, identificó y caracterizó β -sitoesterol y estigmaterol; estos son metabolitos secundarios de amplia distribución dentro del reino vegetal y su presencia no determina el uso de estas plantas como medicinales en el territorio hidalguense (Montiel-Ortega, 1999), sin embargo, para la especie *Gnaphalium viscosum* (Kunth) se reportan aislados, identificados y caracterizados los siguientes componentes: Sitoesterol, estigmasterol, 5-hidroxi-3,7 dimetoxiflavona, ácido (-)-kaur-16-en-19oico, 13-epi-sclareol y 13-epi-ciclosclareol, ácido (-)-ent 3 β -hidroxi kaur-16-en-19-oico (Montiel- Ortega, 1999); la importancia del aislamiento e identificación de 5-hidroxi-3,7 dimetoxiflavona, en la planta *G. viscosum* (Kunth), es debido a que presenta actividad anti-invasiva en células cancerígenas (Parmar *et al.* 1997); cabe destacar que es la primera vez que se aísla dicho compuesto dentro del género *Gnaphalium*. Se sabe que una sola planta medicinal puede contener de ocho a 10

principios activos, lo que indica la complejidad y riqueza bioquímica que existe en la naturaleza. Estos compuestos químicos se extraen por diferentes procedimientos. Para que una planta conserve sus propiedades medicinales se deben respetar ciertas reglas de recolección, desecación, almacenamiento, para que finalmente se obtengan infusiones o extractos, (Ocegueda *et al.* 2005); los cuales posteriormente se someten a bioensayos y a su evaluación citotóxica de la planta que se pretende estudiar.

9.1. Importancia de la evaluación citotóxica.

La evaluación de la citotoxicidad constituye un parámetro básico en la evaluación de las muestras. Los cultivos celulares, en crecimiento exponencial, son compuestos al medio que contiene los compuestos de prueba. Los controles comprenden al diluyente sólo y al efecto de los compuestos, que son evaluados mediante pruebas de viabilidad. Los métodos que permiten dicha evaluación deben ser considerados según el tipo de muerte celular producida, dado que ésta puede tener lugar por distintas vías, que implican claras diferencias en la respuesta celular (CYTED, 2002). Investigaciones realizadas en diversas partes del mundo aplican diversas técnicas de evaluación citotóxica, han permitido evaluar en base a su uso tradicional, el efecto antitumoral de algunas plantas, sobre diferentes tipos de tumores, en estudios *in vitro* (Alonso y Desmachelier, 2015).

La evaluación de la actividad citotóxica de productos derivados de las plantas medicinales, se ha convertido en un método de uso muy frecuente en los últimos años, la evaluación y desarrollo de un fitofármaco o un nuevo medicamento forma parte de un largo y laborioso proceso en la investigación. En los experimentos de citotoxicidad se incuban células de una línea celular específica, a una serie de diluciones de la preparación de interés, para tener valores reproducibles de cada producto evaluado. El uso de sustancias químicas, requiere de estudios científicos que demuestren el escaso o nulo potencial tóxico de las mismas (CYTED, 2006).

La investigación etnobotánica y etnofarmacológica de las especies vegetales, para su posible utilización fitoterapéutica, exige un adecuado protocolo de trabajo, incluyendo toda la escala de pruebas, que van desde la correcta selección de la planta

hasta la realización de una exhaustiva gama de ensayos, que permitan la utilización de la planta como medicamento, con garantía de eficacia y seguridad (CYTED, 2006).

Así que autores como Zani *et al* (1995), Hostettman (1999) y Alves *et al.*(2000) consideraron que es necesario desarrollar programas de evaluación biológica de las plantas para descubrir compuestos activos y que uno de los problemas es contar con bioensayos suficientemente sensibles para detectar sustancias activas presentes en los extractos en concentraciones muy bajas, en ocasiones en el orden de partes por millón (ppm), al mismo tiempo, los bioensayos deben probar un gran número de muestras con las réplicas necesarias para evaluar estadísticamente, también el bioensayo debe ser general, amplio para incluir diversos mecanismos de acción conocidos o no, a nivel celular, fisiológico, bioquímico y molecular. Al evaluar a los extractos que hayan resultado inactivos, los que reduce las posibilidades de la búsqueda; se continua con los extractos activos, los cuales son separados por cromatografía. Las sustancias puras activas obtenidas en el bioensayo son candidatos para probarse en sistemas más costosos como los cultivos celulares.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

3.1. Descripción del problema: Estadística del Cáncer cervicouterino (CaCu) y mama a nivel mundial, México y en el Estado de Hidalgo.

El CaCU es el segundo cáncer más frecuente de distribución mundial que se presenta en la población femenina, con una estimación de 530,232 casos nuevos, de los cuales aproximadamente el 86 % (453,531 casos) se presenta en los países en desarrollo (Hernández *et al.* 2015). De acuerdo con estimaciones de la OMS en 2008, la tasa estandarizada a nivel mundial es de 15.2 por 100 mil mujeres, solo por debajo del cáncer de mama (38.9 por 100 mil mujeres) (Ferlay, 2010). Las tasas de mortalidad son tres veces mayores en América Latina y el Caribe, que en Estados Unidos y Canadá (González-Robledo *et al.* 2010)

En México se estima anualmente la ocurrencia de cáncer cervicouterino es de 13,960 casos, con una incidencia de 23.3 casos por 100,000. En el grupo específico de mujeres de 25 años y más, en el año 2015, se registraron 3,994 defunciones en mujeres con una tasa cruda de 11.5 defunciones por 100,000 mujeres. Las entidades con mayor mortalidad por cáncer de cuello uterino son: Colima (17.7), Chiapas (17.6) Guerrero (15.6), Veracruz (15.4) y Oaxaca (15.2) (de Acción Específico, 2014).

En el estado de Hidalgo, con la estratificación por cáncer cervicouterino se identifica que el 33.3% de los municipios presentan un riesgo alto; 34 municipios (40.5%) se clasifican en riesgo medio y los 22 restantes con bajo riesgo. No obstante, en la reciente Encuesta Nacional de Medio Camino 2010, realizada por el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) y según los datos reportados por la propia población, se encontró que la entidad de Hidalgo se encuentra entre los mejores niveles de detección y con una de las tasas de mortalidad por cáncer cervicouterino menores dentro del país. La realidad en el interior estatal es dispar, existiendo municipios con elevadas tasas ya que hay municipios con defunciones por cáncer del cuello del útero en mujeres de 25 años y más (Gordillo *et al.* 2010) (Tabla 3).

En el ámbito mundial, el cáncer de mama es la segunda neoplasia más frecuente en la población y la más frecuente entre las mujeres (de Acción Específico, 2014). Datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2016) señalan que cada

año se detectan 1.38 millones de casos nuevos y ocurren 458 mil muertes por esta enfermedad.

Tabla 3. Municipios con el mayor número defunciones por cáncer del cuello del útero en mujeres de 25 años y más.

HIDALGO			
DEFUNCIONES POR MUNICIPIO DE RESIDENCIA, 2010			
No. DE ORDEN	Municipio	Número	%
1	048 PACHUCA DE SOTO	7	9.2
2	077 TULANCIGO DE BRAVO	7	9.2
3	005 AJACUBA	4	5.3
4	016 CUATEPEC DE HINOJOSA	3	3.9
5	029 HUICHAPAN	3	3.9
6	050 PROGRESO DE OBREGÓN	3	3.9
7	028 HUEJUTLA DE REYES	3	3.9
8	008 APAN	3	3.9
9	061 TEPEAPULCO	3	3.9
10	082 ZAPOTLAN DE JUAREZ	3	3.9
	EN OTROS 32 MUNICIPIOS	37	48.7
	TOTAL ESTATAL	76	100.0

Fuente: Subdirección de Epidemiología. Secretaría del Estado de Hidalgo, 2010.

Según datos de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), en el continente americano, la tendencia es similar, es decir, el cáncer de mamá es el más común entre las mujeres (29% respecto del total de casos de cáncer) y es la segunda causa de muerte por tumores malignos para este grupo de población; para el año 2030, la OPS estima más de 596,000 casos nuevos y más de 142,100 muertes en la región, principalmente en la zona de América Latina y el Caribe (OPS, 2014a y 2014b).

En México a partir del año 2006 anualmente se estimó una ocurrencia de 20,444 casos en mujeres, con una incidencia de 35.4 casos por 100,000 mujeres. En el año 2015 se registraron 6,252 defunciones en mujeres con una tasa cruda de 18 defunciones por 100,000 mujeres. En el Estado de Hidalgo es una de las entidades con menor incidencia de muertes de mujeres a causa del cáncer de mama, registrando una tasa de mortalidad de 13.8 mujeres; el estado de Hidalgo se encuentra significativamente por debajo de esta cifra, ocupando el sexto lugar entre las menores tasas (Gordillo *et al.* 2010).

IV. HIPÓTESIS.

Los extractos de metanol, acetato de etilo y hexano obtenidos de las hojas y flores de *Gnaphalium viscosum* (Kunth), presentan metabolitos secundarios capaces de tener actividad fitoquímica y citotóxica en las líneas celulares malignas Mda y SiHa.

V. JUSTIFICACIÓN.

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, siendo el cáncer de mama y de cérvix los más frecuentes entre las mujeres; los tratamientos alopáticos utilizados para tratar estos tipos de cáncer son radiaciones, quimioterapias, fármacos o cirugías; estos tratamientos suelen ser costosos, provocando gastos elevados para los pacientes y tienden a causar efectos secundarios sobre el cuerpo, afectando diferentes órganos, sin embargo, los metabolitos secundarios presentes en las plantas han sido una alternativa terapéutica natural para el tratamiento del cáncer; es por ello, que resulta necesario intensificar la búsqueda de plantas que contengan compuestos fitoterapéuticos con actividad anticarcinogénica, como es el caso de la planta *Gnaphalium viscosum* (Kunth).

VI. OBJETIVOS.

6.1. Objetivo general.

Evaluar el contenido de metabolitos secundarios y el efecto citotóxico de los extractos orgánicos de *Gnaphalium viscosum* (Kunth) en las líneas celulares cancerígenas humanas.

6.2. Objetivos específicos.

- ✚ Evaluar la actividad antioxidante y el contenido de fenoles totales de los extractos de metanol, acetato de etilo y hexano obtenido de las hojas y flores de *Gnaphalium viscosum* (Kunth).
- ✚ Determinar la concentración Saponinas y taninos de los extractos de hojas y flores de *Gnaphalium viscosum* (Kunth).
- ✚ Evaluar el efecto citotóxico de los extractos metanol, acetato de etilo y hexano obtenidos de las hojas y flores de *Gnaphalium viscosum* (Kunth) sobre la líneas celulares malignas humanas de cérvix (SiHa) y mama (Mda).
- ✚ Determinar la dosis inhibitoria media (DI₅₀) de los extractos de *G. viscosum* (Kunth) sobre las dos líneas celulares malignas humanas.
- ✚ Establecer el extracto que presenta mayor actividad anti-carcinogénica en las dos líneas celulares.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1. Material vegetal.

7.1.2 Colecta, identificación y conservación.

- Colecta. La planta *Gnaphalium viscosum* (Kunth) empleada en el diseño experimental fue colectada por Karla Anahí Hernández Gómez; se tomaron únicamente las partes aéreas (hoja y flor) de la planta, los ejemplares fueron colectados en su tiempo de floración y se eligieron especímenes en buen estado y en etapa adulta; posteriormente se tomó una muestra de los ejemplares, la cual fue secada y prensada en periódico para llevarla a su correspondiente identificación.

La realización de la colecta se llevó a cabo en el rancho El Guajolote situado en el municipio de Epazoyucan en el Estado de Hidalgo durante los meses julio y agosto del año 2014. El municipio de Epazoyucan ubica entre los paralelos 19° 57' y 20° 08' de latitud norte; los meridianos 98° 34' y 98° 44' de longitud oeste; altitud entre 2 300 y 3 100 m; en esta localidad prevalece un clima Semiseco templado (81.0%), templado subhúmedo con lluvias en verano, de menor humedad (10.0%) y semifrío subhúmedo con lluvias en verano, de mayor humedad (9.0%) con un rango de temperatura de 10 – 16°C y de precipitación 400-900 mm; el uso del suelo se ocupa para la Agricultura (69.5%) y zona urbana (1.53%), el tipo de vegetación con la que cuenta este municipio es Bosque (13.38%), matorral (10.5%) y pastizal (5.0%) además también existen algunos matorrales, maguey, cimarrón, algunas yucas, palma y nopal (INEGI, 2009).

- Identificación. La identificación fue llevada a cabo por el profesor en ciencias Manuel González Ledesma, quien identificó al ejemplar con la clave dicotómica de Rzedowski y Rzedowski, (2005) en el herbario del Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

➤ **Conservación.**

Las muestras se colocaron y se extendieron sobre papel absorbente para eliminar la humedad y evitar el crecimiento de microorganismos; se dejaron secar los ejemplares sin iluminación solar, durante 20 días a una temperatura ambiente (20°C - 25°C). Posteriormente se separaron cada una de las partes de la planta (hoja y flor), una vez secas por completo se trituraron en un molino eléctrico; para su conservación se emplearon bolsas de plástico etiquetadas y selladas herméticamente para evitar la humedad, hasta su uso.

7.1.2 Obtención del extracto.

Se tomaron 500 g de cada parte de la planta (hoja y flor), posteriormente cada parte se sometió a extracciones sucesivas con diferentes disolventes (hexano, acetato de etilo y metanol) en orden de polaridad ascendente durante una semana en constante agitación a temperatura ambiente, después de este periodo, el extracto fue filtrado en papel filtro Whatman No. 2 y concentrado en rotavaporador (BÜCHI Water Bath B-480) hasta eliminar el solvente. Para determinar el rendimiento de los extractos, se pesó el residuo obtenido después de concentrar la muestra (Tabla 6). Los extractos obtenidos se almacenaron en frascos y se llevaron a refrigeración hasta su utilización.

7.1.4. Bioensayo de actividad citotóxica.

7.1.4.1. Obtención de las líneas celulares.

Las líneas de células malignas SiHa y Mda (Tabla 5), fueron proporcionadas por el Dr. Alejandro García Carrancá del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Para los presentes estudios se utilizaron dos líneas celulares malignas SiHa (Cáncer de cérvix) y Mda (Cáncer de mama) provenientes de diferentes orígenes y tejidos. Para las pruebas de citotoxicidad se les suministro el extracto de hoja y flor de *G. viscosum* (Kunth); esto con el objetivo de establecer la concentración que tuviera la capacidad de disminuir la viabilidad celular hasta un 50%. Para cada una de las líneas,

se realizaron curvas de dosis-respuesta en el cual se determinó la viabilidad celular, expresada en porcentaje.

Tabla 4. Líneas celulares malignas humanas empleadas en los estudios biológicos.

LÍNEA CELULAR	ORIGEN	CARACTERÍSTICAS
SiHa	Cérvix	Carcinoma escamoso de cérvix.
Mda	mama	Adenocarcinoma de mama.

7.1.4.2. Preparación del extracto vegetal para los ensayos de citotoxicidad.

Para cada experimento se pesaron en viales 0.1 g del material vegetal, posteriormente los extractos fueron disueltos en Dimetil sulfoxido (DMSO, J.T. Baker), la concentración de los tres extractos fueron preparados a una concentración de 100 mg /mL; las muestras fueron agitadas a un Vortex (Maxi Mix II Vortex Mixer, 120V) por un tiempo 10 min. Una vez obtenido el extracto (Stock), se prosiguió a realizar los cálculos para las concentraciones empleadas en los ensayos de citotoxicidad.

7.1.4.3 Cultivo de células.

El experimento se desarrolló en el laboratorio de Toxicología en el Instituto de Ciencias de la Salud (ICSa). Las líneas celulares SiHa y Mda fueron descongeladas y transferidas a cajas Petri (P 50 y P 100), provistas con 10 mL de medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) alto en glucosa (Gibco, México), suplementando con suero fetal bovino (SFB) (Gibco, México) al 10 % y antibióticos (Estreptomicina y Penicilina G sódica) al 1%, lo sucesivo es referido como medio de cultivo completo (MCC), posteriormente las células fueron incubadas a 37 °C en una

atmósfera de 5% de CO₂ y 7% de humedad; una vez que las células se adherían a la base de la caja Petri, se prosiguió a un cambio de cultivo completo esto con la finalidad de su propagación y obtener una confluencia de 90 al 100%. Las células ya en confluencia eran despegadas de la base de la caja Petri con 3 mL de solución reguladora de fosfatos (50 mM pH 7.4), conteniendo ácido etilendiaminotetraacético al 1% (PBS-EDTA). Una vez despegadas las células, se añadió 7 mL de DMEM para neutralizar el efecto del EDTA, con la finalidad de evitar que las células fueran dañadas. Posteriormente, las células eran transferidas a un tubo de ensaye estéril para centrifugar por 5 min a 1500 rpm (Beckman TJ-6, rotor- I-94). Concluida la centrifugación, el sobrenadante fue retirado y el paquete celular fue resuspendido con MCC; de esta suspensión se tomaron alícuotas de 50 µL y se agregó 200 µL de solución azul tripán en un tubo eppendorf de 2 mL (0.1%), se prosiguió a contar las células vivas (Células no teñidas de azul) al microscopio invertido con ayuda de un Hematocitómetro (Housser Scientific), determinándose la cantidad de células en la muestra inicial, una vez obtenida, se realizaron cálculos para obtener la cantidad de alícuota requerida para sembrar las células, se utilizaron microplacas (Nunc, Thermo Scietific) de 96 pozos en donde a cada pozo se administraron 1.0×10^4 células en 200 µL de medio completo, las células se incubaron a una temperatura de 37°C en un atmosfera de 5% de CO₂ y 7% humedad por 24 h, para permitir que las células se adhieran a la placa.

7.1.4.4 Determinación de viabilidad celular.

Una vez que se adhirieron las células a la microplaca, se retiró el medio de cultivo y fue remplazado con el extracto de *G. viscosum* (Kunth) a las concentraciones que se indican en la tabla 4; las dilusiones de los extractos fueron preparadas con medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, México), suero fetal bovino (SFB) al 10% (Gibco, México) y antibióticos (estreptomina y penicilina G sódica) al 1%.

Posteriormente, las células se mantuvieron incubadas a la condiciones previamente mencionadas por un tiempo de 24 h y al término de la incubación se prosiguió a la determinación de viabilidad celular.

Tabla 5. Concentración de los extractos de flor y hoja de *G. viscosum* (Kunth) empleadas para los ensayos de citotoxicidad.

Línea celular	Parte morfológica	Disolvente	Concentración $\mu\text{g/mL}$
SiHa	hoja	Hexano	0-1000
	hoja	Acetato de etilo	0-3000
	hoja	Metanol	0-2000
	flor	Hexano	0-3000
	flor	Acetato de etilo	0-2000
	flor	Metanol	0-2000
Mda	hoja	Hexano	0-3000
	hoja	Acetato de etilo	0-1000
	hoja	Metanol	0-2000
	flor	Hexano	0-3000
	flor	Acetato de etilo	0-2000
	flor	Metanol	0-3000

La viabilidad celular se determinó mediante la técnica de Sladowski (1993), la cual fue modificada de la prueba inicialmente realizada por Mosman (1983), la cual se basa en la reducción de la sal de bromuro de 3-(4,5 dimetililtiazol-2 y 1) -2-5 difeniltetrazolium (MTT, Sigma), a un colorante forma insoluble, formado por las enzimas mitocondriales en células viables.

En las microplacas, cada pozo con células previamente expuestas con extracto, se le agregó 10 μL de MTT (5 mg/ en PBS) mezclado con medio de cultivo completo, se dejó reaccionar en incubación esto durante un periodo de 3 h, posteriormente se extrajo el medio con el MTT; a cada pozo se le agregó 100 μL de dimetil sulfóxido (DMSO, J.T. Baker). Una vez transcurridos 10 min se leyó la absorbancia de cada pozo a una longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro para microplacas (Epoch- BioTeK Instrument).

La viabilidad celular se calculó considerando el valor de absorbancia de la muestra control (0 mg/mL de extracto), como el 100 % de viabilidad celular y a partir de este se calcularon los datos restantes para los cultivos celulares. Los datos de

dosis inhibitoria se determinó realizando curvas dosis-respuesta (concentración de extractos vs porcentaje de viabilidad celular) en cual se determinó la concentración (eje de las abscisas) tomando un valor de viabilidad (en el eje de las ordenadas), que equivale a una disminución del 50% de la viabilidad celular (DI₅₀). Para el análisis se creó una base de datos utilizando el programa Microsoft Excel 2013. Se calcularon los promedios de los datos de absorbancia, una vez obtenidos se prosiguió a determinar la viabilidad.

7.2. Pruebas fitoquímicas.

7.2.1 Actividad antioxidante.

Método ABTS•+

Se realizó de acuerdo a la metodología desarrollada por RE *et al.* (1999). Se emplearon los reactivos (ácido 2,2' azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico) (ABTS, Sigma-Aldirich) y ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico (Trolox, Sigma-Aldirich) como estándares. El ABTS•+ se preparó 24 h previas a su uso a una concentración de 3.6 mg/mL empleando persulfato de potasio a 0.6 mg/mL en etanol. Posteriormente, el ABTS•+ se diluyó hasta llevarlo a una absorbancia de 0.70±0.02 a una longitud de onda de 734 nm (Epoch- BioTeK Instrument).

Los extractos de *G. viscosum* (Kunth) se prepararon a una concentración de 100 mg/mL en etanol. Para determinar la concentración equivalente de trolox (TEAC), a 100 µL de cada extracto se agregaron 900 µL de solución de ABTS•+; se dejaron reposar en oscuridad por 5 min y se llevó a lector de micro placas a 734 nm. Los resultados se reportaron como capacidad antioxidante equivalente de trolox en mg/g de muestra (TEAC mg/g); para lo cual se preparó una curva de calibración con trolox, a una concentración de 100 µg/mL en etanol.

Por otro lado se calculó el índice antioxidante (IA) en porcentaje, empleando la siguiente ecuación: $IA (\%) = (A_{734 \text{ Blanco}} - A_{734 \text{ Muestra}}) / A_{734 \text{ Blanco}} \times 100$, en donde A indica absorbancia.

Las determinaciones se efectuaron por triplicado y para el análisis de datos se ocupó el programa Microsoft Excel 2013.

✚ Método DPPH•

Para esta prueba se utilizó el método, desarrollado por Brand-Williams *et al.* (1995), basándose en la reducción del radical 2,2 difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•). El DPPH• se preparó a una concentración de 7.5% en 10 mL de etanol.

Los extractos de *G. viscosum* (Kunth) se prepararon a una concentración de 100 mg/mL en etanol. Para determinar los TEAC, a 100 µL de cada extracto se agregaron 900 µL de solución DPPH•; se dejó reposar en la oscuridad por 60 min y se llevó a un lector de micro placas (Epoch- BioTeK Instrument) a 520 nm. Los resultados se reportaron como capacidad antioxidante equivalente de trolox en mg/g de muestra (TEAC mg/g); para lo cual se preparó una curva de calibración con trolox, a una concentración de 100 µg/mL en etanol.

Por otro lado se calculó el índice antioxidante (IA) en porcentaje, empleando la siguiente ecuación: $IA (\%) = (A_{734 \text{ Blanco}} - A_{734 \text{ Muestra}}) / A_{734 \text{ Blanco}} \times 100$, en donde A indica absorbancia.

Las determinaciones se efectuaron por triplicado y para el análisis de datos se ocupó el programa Microsoft Excel 2013.

7.2.2 Determinación de fenoles totales (FT).

Para la determinación de Fenoles totales se utilizó el método espectrofotométrico desarrollado por Folin y Ciocalteu, (1927). Se utilizaron extractos de *G. viscosum* (Kunth) y se emplearon los reactivos Ácido Gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico, Sigma- Aldirich) Carbonato de Sodio (Na₂CO₃, Sigma- Aldirich) y reactivo de Folin (Sigma- Aldirich). Para la preparación de la solución de Folin, se realizó una dilución 1:20 empleando etanol; el bicarbonato de sodio (Na₂CO₃) se preparó a una concentración de 7.5 % en 10 mL de etanol. Los resultados se reportaron en mg-equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (mg EGA/ g muestra); para el cual se realizó una curva de calibración con ácido gálico a una concentración de 600 mg/mL en etanol.

Los extractos de *G. viscosum* (Kunth) se prepararon a una concentración de 100 mg/mL en etanol. Para determinar el contenido de taninos se agregaron 100 µL

de muestra del extracto, 500 μL de solución de Folin y 400 μL de (Na_2CO_3); finalmente se dejó reaccionar en la oscuridad por 30 min y se llevó al lector de microplacas (Epoch- BioTeK Instrument) a una absorbancia de 765 nm.

El análisis se efectuó por triplicado y se ocupó el programa Microsoft Excel 2013.

7.3. Saponinas.

Para esta prueba *in vitro*, se utilizaron los extractos de la planta *G. viscosum* (Kunth); se emplearon eritrocitos humanos tipo O positivo.

7.3.1 Preparación de Eritrocitos.

Se empleó sangre humana fresca tipo “O” (+) de un donador sano. La sangre se depositó en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 2% como anticoagulante, se mezclaron y agitaron cuidadosamente con el fin de no lisar a los eritrocitos; la sangre se centrifugó por 10 min a 1500 rpm; una vez separados los eritrocitos fueron lavados con solución salina isotónica (0.9%). Posteriormente los eritrocitos fueron diluidos al 4% en solución salina al 0.9% y reservados para su posterior uso (Girón, 1992).

7.3.2 Determinación de saponinas.

7.3.3 Extracción.

Para poder extraer la saponinas de cada extracto de *G. viscosum* (Kunth), se pesaron 10 mg, posteriormente se le adicionó 1000 μL de etanol, y se llevó a un agitador orbital (Labnet International, Inc.) por 30 min.

7.3.4 Cuantificación de saponinas.

Para la cuantificación de saponinas se empleó la técnica descrita por Girón, (1992). Se emplearon microplacas de 96 pozos, se colocaron 50 μL de PBS en cada pozo. Se agregó al primer pozo 50 μL de saponinas obtenidas en la extracción, para realizar diluciones seriadas de orden dos; posteriormente a cada pozo se le adicionó 50 μL

eritrocitos humanos previamente preparados como se indicó en el párrafo anterior. Finalmente se incubaron por una hora a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo, se prosiguió a la observación para determinar la máxima dilución que presentó hemólisis.

A continuación se estableció el título de hemólisis empleando la siguiente fórmula:

Titulo= 2^n donde n representa el último pozo que presentó hemólisis.

En una dilución seriada se tiene la fórmula:

$$\frac{\text{Concentración del extracto}}{2^n}$$

Por definición los μg obtenidos del estándar de saponinas es equivalente a las 10 unidades Hemolíticas (U.H). Las unidades asignadas en el método se definieron como unidades hemolíticas por miligramo de muestra (U.H/mg de muestra).

7.4. Determinación de Taninos.

Los taninos fueron extraídos a partir de los extractos de *G. viscosum* (Kunth); se pesaron 9 mg de cada extracto y se le adicionaron 2.25 mL de metanol puro, se agitaron durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se tomaron 0.5 mL del sobrenadante de la extracción, se le adicionaron 2.5 mL de vainillina al 0.5% en metanol acidificado; posteriormente se dejó reaccionar por 45 min a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo se prosiguió a medir la absorbancia a 500 nm en un espectrofotómetro (Epoch- BioTeK Instruments). Anterior a este procedimiento, se realizó una curva de calibración empleando + Catequina (Sigma-Aldrich), como estándar y se calculó la concentración de taninos en la muestra (Price y Buttler, 1998).

Cada análisis se efectuó por triplicado y se ocupó el programa Microsoft Excel 2013.

La concentración total de taninos se calculó utilizando la fórmula 1, los resultados se reportaron en miligramos equivalentes de Catequina por gramo de muestra.

Fórmula 1. $\text{Mg eq cat/g} = (\text{conc.calc (mg/mL)}) \times 2.5 \text{ mL de etanol/g muestra de extracto.}$

7.5. Análisis estadístico.

En las pruebas ABTS, DPPH, fenoles totales y taninos se efectuó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con post test de Bonferrioni, utilizando el programa GraphPad Prism 5 (2010).

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Extractos obtenidos.

Se obtuvieron extractos de hojas y flores de *Gnaphalium viscosum* (Kunth), con el método de maceración. El porcentaje de rendimiento se calculó según la fórmula 2, mostrada en la figura 7; en la tabla 6 se presentan los resultados de peso en gramos y porcentajes de rendimiento obtenidos de la extracción de las hojas y flores; mostrando tener un mayor rendimiento el extracto acetato de etilo, observándose que la parte morfológica de la flor mostró ser el extracto más eficiente en la extracción, debido a que presentó un rendimiento de 18.21 g y 3.6%, sin embargo, también la hoja tuvo un buen rendimiento, con un 7.32 g y 5.23% ; así mismo el extracto metanol flor mostró un buen rendimiento, obteniendo 13.47g y 2.96%, siendo el extracto de hexano el menos eficiente al realizar la extracción, debido que obtuvo un bajo rendimiento tanto en la flor y hoja, con 6.90 g y 1.93 g respectivamente.

Tabla 6. Rendimiento de los extractos obtenidos de *Gnaphalium viscosum* (Kunth).

Parte	Hexano		Acetato de etilo		Metanol	
	g	%	g	%	g	%
flor (500 g)	6.903	1.380	18.210	3.640	13.479	2.696
hoja (140 g)	1.933	1.380	7.325	5.230	5.437	3.88

Figura 7. Fórmula empleada para calcular el rendimiento obtenido de los extractos.

Fórmula 2:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Masa de extracto seco}}{\text{Masa material vegetal}} \times 100$$

8.2. Actividad antioxidante.

Se evaluó la actividad antioxidante *in vitro* del extracto metanólico (MeOH), acetato de etilo (AcOEt) y hexánico, obtenido de las hojas y flores de *Gnaphalium viscosum* (Kunth); para realizar dicho análisis cualitativo, se utilizaron los métodos ABTS•+ y DPPH•. En las Figuras 8 y 9 se muestran los resultados de actividad antioxidante, expresada en porcentaje de atrapamiento de radicales con su respectiva desviación estándar, para cada extracto; se observó que el extracto acetato de etilo y metanólico de hoja tuvo mayor capacidad de inhibición sobre el radical ABTS•+ (Figura 8), mientras que el extracto hexánico fue el que presentó menor inhibición sobre el radical ABTS•+ y DPPH• (Figura 9).

Los resultados expuestos indican que el extracto metanólico, hexánico y acetato de etilo de hoja presentaron una mayor captación sobre el radical ABTS•+; sin embargo, el extracto metanólico fue el que presentó mayor capacidad antioxidante con un 92.89% de atrapamiento, mostrando una considerable inhibición sobre el radical ABTS•+, no siendo estadísticamente significativo ($P > 0.05$) al compararlo con el extracto acetato de etilo, el cual tuvo una actividad antioxidante del 89.18%; sin embargo, el extracto hexánico fue el que presentó menor actividad en la prueba ABTS•+, mostrando una capacidad del 41.44%, indicando diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) con respecto a los dos extractos (Figura 8). Por otra parte, en la prueba DPPH• también se presentó una inhibición considerable, siendo el extracto metanólico el que obtuvo mayor inhibición en el radical, mostrando un 73.12%, seguido del extracto acetato de etilo con un 66.50%, no presentando diferencia estadística significativa entre estos dos extractos; finalmente el extracto hexánico mostró una menor inhibición en dicho radical, obteniendo una capacidad de atrapamiento del 18.44% siendo estadísticamente significativo ($P < 0.05$) en relación a los extractos de metanol y acetato de etilo (Figura 8).

El extracto de flor también obtuvo resultados relevantes en la disminución de ambos radicales, presentando gran actividad antioxidante el extracto metanólico con 92.89%, seguido del acetato de etilo con 89.50 %, inhibiendo considerable el radical ABTS•+; sin embargo, no se presentó diferencia estadística significativa entre estos dos valores ($P > 0.05$); el extracto con menor actividad antioxidante fue el hexánico con

47.09% mostrando diferencia estadística significativa al compararlo con los otros dos disolventes ($P < 0.05$) (Figura 9).

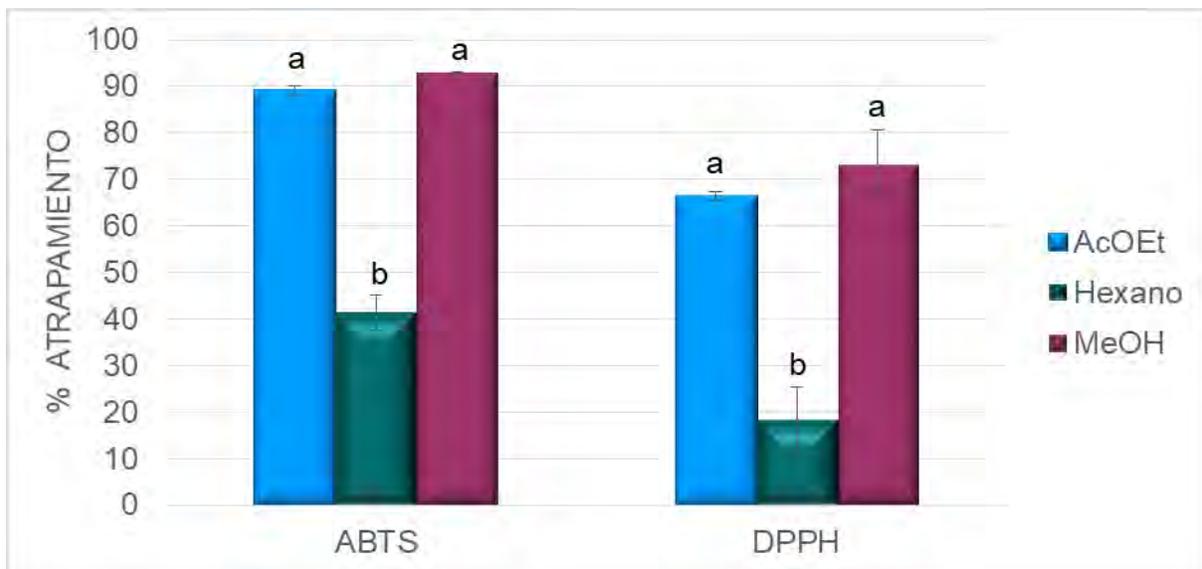


Figura 8. Actividad antioxidante de extracto de hoja de *Gnapthium viscosum* (Kunth). Los resultados son el promedio de tres pruebas independientes \pm desviación estándar. Los disolventes para preparar el extracto fueron acetato de etilo (AcOEt), metanol (MeOH), y hexano.

a,b,c Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) entre los extractos.

Letras iguales indican que no hay diferencias estadística significativa ($P > 0.05$) entre lo extractos.

Por otro lado, en la prueba DPPH• se observó que de manera similar el extracto metanólico y acetato de etilo fueron los que presentaron mayor actividad 85.53% y 81.74% respectivamente, no mostrando diferencia estadística significativa entre ellos ($P > 0.05$); finalmente el extracto hexánico fue el que presentó menor actividad con 39.96%, sin embargo, mostró diferencia estadística significativa comparado con los disolventes de acetato de etilo y metanol ($P < 0.05$) (Figura 9).

Al realizar una comparación entre las dos partes morfológicas estudiadas, se observó que aunque el extracto hexánico fue el que presentó menor actividad antioxidante fue el que mostró diferencia estadística significativa entre la flor y la hoja,

por otro lado, al comparar el extracto metanólico y acetato de etilo no se presentó diferencia estadística significativa entre las dos partes morfológicas.

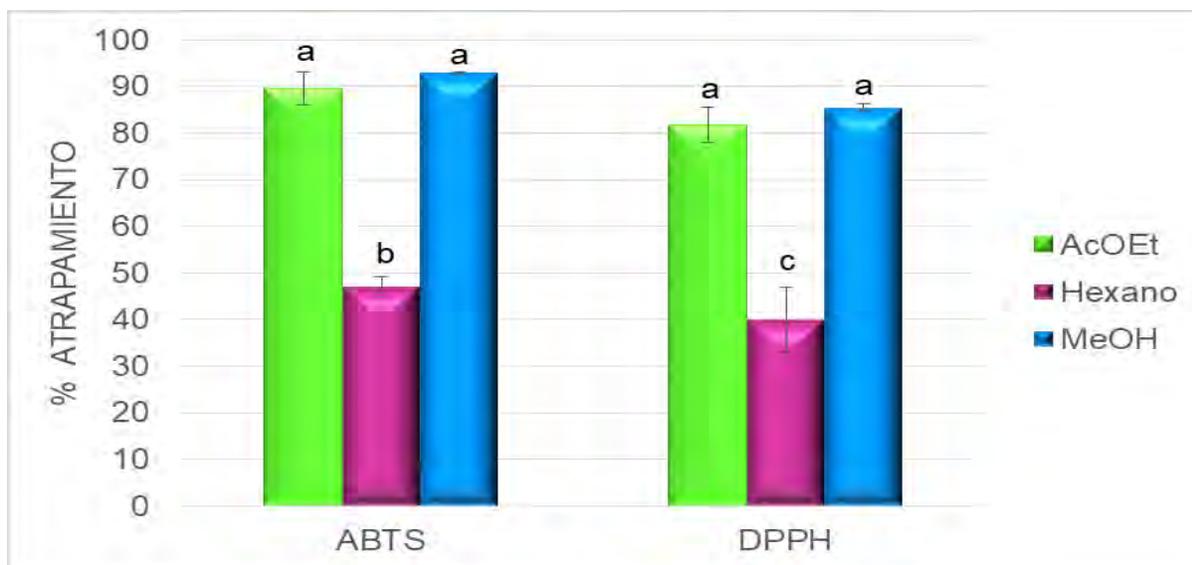


Figura 9. Actividad antioxidante de extracto de flor de *Gnapthium viscosum* (Kunth). Los resultados son el promedio de tres pruebas independientes \pm desviación estándar. Los disolventes para preparar el extracto fueron acetato de etilo (AcOEt), metanol (MeOH), y hexano.

Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) entre los extractos.

Letras iguales indican que no hay diferencias estadística significativa ($P > 0.05$) entre lo extractos.

Los resultados obtenidos muestran que los extractos de hoja y flor por medio del método DPPH• tienen valores inferiores en el porcentaje de inhibición con respecto al método ABTS•+ lo que sugiere que la prueba de ABTS•+, presenta una actividad antioxidante mayor que la obtenida por la prueba DPPH•. Estos resultados concuerdan con el estudio de Gaviria *et al.* (2014) en donde especies pertenecientes a la familia Asteraceae obtuvieron actividad antioxidante superior en los extractos metanólicos a través del ensayo ABTS•+ que por el de DPPH•, sin embargo, en el estudio realizado por Alarcón García *et al.* (2013) empleando la técnica DPPH•, encontró mayor actividad antioxidante en la fracción etanólica de las inflorescencias de *Gnapthium meridanum* (*Gnapthium cf. Polycephalum Michx*), de estas fracciones obtuvieron 95.55% de captación del radical; por otro lado en el presente trabajo se

obtuvo en la misma prueba un 85.53% en el extracto metanólico de flor, aunque se trabajó con el mismo género de planta se obtuvieron resultados diferentes estas variedades pueden deberse principalmente a que se emplearon diferentes métodos de extracción las diferencias entre las dos especies, cómo tiempo de colecta, el lugar, condiciones climáticas, así como entre otros factores externos que intervienen en la producción de metabolitos secundarios.

Otra factor importante por el cual hay influencia en la captura de radicales es debido a el tiempo de corrida, ya que los extractos reaccionan lentamente con el radical DPPH• teniendo 30 min para para alcanzar su estado estacionario, lo cual lo pone en desventaja con el radical catión ABTS•+, que alcanza su estado estacionario en menor tiempo, se puede decir, que el curso de la reacción química son meramente distintos, esta diferencia podría estar basada en la reacción reversible del radical DPPH• con fenoles y sus derivados, lo cual llevaría a bajas lecturas de actividad antioxidante (Brand- Willians y Berset, 1997). Sin embargo, Kuskoski *et al.* (2005) menciona que el método del DPPH• *in vitro* permite tener una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas *in vivo*. Este método presenta una excelente estabilidad en ciertas condiciones por presentar un radical libre que puede obtenerse directamente sin una preparación previa, mientras que otros como el ABTS•+, tienen que ser generados tras una reacción que puede ser química, enzimática o electroquímica.

Como se muestra, ambas pruebas presentan diferencias en los resultados, así como ventajas y desventajas en cada uno. Debido a estas variaciones que presentan, se realizó en cada método una correlación entre la capacidad antioxidante y su correspondiente equivalencia en trolox según el porcentaje de actividad antioxidante obtenido. El compuesto 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico (Trolox) es un análogo soluble en agua de la vitamina E (Morales *et al.* 2006) es conocido por su alta capacidad antioxidante y por tanto es utilizado como compuesto de referencia, su actividad antioxidante es expresada como equivalentes trolox (TEAC) principalmente para los métodos de DPPH• y ABTS•+ (Tovar del Río, 2013). Los presentes resultados fueron expresados en equivalentes trolox; el valor TEAC

compara la capacidad captadora de radicales ABTS•+ o DPPH• del extracto respecto al antioxidante sintético trolox.

En la tabla 7 se muestra la actividad antioxidante de los extractos de hoja y flor de *G. viscosum* (Kunth), obtenidos de los ensayos de DPPH• y ABTS•+ expresada en equivalentes trolox. Se observó que los rangos de concentración varían de 13.51 a 30.74 mg TEAC/g en los extractos de hoja y flor para el ensayo ABTS•+ y de 5.67 hasta 24.23 mg TEAC/g en la prueba DPPH•. Se puede observar que en el ensayo ABTS•+ el extracto metanólico de hoja y flor obtuvo concentraciones altas de equivalentes trolox con el valor de 30.74 mg TEAC/g \pm 0.08 en ambos extractos. Por otro lado en el ensayo DPPH• el extracto acetato de etilo y metanólico de flor mostraron altas concentraciones de equivalentes trolox con los valores de 23.18 \pm 0.96 y 24.23 \pm 0.17 mg TEAC/g respectivamente.

Tabla 7. Concentración en equivalentes de trolox de los extractos de hoja y flor de *Gnaphalium viscosum* (Kunth) por el método ABTS•+ y DPPH•. Los resultados son promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar.

Disolvente	PARTE MORFOLOGICA	ABTS AA mg TEAC/ g	PARTE MORFOLOGICA	DPPH AA mg TEAC/ g
Acetato de etilo	Hoja	29.49 \pm 0.25 ^a	Hoja	18.95 \pm 0.27 ^a
	Flor	29.60 \pm 1.05 ^a	Flor	23.18 \pm 0.96 ^a
Hexano	Hoja	13.51 \pm 1.12 ^b	Hoja	5.67 \pm 1.70 ^b
	Flor	15.40 \pm 0.65 ^c	Flor	11.56 \pm 1.71 ^c
Metanol	Hoja	30.74 \pm 0.08 ^a	Hoja	20.78 \pm 1.87 ^a
	Flor	30.74 \pm 0.08 ^a	Flor	24.23 \pm 0.17 ^a

^{a,b,c} Letras diferentes indican diferencia estadística significativa (P<0.05) entre los extractos.

Letras iguales indican que no hay diferencias estadística significativa (P>0.05) entre lo extractos.

En un estudio realizado por Tovar del Rio (2013), determinó la actividad antioxidante de 15 extractos de metanol y 5 extractos de diclorometano de 30 plantas, evaluados mediante el ensayo ABTS^{•+} y DPPH[•]; obtuvo mayor capacidad de captación mediante el ensayo ABTS[•], mostrando rangos de concentración en equivalentes trolox de 21,86 hasta 49,78 µg de trolox/g de extracto para el ensayo DPPH[•] y para el ensayo ABTS^{•+} entre 145,23 y 852,0 µg de trolox/g de extracto, en ambas pruebas obtuvo concentraciones destacadas en equivalentes de trolox en las especies *Topobea cf discolor* y *Alchornea Grandis*; como se puede observar en ambos trabajos, los valores de ABTS^{•+} son mayores que en la técnica con DPPH, esto debido a la baja selectividad del ABTS^{•+}, si la capacidad antioxidante de los extractos se debe a la presencia de ácidos fenólicos, flavonoides y otro tipo de polifenoles, como se reporta generalmente en la literatura (Kumazawa *et al.* 2004; Russo *et al.* 2004; Ahn *et al.* 2007), se debe tener en cuenta que el DPPH[•] es más selectivo que el ABTS^{•+} y, a diferencia de este último, no reacciona con los flavonoides carentes de grupos hidroxilo en el anillo B, ni con ácidos aromáticos que contengan un solo grupo hidroxilo (Roginsky y Lissi, 2005); este hecho explica los valores TEAC inferiores en el método DPPH[•] con respecto al ABTS^{•+}; cabe destacar que los rangos de concentración de equivalentes de trolox fueron mayores en ambas técnicas, comparado con los resultados obtenidos en este estudio; sin embargo, en el estudio de Alarcón-García (2013) donde evaluó la capacidad antioxidante de las hojas e inflorescencias de *Gnaphalium meridanum* (*Gnaphalium cf. Polycephalum* Michx.) mediante la prueba DPPH[•], obtuvo mayor captación en equivalentes de trolox de las fracciones de la inflorescencia en etanol, con 16.59% de captación relativo a trolox; como se puede observar en el presente estudio, la mayor captación de trolox lo obtuvo el extracto metanólico de flor con 24.23 mg TEAC/ g, cabe destacar que ambos resultados presentaron una mínima variación en la captación de radical DPPH[•], esto puede deberse a que se empleó un disolvente diferente, así como especie de planta, sin embargo, en ambos trabajos la mayor captación del radical la obtuvieron de las flores; esto principalmente se puede deber a que esta parte morfológica presenta mayor contenido de compuestos fenólicos.

8.3 Determinación de Fenoles totales.

En los presentes resultados se determinó el contenido de fenoles con el fin de correlacionar aquellos extractos que tengan un alto contenido de fenoles con los que presentaron una alta actividad antioxidante; obteniéndose que el extracto con mayor contenido de fenoles totales en fue el extracto metanólico de flor (101.227 ± 2.104 mg EAG/g), mientras que el extracto hexánico de hoja fue el que presentó menor contenido (22.72 ± 1.25 EAG/g) mostrando diferencia estadística significativa en ambos casos de ($P < 0.05$); por otro lado, los extractos de hoja de acetato y metanol presentaron mayor concentración de fenoles (53.46 ± 1.56 y 88.18 ± 3.46 EAG/g) respectivamente, no mostrando diferencia estadística significativa ($P > 0.05$), mientras que el extracto hexánico presentó menor contenido, indicando diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) (Tabla 8).

Tabla 8. Contenido de fenoles totales de extractos hoja y flor de *Gnaphalium viscosum* (Kunth) expresado en equivalentes de ácido gálico (EAG). Los resultados son promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar.

Disolvente	hoja	flor
	mg EAG/ g muestra	mg EAG/ g muestra
Hexano	22.72 ± 1.25^a	36.23 ± 0.06^a
Acetato de etilo	53.46 ± 1.56^b	88.18 ± 3.46^b
Metanol	53.06 ± 2.10^b	101.22 ± 2.10^c

^{abc} Letras diferentes indica diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) entre los extractos.

Letras iguales indican que no hay diferencias estadística significativa ($P > 0.05$) entre lo extractos.

Como se puede observar en los resultados, los extractos de acetato de etilo y metanólico de flor fueron los que presentaron gran contenido de compuestos fenólicos, teniendo una clara relación con la actividad antioxidante que presentaron; en un estudio realizado por Uddin *et al.* (2017) donde utilizó extractos para evaluar el contenido de fenoles de las partes aéreas de *Gnaphalium luteoalbum* L. hallando que

el extracto de metanol fue el que mostró mayor contenido de fenoles totales con 115,96 mg EAG / g; observándose una mínima diferencia entre el contenido de fenoles de *Gnaphalium luteoalbum* L. y el extracto de estudio.

Por otra parte, los extractos de acetato de etilo y metanólico de hoja no mostraron gran contenido de fenoles, sin embargo, presentaron actividad antioxidante considerable, esto podría ser indicador de que la planta de estudio posee un efecto combinado de diversos factores, esto se relaciona directamente a la presencia de otros tipos de metabolitos secundarios; esto concuerda con lo planteado por Hossain y Sha, (2015) quienes indican que no se puede considerar que la actividad antioxidante se deba solo a la presencia de compuestos fenólicos, puesto que en su composición química pueden existir otros metabolitos secundarios, y debido a su estructura contribuyan a su eficacia antioxidante. Las correlaciones no son completamente lineales, porque el método de Folin-Ciocalteu es específico para compuestos fenólicos, y la actividad antioxidante también puede ser exhibida por compuestos no fenólicos (MacDonald-Wicks *et al.* 2006; Asami *et al.* 2003).

Lo anterior se hace evidente en el estudio realizado por Gutiérrez-Avella *et al.* (2008) en donde utilizó extractos metanólicos de *Amaranthus hybridus* L., *Brassica rapa* L., *Cosmos bipinnatus* Cav., *Cynodon dactylon* Pers., *Desmodium molliculum* DC., *Ipomoea purpurea* Roth., *Malva parviflora* L., *Medicago polymorpha* var. *vulgaris* Benth., *Oxalis decaphylla* H.B. & K., *Parthenium hysterophorus* L., *Sanvitalia procumbens* Lam., *Simsia amplexicaulis* Pers., *Sorghum halepense* Pers., *Tithonia tubiformis* Cass, de los cuales solo *D. molliculum* presentó relación entre el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante, puesto que las demás muestras tuvieron variaciones en su capacidad antioxidante, la cual era superior a lo esperado, o por el contrario, una baja actividad que no se relacionaba con el contenido de compuestos fenólicos. Cabe destacar que no se encontraron estudios de fenoles totales realizados en especies del género *Gnaphalium*, sin embargo, se hallaron estudios relacionados con la familia Asteraceae la cual pertenece *G. viscosum* (Kuth); de acuerdo a los resultados obtenidos y estudios previos fundamentan que hay una pequeña fracción de flavonoides contenido en los compuestos fenólicos, lo cual es posible que se presenten interacciones antagonistas o sinergistas entre estos y los

compuestos fenólicos, así como de otro metabolitos que pueden afectar la actividad antioxidante (Odabasoglu *et al.* 2005). Por otro lado, se observó que los extractos hexánicos de hoja y flor tuvieron una estrecha relación entre el menor contenido de compuesto fenólicos y la baja actividad antioxidante que presentaron.

8.4 Determinación de Saponinas.

En la tabla 8 se muestran los resultados del contenido de saponinas de cada extracto; las unidades asignadas a la hemólisis se definieron en unidades hemolíticas sobre miligramos de muestra. Como se puede observar, el único extracto que presentó actividad hemolítica fue el extracto metanólico de flor con una actividad de 170.940 ± 0 UH/mg; se asume que la presencia de saponinas tienen un efecto directo sobre los eritrocitos, los cuales se hemolizan y se sedimentan quedando solo una solución blanca, este resultado concuerda con lo planteado por Medinilla, (1993) en donde plantea que si los glóbulos rojos se hemolizan y la solución se torna transparente, se asume que el resultado es positivo; sin embargo, los extractos acetato de etilo y hexano de ambas partes morfológicas no presentaron actividad hemolítica lo cual, nos indica que hay ausencia de saponinas.

Tabla 9. Actividad hemolítica de extractos de hoja y flor *Gnaphalium viscosum* (Kunth). Los resultados son promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar.

Extracto	Parte morfológica de la planta	Saponinas UH/mg mtr
Metanol	hoja	NI
	flor	170.940 ± 0 UH/mg
Acetato de etilo	hoja	NI
	flor	NI
Hexano	hoja	NI
	flor	NI

*NI: No identificado

Una de las razones por las que los últimos extractos pudieron haber tenido ausencia de saponinas es debido a que estos son de mediana y baja polaridad, ya

que las saponinas al ser de carácter glicosídico son insolubles en solventes apolares Lurssen, (2001); por otra parte, existen diversas técnicas para la extracción de saponinas en la cual sobre salen el uso de alcoholes de bajo peso molecular, así como, el uso de metanol, butanol y agua, los cuales han sido reportados como solventes para su extracción; en *Agave lechuguilla* se ha reportado la extracción con metanol y etanol (Domínguez,1973;Hernández *et al.* 2005); de acuerdo al estudio realizado por Lurssen, (2001) utilizó la técnica de hemolisis utilizando extractos polares de las partes de flor, tallo y hoja de la *Yucca elephantipes*, donde obtuvo resultados positivos en todas las muestras, siendo el extracto de flor el que presentó mayor contenido de saponinas y así mismo mayor hemolisis, este concuerda con el resultado obtenido en este estudio, teniendo solo como diferencia el empleo del tipo de solvente el cual fue metanólico, pero cabe mencionar que este es catalogado como el segundo solvente con polaridad más cercana a la del agua.

Por otra parte, la ausencia de saponinas podría deberse a que están presentes en ciertas familias, según la literatura consultada, las saponinas esteroidales son más abundantes por lo general en familias de la clase monocotiledónea, como son: Liliacea (Agavaceae), Dioscoreaceae y Amaryllidaceae. En las dicotiledóneas, se les ha encontrado en las familias Solanaceae y Scrofulariacea (Hostettmann *et al.* 1991), la razón por la cual la presencia de saponinas fue escasa es debido a que la planta *G. viscoum* (Kunth), pertenece a la familia Asteraceae; así mismo, no hay reportes de presencia de saponinas en algunas especies de del género *Gnaphalium*. En el estudio fitoquímico realizado por VillaGómez Ibarra *et al.* (2001) la especie *G. oxyphilum* tuvo resultados negativos en saponinas; sin embargo, cabe señalar que la presencia o ausencia de saponinas en la familia Asteraceae es debido a factores externos tales como, el tipo de cultivo, edad de la planta, estado fisiológico, la localización geográfica o el órgano vegetal (Baumann *et al.* 2000); esto se hace evidente en el estudio realizado por Galindo *et al.* (2011) donde reportó presencia de saponinas en la familia Asteraceae en *Tithonia diversifolia* pero en un estudio realizado por Srividya *et al.* (2009) no encontró estos compuestos en la familia Asteraceae en plantas estudiadas en el sur de la India.

8.5 Determinación de Taninos.

En la tabla 10 se muestran los resultados de contenido de taninos de cada extracto de *G. viscoum* (Kunth); apreciándose que el extracto hexánico de flor presenta el mayor contenido de taninos, mostrando 165.75 Mg eq cat/g mtra, siendo estadísticamente significativo ($P < 0.05$); sin embargo, el extracto metanólico fue el que obtuvo menor contenido de taninos con 56.34 ± 1.92 Mg eq cat/g mtra, siendo también estadísticamente significativo; por otro lado, en la hoja el extracto metanólico presentó mayor contenido de taninos, obteniendo 86.61 ± 3.51 Mg eq cat/g mtra siendo estadísticamente significativo ($P < 0.05$); mientras que el extracto hexánico y acetato de etilo fueron los de menor contenido con 1.64 ± 0.27 Mg eq cat/g mtra, no presentaron diferencia estadística significativa ambos extractos.

Tabla 10. Contenido de taninos en los extractos hoja y flor de *Gnaphalium viscosum* (Kunth). Los resultados son promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar.

Disolvente	hoja	flor
	mg eq cat/g mtra	mg eq cat/g mtra
Hexano	2.00 ± 0.18^a	165.75 ± 15.82^a
Acetato de etilo	1.64 ± 0.27^a	128.06 ± 17.47^b
Metanol	86.61 ± 3.51^c	56.34 ± 1.92^c

^{abc} Letras diferentes indica diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) entre los extractos.

Letras iguales indican que no hay diferencias estadística significativa ($P > 0.05$) entre lo extractos.

Los resultados obtenidos tienen similitud con lo obtenido por de la Cruz-Leyvaa *et al.* (2017) quienes demostraron un mayor contenido de taninos en el extracto acuoso y etanólico de flor, que en el de hoja de la planta *Solanum marginatum*, sin embargo, en este estudio presentó mayor contenido de taninos en contraste con el extracto de flor de *Solanum marginatum* donde obtuvo 0.015 mg eq cat/g peso seco y menores comparado con el trabajo de Zapata *et al.* (2013) 502,73 mg eq cat/ 100g de fruta fresca a partir de los extractos del fruto de *Psidium araca* (Guayaba Agria). Como

se puede observar hay claras diferencias cualitativas y cuantitativas en los estudios, y aunque los taninos se pueden encontrar fácilmente en el reino vegetal, algunos son más abundantes en las frutas como las uvas; hay diversos factores por los que el contenido puede variar entre especies de plantas, ya que de acuerdo a la literatura, los vegetales y frutos tienen la capacidad de acumular taninos en la totalidad de la planta de la que provienen: semillas, frutos, madera, raíz, hojas, en condiciones normales, los taninos vegetales representan del 2 al 7% del peso fresco de la planta, esta cantidad representa la suma de todos los tipos de taninos presentes en el vegetal; no obstante, las concentraciones pueden aumentar debido al estrés producido por el ataque de patógenos (Haslam, 2007); otros factores que afectan la presencia de taninos en vegetales son las condiciones ambientales (Torchio *et al.* 2010), genéticas o estado de maduración del fruto o la planta (Bindon y Kenedy, 2011); hay que destacar que las variaciones de este trabajo con las de los otros autores mencionados es debido a que se emplearon diferentes géneros de plantas, solventes y partes morfológicas por lo que estos también son factores por los que hay una variabilidad en la concentración de taninos.

8.6 Determinación de citotoxicidad del extracto en líneas celulares.

Los resultados de citotoxicidad presentados en las figuras 10,11,12 y 13 evidencian que ambas líneas celulares mostraron efecto citotóxico ante el extracto empleado, sin embargo, hay claras diferencias en su acción citotóxica así como en la viabilidad; se observó una variable actividad citotóxica de los extractos sobre las líneas celulares estudiadas, siendo más susceptible ante a la acción citotóxica del extracto la línea Mda, mientras que la línea celular SiHa mostró un menor efecto citotóxico ante el extracto probado. Se expone que hay un efecto citotóxico al observar una disminución en la viabilidad celular en función de la concentración del extracto. En la tabla 11 y 12 se muestran los resultados de las DI_{50} de los extractos de hoja y flor de *G. viscosum* (Kunth) para cada una de líneas celulares malignas estudiadas. De acuerdo a los resultados obtenidos, se observó que 6 de los 12 extractos de *G. viscosum* (Kunth) presentaron mayor citotoxicidad sobre ambas líneas celulares estudiadas.

En la tabla 11 se observó que el extracto que presentó mayor citotoxicidad en la línea celular SiHa fue el extracto hexánico de hoja contando con una DI_{50} de 346 $\mu\text{g/mL}$, en contraparte, los extractos que presentaron menor citotoxicidad fueron los de acetato de etilo y metanólico, ya que obtuvieron una DI_{50} de 1610 y 1240 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente; Cabe señalar que no hay estudios previos de citotoxicidad del género *Gnaphalium* sobre la línea celular SiHa, así como en líneas del mismo linaje celular, sin embargo, hay estudios en los cuales han probado extractos de diferentes especies de plantas sobre líneas afines a la línea celular SiHa, tal como en el estudio realizado por Patel *et al.* (2009) donde utilizó extracto metanólico del fruto de *Solanum nigrum* sobre la línea celular HeLa, la cual mostró una DI_{50} de 265.0 mg/mL, la actividad citotóxica del extracto de *Solanum nigrum* fue aproximadamente 1.3 veces más alta comparada al extracto hexánico y 6 veces mayor comparado con el extracto metanólico y acetato de etilo de *Gnaphalium viscosum* (Kunth), aunque la diferencia de citotoxicidad fue mínima se debe destacar que los factores por el cual hubo variación en la DI_{50} es debido a que se utilizó una especie distinta de planta, disolvente, línea celular y parte morfológica diferente. Por otra parte, el extracto de acetato de etilo flor en las células SiHa fue el que presentó mayor efecto citotóxico, debido a que tuvo una DI_{50} de 596.1 $\mu\text{g/mL}$, siendo los extractos hexánico y metanólico los que mostraron menor citotoxicidad, teniendo una DI_{50} de 1000 y 1158 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente; en un estudio realizado por Nieto *et al.* (2008) donde utilizó extracto etanólico de *S. rostratum* sobre la línea celular HeLa, obtuvo una DI_{50} de 127.5 $\mu\text{g/mL}$ en 48 h, siendo casi 4.6 veces más citotóxico que el extracto de acetato de etilo y 9 veces más para los extractos metanólico y hexánico probados en este estudio. Se debe considerar que en ambos estudios se utilizaron disolventes, especie de planta y línea celular diferente, por lo que es una de las razones por las cual hubo variabilidad en los resultados.

En contra parte, los resultados de dosis inhibitorias de la línea celular Mda que se muestra en la tabla 12, se observó que los extractos de hoja en los tres disolventes empleados se obtuvieron efectos citotóxicos mayores.

Tabla 11. Dosis inhibitorias (DI₅₀) de los extractos de hoja y flor de *G. viscosum* (Kunth) sobre la línea celular SiHa. Los resultados son promedio de tres repeticiones.

Línea celular	Extracto (hoja y flor)	Disolvente	DI ₅₀
SiHa	hoja	Hexano	346 µg/ML
		Metanol	1240 µg/ML
		Acetato de etilo	1610 µg/ML
	flor	Hexano	1000 µg/ML
		Metanol	1158 µg/ML
		Acetato de etilo	596.1 µg/ML

Donde el extracto metanólico de hoja fue el extracto que presentó la citotoxicidad más alta, mostrando una DI₅₀ de 238.5 µg/mL, seguido del acetato de etilo con DI₅₀ de 240 µg/mL y por último el extracto hexánico con una DI₅₀ de 345 µg/mL, cabe mencionar que hay estudios citotóxicos del género *Gnaphalium* en la línea adenocarcinoma de mama, como en el estudio realizado por Callacondo-Riva *et al.* (2008) donde evaluaron la citotoxicidad del extracto etanólico de raíces de *Gnaphalium spicatum* el cual resultó ser más activo en la línea celular MCF-7 (adenocarcinoma de mama) presentando una DI₅₀ de 98 µg/mL, mientras que en este estudio se obtuvo una DI₅₀ de 238.5 µg/ mL en el extracto metanólico de *Gnaphalium viscosum* (Kunth) para la línea celular Mda, como se observa, el extracto etanólico de raíces mostro ser más citotóxico que todos los extractos de *Gnaphalium viscosum* (Kunth), aunque ambas plantas pertenecen al mismo género, hubo gran diferencia en la citotoxicidad, esto principalmente pudo deberse a la diferencia de especies, la producción y contenido de metabolitos secundarios, la región y tiempos de colecta , así como, el empleo de diferente método de obtención de extractos, el disolvente empleado, diferente parte morfológica y puesto que ambas línea celulares son del mismo linaje celular el origen es diferente, por lo que puede ser una causa más por la que se obtuvo diferencia en la citotoxicidad. Finalmente, en los extractos de flor sobre la línea celular Mda, obtuvieron menor efecto citotóxico ya que mostraron DI₅₀ mayores

con respecto a los extractos de hoja; el extracto que mostró un mayor efecto citotóxico fue el acetato de etilo con una DI_{50} de 808.8 $\mu\text{g/mL}$, y los extractos con menor efecto fueron para el extracto hexánico y metanólico, teniendo una DI_{50} de 1855.17 y 1568.68 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, este resultado se compara con lo obtenido por Alarcón García *et al.* (2013) donde evaluó la capacidad citotóxica del extracto de acetato de etilo a partir de fracciones de inflorescencias de *Gnaphalium meridanum*, sobre células de macrófagos murinos (J-774), obteniendo una DI_{50} de 120,4 mg/L; como se observa el extracto de acetato de etilo de *G. meridanum* fue aproximadamente 6.7 veces más citotóxico que el extracto de acetato de etilo *G. viscosum* (Kunth), aunque ambos extractos pertenecen al mismo género de planta, el efecto citotóxico fue significativamente diferente; esto principalmente se debe a que se utilizaron líneas celulares de diferente origen, así como de otros factores secundarios los cuales ya se han mencionado anteriormente.

Tabla 12. Dosis inhibitorias media (DI_{50}) de los extractos de Hoja y Flor de *G. viscosum* (Kunth) sobre la línea celular Mda. Los resultados son promedio de tres repeticiones

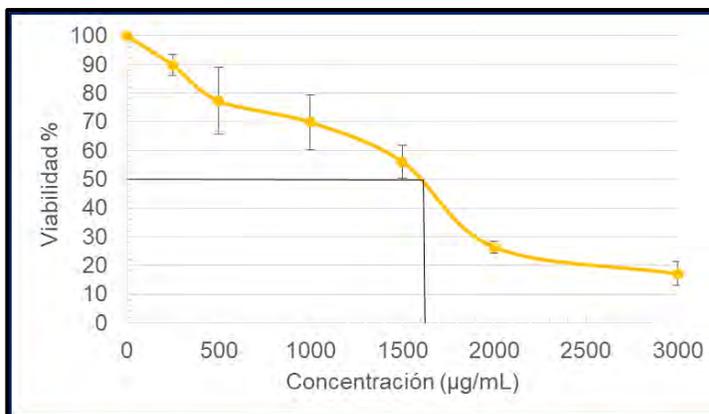
Línea celular	Extracto (hoja y flor)	Disolvente	DI_{50}
Mda	hoja	Hexano	345 $\mu\text{g/mL}$
		Metanol	238.5 $\mu\text{g/mL}$
		Acetato de etilo	240 $\mu\text{g/mL}$
	flor	Hexano	1855.17 $\mu\text{g/mL}$
		Metanol	1568.68 $\mu\text{g/mL}$
		Acetato de etilo	808.8 $\mu\text{g/mL}$

A continuación en la figura 10-A se muestra al extracto acetato de etilo hoja sobre la línea celular SiHa; se observa que a la concentración más baja de 250 $\mu\text{g/mL}$ la viabilidad solo logra disminuir un 89.71%, sin embargo, al aumentar la concentración la viabilidad decrece significativamente a la concentración de 1500 $\mu\text{g/mL}$, teniendo

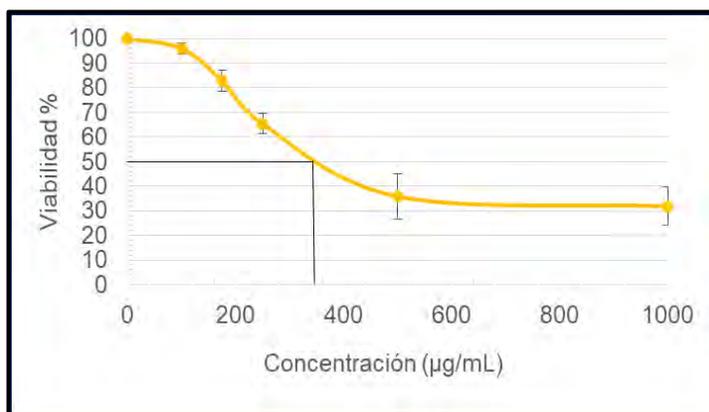
un porcentaje de inhibición celular del 56.10% y al llegar a la máxima concentración empleada de 3000 µg/mL, la viabilidad celular logra disminuir hasta un 17.09%; a partir de esta concentración la curva de viabilidad sigue disminuyendo por lo que al emplear otra dosis de extracto se tendría un efecto sobre la viabilidad. Sin embargo, hay que destacar que al aplicar dosis más altas de extracto implica problemas de solubilidad, lo que deriva en aumentar las concentraciones DMSO, el cual podría alcanzar concentraciones que son tóxicas para las células.

En la Figura 10-B se muestra el efecto citotóxico del extracto hexánico de hoja sobre la línea celular SiHa; se observó, que a la concentración más baja probada no hay un efecto significativo sobre la viabilidad, sin embargo, a partir de la concentración 250 µg/mL hay una disminución en la viabilidad de un 65.3%, al llegar a la máxima concentración probada de 1000 µg/mL, se tiene un porcentaje de inhibición en la viabilidad celular de un 68.2%, a partir de dicha concentración se observó que la viabilidad permanece constante.

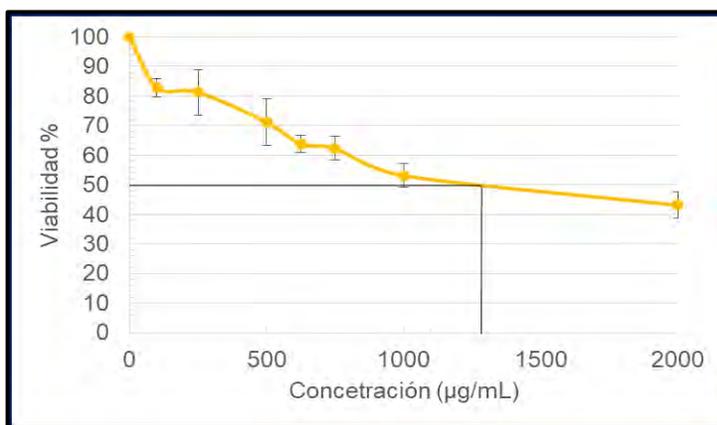
Por otra parte, se puede observar en la figura 10-C al extracto metanólico de hoja, donde se aprecia que a la dosis más baja probada de 100 µg/mL hay poca inhibición en la viabilidad celular ya que solo se reduce a un 17.14%, al aumentar la concentración a 625 µg/mL se muestra una baja significativa en la viabilidad, reduciéndose a un 63.78 %, al llegar a la máxima concentración probada de 2000 µg/mL se tuvo un porcentaje de inhibición de un 56.94%, se observó que a partir de esta concentración la viabilidad podría seguir disminuyendo si se aumentaran las dosis de extracto, sin embargo, al aplicar altas concentraciones de extracto se aumentaría las dosis del DMSO sobre los extractos, lo cual deriva a tener problemas de solubilidad y efectos sobre las células que podrían alterar los resultados.



A) Acetato de etilo



B) Hexano



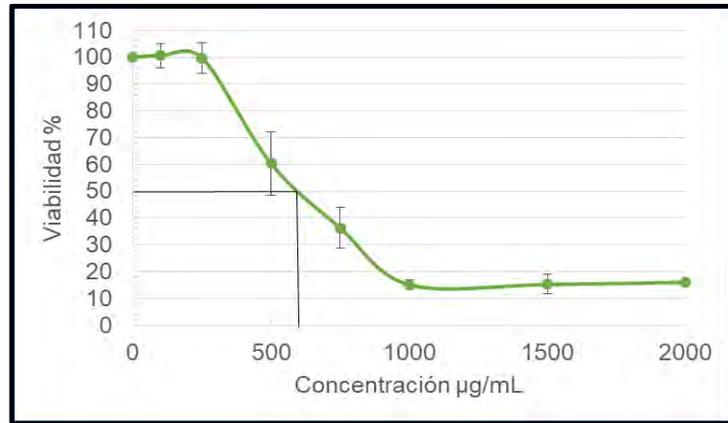
C) Metanol

Figura 10. Efecto Citotóxico del extracto de hoja de *Gnaphalium viscosum* (Kunth) sobre la línea celular SiHa, representado en las gráficas 10-A) Extracto de acetato de etilo, 10-B) Extracto de hexano, 11-C) Extracto de metanol. Los resultados que se muestran, son ensayos independientes de tres repeticiones. Las barras representan la desviación estándar de cada concentración probada, así mismo, se señala la DI_{50} de cada extracto probado.

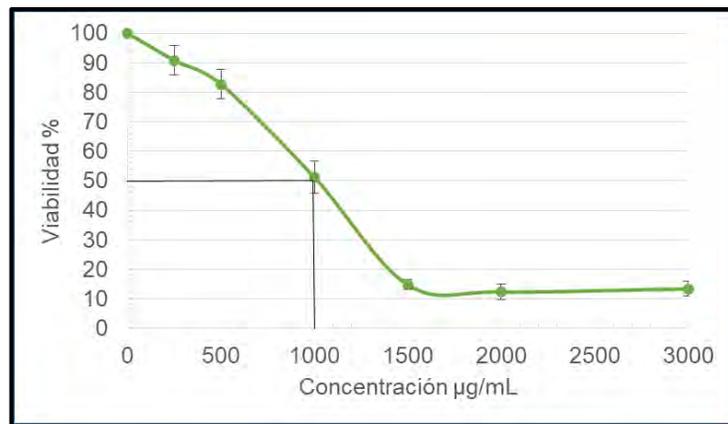
En la figura 11-A se muestran los resultados del efecto citotóxico que tuvieron los extractos de flor sobre la línea celular SiHa; con lo que respecta a la Figura 11-A, se muestra que el extracto de acetato de etilo a concentraciones bajas de 250 µg/mL la inhibición de viabilidad es baja, ya que solo se reduce a un 0.28 %, lo cual no muestra un efecto significativo sobre la viabilidad, sin embargo, la viabilidad empieza a disminuir, al aumentar la concentración a 750 µg/mL reduciéndose a un 36.26%, al llegar a la concentración más alta probada de 2000 µg/mL se tuvo una inhibición en el porcentaje de viabilidad de un 84.04%, a esta última concentración se puede observar que la curva de viabilidad se torna constante.

En la figura 11-B se muestra que el extracto de hexano flor a contracciones bajas no presenta un decremento considerable en la viabilidad, ya que a la más baja concentración probada de 250 µg/mL la viabilidad solo logra inhibirse un 9.2%, nos obstante, al aumentar la concentración a 1500 µg/mL la viabilidad disminuye un 14.74%, decreciendo hasta la concentración máxima probada de 3000 µg/mL con un 86.66 % de inhibición en la viabilidad, a partir de la esta concentración la viabilidad permanece constante, sin embargo, hay que destacar que el extracto hexánico de flor fue el que presentó una mayor inhibición en la línea celular SiHa.

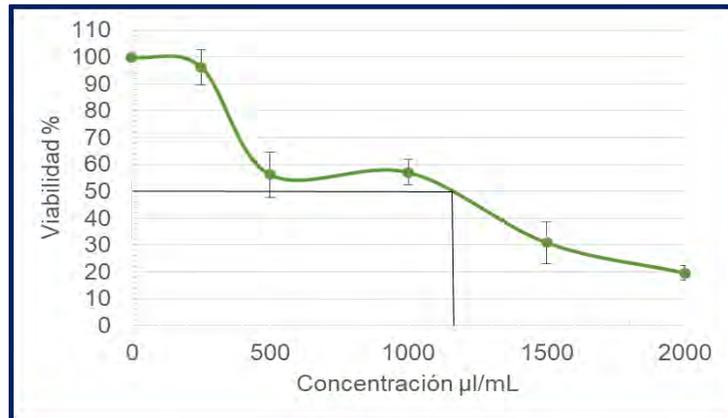
En el caso del extracto metanólico presentado en la Figura 11-C, se observó que a la más baja concentración probada de 250 µg/mL se tiene una baja inhibición en el porcentaje de viabilidad celular, logrando reducirse solo un 3.73%, al aumentar la concentración a 1000 µg/mL el porcentaje de viabilidad disminuye a un 57.02%, se tiene una gran inhibición en la viabilidad al llegar a la concentración máxima probada de 2000 µg/mL inhibiendo la viabilidad a un 80.48%, se observa, que la curva de viabilidad sigue decreciendo por lo que al aumentar la dosis podría tener resultados significativos en la viabilidad.



A) Acetato de etilo



B) Hexano



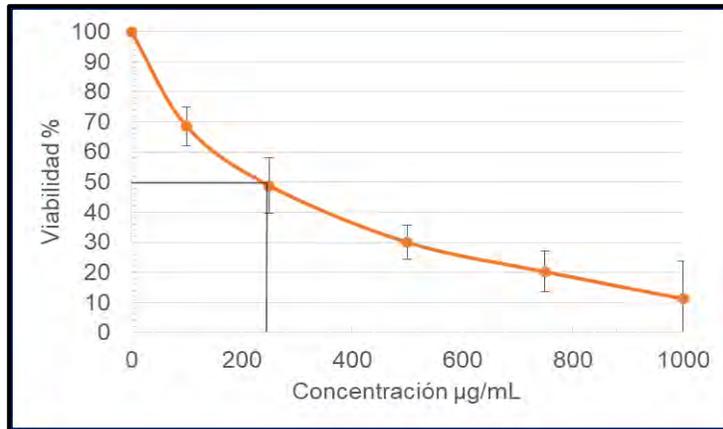
C) Metanol

Figura 11. Efecto Citotóxico del extracto de flor de *Gnaphalium viscosum* (Kunth) sobre la línea celular SiHa, representado en las gráficas 11-A) Extracto de acetato de etilo, 11-B) Extracto de hexano, 11-C) Extracto de metanol. Los resultados que se muestran, son ensayos independientes de tres repeticiones. Las barras representan la desviación estándar de cada concentración probada, así mismo, se señala la DI_{50} de cada extracto probado.

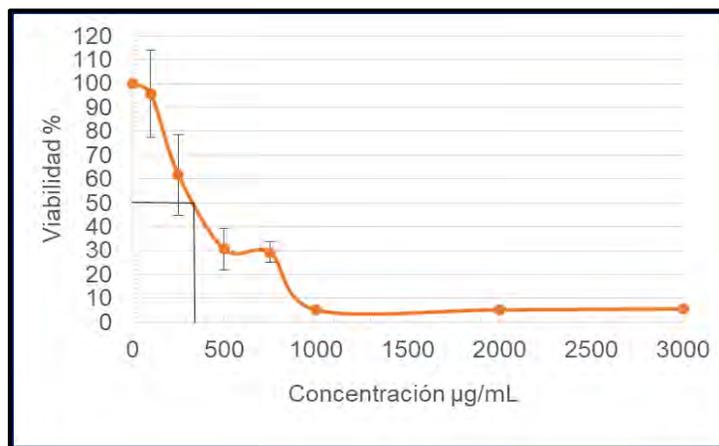
En la figura 12 se muestran los resultados de efecto citotóxico que obtuvieron los extractos de hoja sobre la línea celular Mda; con lo que respecta a la figura 12-A se aprecia que a la concentración más baja probada de 100 µg/mL de extracto acetato de etilo, la viabilidad decrece a un 68.59%, al llegar a 500 µg/mL la viabilidad se reduce hasta un 30.00%, decreciendo considerablemente hasta la concentración máxima probada de 1000 µg/mL donde hay una gran inhibición en la viabilidad celular del 88.74%, en la curva se observa que la viabilidad va decreciendo, por lo que habría una considerable inhibición en el porcentaje de viabilidad si se aumentara la concentración de extracto, lo cual confirma la influencia de las concentraciones sobre la viabilidad celular.

En la figura 12-B se muestra al extracto de hexánico, donde a la concentración más baja de 100 µg/mL la viabilidad solo logra inhibirse un 4.27%, teniendo una baja significativa en la viabilidad a partir de 500 µg/mL obteniendo una viabilidad del 30.65%, la viabilidad decreció conforme se aumentaron las concentraciones, teniendo una alta inhibición en la concentración máxima probada de 3000 µg/mL inhibiendo la viabilidad celular hasta un 94.4%, a partir de esta concentración la curva de viabilidad permanece constante; cabe destacar que este extracto fue el que obtuvo mayor inhibición en la viabilidad sobre la línea Mda, ya que solo mantuvo un 5.58% de células viables.

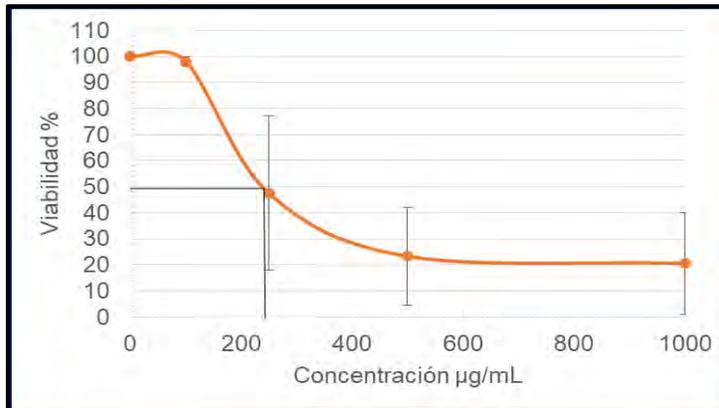
Como se puede observar en las gráfica 12-C el extracto metanólico a la concentración más baja de 100 µg/mL no tuvo efecto significativo en la viabilidad ya que solo se inhibió un 1.96%, al aumentar a 250 µg/mL se tuvo una viabilidad de 47.50 %, logrando inhibición a la concentración máxima probada de 1000 µg/mL con un 79.47 % de inhibición en la viabilidad celular, se observó que a dicha concentración la curva de viabilidad permanece constante; dicho extracto tuvo poca inhibición en la viabilidad ya que mantuvo un 20.53% de células viables.



A) Acetato de etilo



B) Hexano



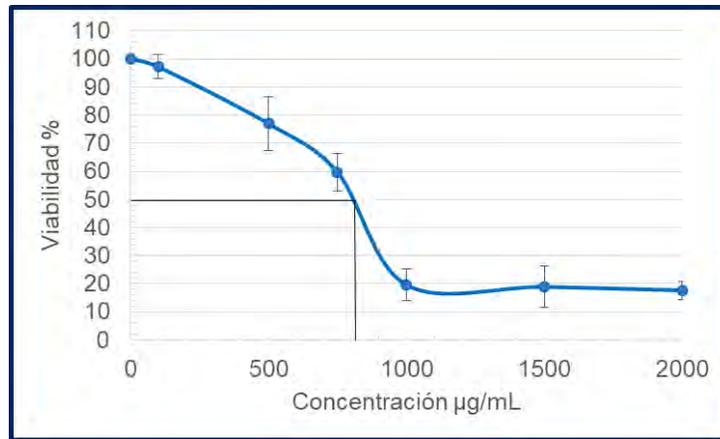
C) Metanol

Figura 12. Efecto Citotóxico del extracto de hoja de *Gnaphalium viscosum* (Kunth) sobre la línea celular Mda, representado en las gráficas 12-A) Extracto de acetato de etilo, 12-B) Extracto de hexano, 12-C) Extracto de metanol. Los resultados que se muestran, son ensayos independientes de tres repeticiones. Las barras representan la desviación estándar de cada concentración probada, así mismo, se señala la DL_{50} de cada extracto probado.

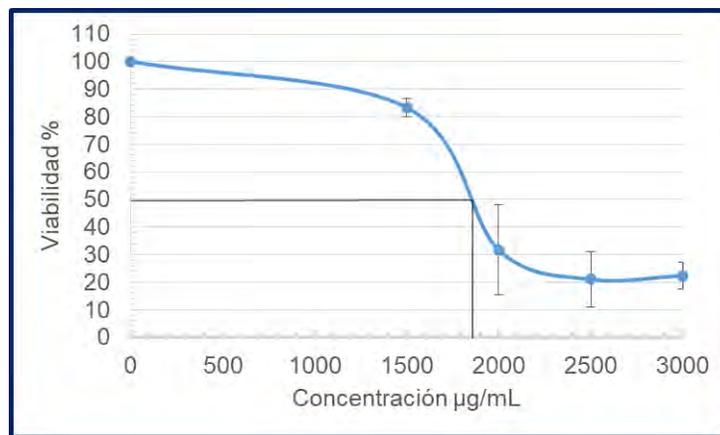
Los resultados del efecto citotóxico de los extractos de flor sobre la línea Mda se indican en la figura 13; en la figura 13-A se muestra que a la concentración más baja probada del extracto acetato de etilo, que fue de 100 µg/mL no hubo efecto significativo en la inhibición de la viabilidad, ya que se inhibió un 2.8%, sin embargo, a la concentración de 750 µg/mL de extracto se tiene una disminución en la viabilidad del 59.64%, pero al aumentar la concentración a 1000 µg/mL la viabilidad disminuye significativamente a un 19.59%, al llegar a la concentración máxima probada de 2000 µg/mL la viabilidad celular logró inhibirse a un 82.35%, a partir de dicha concentración la viabilidad siguió constante; se destaca, que dentro de los extractos de flor en dicha línea celular, fue el que obtuvo mayor porcentaje de inhibición en la viabilidad, ya que mantuvo un 17.65 % de células viables.

El extracto de hexánico presentado en la figura 13- B tuvo efecto sobre la viabilidad hasta la concentración 2000 µg/mL reduciendo la viabilidad solo un 31.75%, al llegar a la concentración 2500 µg/mL la viabilidad solo bajó un 21%, sin embargo, a la concentración máxima probada de 3000 µg/mL la viabilidad logró inhibirse un 77.66%, se observa que la curva de viabilidad asciende un porcentaje mínimo, por lo que al aumentar otra dosis, se podría observar si la viabilidad volvería a descender o mantenerse constante.

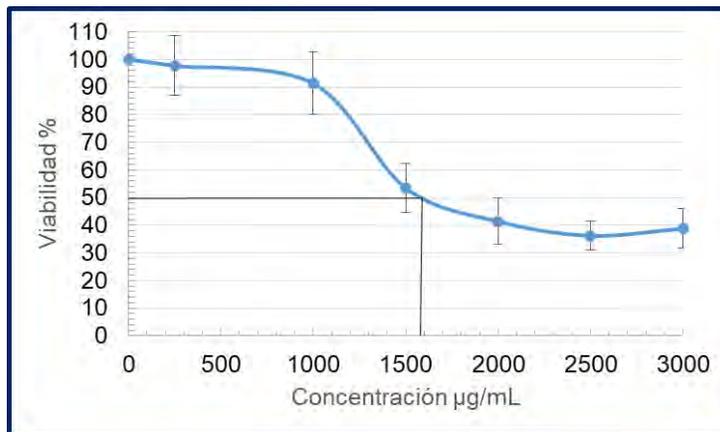
En la figura 13-C se muestra que a los 250 µg/mL de extracto metanólico, que es la concentración más baja probada, obtiene un bajo porcentaje en la inhibición de viabilidad celular, ya que solo logró inhibir un 2.25%, al aumentar la concentración a 1500 µg/mL la viabilidad baja a 53.49%, siendo la concentración 2500 µg/mL donde se presenta una viabilidad a un 36.24 % sin embargo, se observó que en la concentración máxima probada de 3000 µg/mL hay una inhibición en el porcentaje de viabilidad celular del 61.17%, se observa que en esta línea celular se presenta un ligero incremento en la viabilidad a la concentración máxima probada, lo cual podría deberse a un efecto que ya ha sido previamente reportado, tal como lo reportan Stanley y Carver (1977); Valadez-Vega *et al.* (2014) quienes indican que algunas células al ser expuestas a concentraciones altas de metabolitos secundarios promueven mutaciones celulares que ocasiona mayor proliferación.



A) Acetato de etilo



B) Hexano



C) Metanol

Figura 13. Efecto Citotóxico del extracto de flor de *Gnaphalium viscosum* (Kunth) sobre la línea celular Mda, representado en las gráficas 13-A) Extracto de acetato de etilo, 13-B) Extracto de hexano, 13-C) Extracto de metanol. Los resultados que se muestran, son ensayos independientes de tres repeticiones. Las barras representan la desviación estándar de cada concentración probada, así mismo, se señala la DI_{50} de cada extracto probado.

Sin embargo, al aumentar la dosis puede que esta viabilidad descienda o quede constante. Evidentemente los extractos hexano y metanol tuvieron DI_{50} mayores a 1000 $\mu\text{g}/\text{ML}$ lo cual reflejaron un efecto citotóxico menor sobre dicha línea.

El estudio de viabilidad celular mostró que los extractos de *Gnaphalium viscosum* (Kunth) de hoja presentaron un mayor efecto citotóxico respecto a los extractos de flor. Así mismo, los resultados mostraron que en ambas líneas celulares se presentó un efecto dosis-dependiente; observándose que el extracto metanólico de hoja fue el que presentó mayor efecto citotóxico sobre la línea celular Mda, aunque menor pero significativo, el extracto acetato de etilo y hexánico también mostraron actividad citotóxica; en contra parte, la línea celular SiHa fue más susceptible a la citotoxicidad del extracto hexánico hoja y acetato de etilo flor.

La citotoxicidad de los extractos tuvieron comportamientos diferentes lo cual se manifestó de manera significativa sobre las dos líneas celulares; una posible explicación a este resultado es debido a la concentración y composición de los metabolitos secundarios que tiene la planta *G.viscosum* (Kunth). Los estudios fitoquímicos que se realizaron en este trabajo da evidencia a la presencia de diversos de ellos como, las saponinas, taninos y compuestos fenólicos; así mismo, en el presente estudio se observó que los extractos de flor fueron los que obtuvieron mayor contenido de taninos y fenoles, sin embargo, los extractos de hoja presentaron en los tres disolventes, un menor pero significativo contenido de dichos compuestos, la presencia de estos elementos vegetales en los extractos pudieron haber tenido un efecto relevante sobre la viabilidad celular, esto se hace evidente con el estudio fitoquímico realizado por Santana *et al.* (1999) donde muestra la presencia de compuestos polifenólicos y un alto contenido de taninos del extracto acuoso de *Pinus caribaea*, menciona que la presencia de estos compuestos, pueden ser responsables de interacciones entre polifenoles y proteínas importantes en el proceso de viabilidad celular; esta interpretación se sustenta con el trabajo realizado por Ramos *et al.* (1998) donde menciona que los taninos han sido los principales responsables de la interacción de fitocomponentes de los extractos vegetales con proteínas, esta propiedad se debe a la gran cantidad

de grupos hidroxilo fenólicos presentes en su estructura la cual facilita la formación de puentes de hidrógeno entre estos grupos y el oxígeno del grupo carbonilo de los enlaces peptídicos, dicho proceso podría llegar a tener relaciones sinérgicas entre polifenoles y proteínas los cuales son importantes en el proceso de viabilidad celular, además, reportes previos han indicado que los ácidos fenólicos poseen actividad anticancerígena (Wiseman, 2008).

Por otra parte, el contenido de saponinas podrían contribuir al efecto citotóxico sobre las líneas celulares ya que se han reportado efectos citotóxicos de estos compuestos sobre las líneas tumorales A549, HeLa, HL-60, KB, Sparg *et al.* (2004); autores como Pereira *et al.* (2009) fundamentan la presencia de estos compuestos en las hojas de las plantas, esta interpretación se sustenta con obtenido por Hernández Sosa *et al.* (2013) donde obtuvo contenido de saponinas en los extractos acuosos de hoja de *Trichilia hirta* y atribuyó el efecto citotóxico que mostró sobre células de melanoma humano (SK-mel-3) y adenocarcinoma humano de mama (T-47D); en este estudio el extracto metanólico de flor fue el único que presentó contenido de saponinas, sin embargo, no se le puede atribuir totalmente el efecto citotóxico que se obtuvo sobre las líneas celulares estudiadas, ya que los extractos metanólicos de flor obtuvieron menor citotoxicidad, la presencia de saponinas en las diferentes estructuras morfológicas de las plantas, podría ser debido a que las plantas pertenecen a diferente familia, así como, a las condiciones externas en las que se encuentra cada especie. Además, cabe destacar que de acuerdo a la literatura algunas compañías farmacéuticas evitan las saponinas en los ensayos clínicos por considerarlas “*moléculas que distraen*” de los intentos de encontrar compuestos con verdadera actividad antitumoral (Mann, 2002).

La actividad antioxidante y citotóxica que presentaron los extractos, sugiere que la planta que la planta *G. vicosum* (Kunth) posee metabolitos con características polares, con potencial para captar radicales libres y disminuir el porcentaje de viabilidad en las células malignas; esto se muestra en los resultados obtenidos, debido a que los extractos de hoja y flor de *G. vicosum* (Kunth) obtuvieron actividad antioxidante y citotóxica significativa. Esto se hace evidente con la investigación ya mencionada por Montiel-Ortega, (1999) donde aisló al flavonoide 5-hidroxi-3,7-

dimetoxi-flavona a partir de los extractos de las hojas y flores de *G. Viscosum* (Kunth), este compuesto ha sido estudiado por poseer actividad antiinvasiva, lo obtenido por este autor se comprueba con el estudio realizado por Parmar *et al.* (1997) donde menciona que dicho compuesto secundario posee actividad antiinvasiva en células de adenocarcinoma de mama (línea MCF-7); de acuerdo a lo reportado, se ha demostrado la acción anti-proliferativa y anti-carcinogénica, así como el papel de agente quimiopreventivo de los flavonoides, que ha teniendo grandes efectos de inhibición frente a células cancerígenas en humanos como en glándula mamaria y ovario (Hertog *et al.* 1992; Hertog *et al.* 1993; Martínez-Flórez *et al.* 2002); en los resultados obtenidos, el extracto acetato de etilo y metanólico de flor fueron los que presentaron una actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos significativa, estos últimos están relacionados con la capacidad antioxidante, sin embargo, cabe señalar que aunque atribuyeron un efecto en la inhibición de radicales no se le puede atribuir completamente a estos compuestos el efecto citotóxico que tuvieron sobre dichos extractos, debido a que fueron los que presentaron DI_{50} mayores en las dos líneas celulares estudiadas, así como menor capacidad para inhibir el porcentaje de viabilidad celular; en contra parte, los extractos de hoja fueron los que presentaron menor cantidad de compuestos fenólicos, cantidad que no tuvo relación con el efecto antioxidante que obtuvieron, sin embargo, estos extractos mostraron mayor citotoxicidad en la línea celular Mda, no obstante, se observó que aunque el extracto hexánico de hoja tuvo menor inhibición en ambos radicales, comparado con el extracto acetato de etilo y metanólico, fue uno de los extractos que presentó un efecto citotóxico considerable en ambas líneas celulares. Como se observó la citotoxicidad de los extractos se manifestó de una manera desigual en cada línea celular, una posible explicación a estos efectos es debido a que la planta *G. viscosum* (Kunth) al presentar diversos fitocomponentes en las hojas y flores, estos son selectivos en su función, ya que de acuerdo a los resultados se podría decir que el flavonoide que posee esta planta, está actuando en la citotoxicidad de los extractos de hoja y flor sobre ambas líneas celulares, y que además está teniendo un efecto específico en la línea celular Mda que en la línea celular SiHa, de acuerdo a Vernhes *et al.* (2010), la posible

explicación a este resultado es que los fitocomponentes presentes en la planta tienen un blanco de acción molecular, desencadenando así procesos que inhiben la división celular o conlleven a la muerte celular; entonces, se podría deducir que los compuestos encontrados mayoritariamente en la flor como los compuestos fenólicos y taninos están teniendo su blanco molecular sobre la actividad antioxidante que se obtuvo.

En el trabajo realizado por Alarcón-García *et al.* (2013) evidenció que la mayor actividad antioxidante y citotóxica la obtuvo de las inflorescencias y no de las hojas de los extractos y fracciones de *Gnaphalium meridanum*, sin embargo, en el estudio realizado por Callacondo-Riva *et al.* (2008) empleó extractos de *Gnaphalium spicatum* utilizando las cuatro partes morfológicas (hojas, tallo, flores y raíz), observó que el extracto de raíz fue el que presentó un perfil citotóxico; los trabajos anteriores, incluyendo el de este estudio obtuvieron resultados diferentes a pesar de que se utilizó el mismo género de planta, esta diferencia quizá pueda deberse a diversos factores como: los tiempos de recolección, procesamiento de los extractos, los diferentes compuestos activos, las acciones sinérgicas y antagónicas de los compuestos, las diferencias entre las líneas celulares, las técnicas de citotoxicidad empleadas, las diferencias entre las regiones de colecta, entre otros. De acuerdo a Bedascarrasbure *et al.* (2004) la diferencia de actividad biológica y concentración de los compuestos secundarios dependerán del tipo de planta en la cual se llevó la recolección, así como las variaciones abióticas de la región en la que se encuentren.

Los resultados de este trabajo destaca que las plantas pertenecientes a la familia Asteraceae y al género *Gnaphalium* poseen abundancia de metabolitos secundarios, su funcionalidad de estos ha sido causa de diversas investigaciones para contrarrestar el estrés oxidativo lo cual se relaciona directamente con la capacidad antitumoral y anticancerígena.

Como se observó en los resultados, el perfil fitoquímico y citotóxico de extractos de hojas y flores *Gnaphalium viscosum* (Kunth) presentó en su mayoría resultados positivos en las pruebas, como la capacidad citotóxica de los extractos de hoja y flor sobre ambas líneas celulares, así como su disminución en la población

celular hace que el uso de esta planta sea candidata para poder tener aplicaciones clínicas para combatir el cáncer; con ello se da evidencia de la actividad anticancerígena que tiene la planta en la medicina tradicional mexicana.

Cabe destacar que el presente trabajo es el primer estudio fitoquímico y citotóxico que se realiza en la especie *Gnaphalium viscosum* (Kunth), lo cual es una gran contribución para la medicina tradicional mexicana, así como, para dar a conocer una nueva alternativa natural. Sería de gran interés que futuros estudios sigan evaluando las propiedades de esta especie, así mismo, poder probar la citotoxicidad en otras líneas celulares, y continúen trabajando con otras partes morfológicas de la planta, eso contribuiría a obtener más conocimiento en el tema ya que podría encontrarse más principios activos que pueden ser fuente de nuevas sustancias anticancerígenas.

VIII.CONCLUSIONES.

- ✚ Los extractos de hoja y flor *Gnaphalium viscosum* (Kunth) son antioxidantes y citotóxicos.
- ✚ Los extractos de hoja *Gnaphalium viscosum* (Kunth) poseen actividad antioxidante, teniendo una mayor captación hacia el radical ABTS•+.
- ✚ Todos los extractos evaluados de *Gnaphalium viscosum* (Kunth) presentan metabolitos secundarios.
- ✚ Todos los extractos de flor mostraron mayor concentración de taninos y fenoles.
- ✚ La presencia de saponinas solo se encontró en el extracto metanólico de hoja.
- ✚ La actividad antioxidante estuvo relacionada con el contenido de compuestos fenólicos totales determinados en los extractos; mostrando una mayor correlación los extractos metanólico y acetato de etilo flor.
- ✚ El extracto metanólico de hoja fue el extracto con mayor efecto anti-carcinogénico en la línea celular Mda, siendo el extracto hexánico de flor el que menor efecto mostró.
- ✚ El extracto hexánico de hoja fue el extracto con mayor efecto anti-carcinogénico en la línea celular SiHa, mientras que el extracto con menor efecto fue el extracto de acetato de etilo hoja.
- ✚ El extracto metanólico de hoja de *G. viscosum* (Kunth) fue el que obtuvo una menor DI_{50} (238.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), mientras que el extracto hexánico de flor fue el que mostró una más alta DI_{50} (1855.17 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre la línea celular Mda.
- ✚ En la línea celular SiHa el extracto hexánico hoja de *G. viscosum* (Kunth) fue el que presentó una menor DI_{50} (346 $\mu\text{g}/\text{mL}$), mientras que el extracto acetato de etilo hoja mostró mayor DI_{50} (1610 $\mu\text{g}/\text{mL}$).
- ✚ La capacidad citotóxica de los extractos está más relacionada a la capacidad antioxidante que presentaron.

X. REFERENCIAS.

- Aguilar, A., Camacho, J. R., Chino, S., Jacquez, P., Lopez, M. E., & Tejada, H. C. (1996). *Plantas medicinales del Herbario IMSS. Cuadros básicos por aparatos y sistemas del cuerpo humano. México: Instituto Mexicano del Seguro Social.*
- Ahn, M. R., Kumazawa, S., Usui, Y., Nakamura, J., Matsuka, M., Zhu, F., & Nakayama, T. (2007). Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chemistry, 101*(4), 1383-1392.
- Alarcón García, I. J., & Hernández Cruz, D. C. (2013). *Evaluación de la actividad antioxidante y citotóxica en hojas e inflorescencia de Gnaphalium Meridanum (Gnaphalium cf. Polycephalum Michx.)* (Bachelor's thesis).
- Alonso, J., & Desmarchelier, C. (2015). *Plantas medicinales autóctonas de la Argentina: bases científicas para su aplicación en atención primaria de la salud.* Corpus editorial y Distribuidora.
- Álvarez Aldana, A., Sepúlveda Arias, J. C., & Siller López, F. (2012). Carcinogénesis inducida por el virus del papiloma humano. *Investigaciones Andina, 14*(24), 438-456.
- Alves, T. M. D. A., Silva, A. F., Brandão, M., Grandi, T. S. M., Smânia, E. D. F. A., Smânia Júnior, A., & Zani, C. L. (2000). Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 95*(3), 367-373.
- Argueta, V. A., Cano, L. M., & Rodarte, M. E. (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana: Instituto Nacional Indigenista. *Vol. II. México, 559.*
- Asami, D. K., Hong, Y. J., Barrett, D. M., & Mitchell, A. E. (2003). Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *Journal of agricultural and food chemistry, 51*(5), 1237-1241.
- Avella, D. M. G., García, C. A. O., & Cisneros, A. M. (2008). Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. In *Memorias del Simposio de Metrología. Universidad Autónoma de Querétaro. Centro Nacional de Querétaro.*

- Baumann, E., Stoya, G., Völkner, A., Richter, W., Lemke, C., & Linss, W. (2000). Hemolysis of human erythrocytes with saponin affects the membrane structure. *Acta histochemica*, 102(1), 21-35.
- Bedascarrasbure, E., Maldonado, L., Álvarez, A., & Rodriguez, E. (2004). Contenido de fenoles y flavonoides del propoleos argentino. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 23, 369-372.
- Benuto Aguilar, R. E., & Berumen Campos, J. (2009). Virus oncogénicos: el paradigma del virus del papiloma humano. *Dermatología (México, DF)*, 53(5), 234-242.
- Berdonces, J. L. (1995). Principios activos y preparaciones farmacéuticas de las plantas medicinales. *Natura medicatrix*, 994.
- Bermúdez, A., & Velázquez, D. (2002). Etnobotánica médica de una comunidad campesina del estado Trujillo, Venezuela: un estudio preliminar usando técnicas cuantitativas. *Rev Fac Farm*, 44, 2-6.
- Betancur-Galvis, L. A., Morales, G. E., Forero, J. E., & Roldan, J. (2002). Cytotoxic and antiviral activities of Colombian medicinal plant extracts of the Euphorbia genus. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(4), 541-546.
- Bindon, K. A., & Kennedy, J. A. (2011). Ripening-induced changes in grape skin proanthocyanidins modify their interaction with cell walls. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(6), 2696-2707.
- Boccardo, E., & Villa, L. L. (2007). Viral origins of human cancer. *Current medicinal chemistry*, 14(24), 2526-2539.
- Boyle, P., & Levin, B. (2008). World cancer report 2008. International agency for research on cancer. *Distributed by WHO Press, Lyon/Geneva*.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 22, 25-30.
- BRINTON, L. A., REEVES, W. C., BRENES, M. M., HERRERO, R., DE BRITTON, R. C., GAITAN, E. & RAWLS, W. E. (1989). Parity as a risk factor for cervical cancer. *American Journal of Epidemiology*, 130(3), 486-496.

Caceres, A., Alvarez, A. V., Ovando, A. E., & Samayoa, B. E. (1991). Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. 1. Screening of 68 plants against gram-positive bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, 31(2), 193-208.

Callacondo-Riva, D., Quispe-Mauricio, A., Lindo-Gamarra, S., & Vaisberg, A. J. (2008). Actividad citotóxica del extracto etanólico de gnaphalium spicatum" keto keto" en cultivos de líneas celulares tumorales humanas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 25(4), 380-385.

Campos-Bedolla, P., Montano, L. M., Flores-Soto, E., Aguilar, A., Puebla, A. M., Lozoya, X., & Vargas, M. H. (2005). Effect of Gnaphalium conoideum HBK on guinea pig airway smooth muscle: role of L-type Ca²⁺ channels. *Journal of ethnopharmacology*, 97(2), 267-272.

Carretero, M.E. (2001). Compuestos fenólicos: Terpenos III: Triterpenos y esteroides. *Panorama Actual Médica*. 25(240): 124-130.

Carretero, M.E. 2000. Compuestos fenólicos: Taninos. *Panorama Actual Médica*. 24(235): 633-636

Cebrián, J., & Guarga, J. (2012). *Diccionario de plantas medicinales*. RBA Libros.

Chifa, C. (2010). La perspectiva social de la medicina tradicional. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 9(4).

Couffignal, A. L., Lapeyre-Mestre, M., Bonhomme, C., Bugat, R., & Montastruc, J. L. (2000). Adverse effects of anticancer drugs: apropos of a pharmacovigilance study at a specialized oncology institution. *Therapie*, 55(5), 635-641.

Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2003). Plants as a source of anti-cancer and anti-HIV agents. *Annals of applied biology*, 143(2), 127-133.

Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2005). Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of ethnopharmacology*, 100(1), 72-79.

Cragg, G. M., Grothaus, P. G., & Newman, D. J. (2009). Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chemical reviews*, 109(7), 3012-3043.

Cragg, G. M., Newman, D. J., & Snader, K. M. (1997). Natural products in drug discovery and development. *Journal of natural products*, 60(1), 52-60.

Cragg, G. M., Simon, J. E., Jato, J. G., & Snader, K. M. (1996). Drug discovery and development at the National Cancer Institute: potential for new pharmaceutical crops. *Progress in New Crops, ASHS Press, Arlington, VA*, 554-560.

Cronquist, A. (1980). Asteraceae. Vascular flora of the southeastern United States, vol. 1.

Cushnie, T. T., & Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*, 26(5), 343-356.

CYTED. (2002). Técnicas in vitro para el estudio de fármacos Antiinflamatorios. 27-41.

CYTED. (2006). Manual de Técnicas de Bioevaluación de Nuevos agentes contra la Tuberculosis. Toxicidad in vitro e in vivo y eficacia de Productos Naturales. 141 p.

CYTED. (2006). Manual de Técnicas Experimentales utilizadas en el estudio Preclínico de Fármacos con Actividad gastrointestinal. 15 p.

Danaei, G., Vander Hoorn, S., Lopez, A. D., Murray, C. J., Ezzati, M., & Comparative Risk Assessment collaborating group (Cancers. (2005). Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *The Lancet*, 366(9499), 1784-1793.

de Acción Específico, P. (2014). Prevención y control del cáncer de la mujer 2013-2018. México, Secretaría de Salud.

de la Cruz-Leyvaa, M. C., Hernández-Ocurab, L., Durán-Mendozaa, T., Pérez, C. D. C., Sánchez, R. G., González-de la Cruza, J. U., ... & Guzmán-Ceferinoa, J. (2017). ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE IN VITRO DE EXTRACTO DE FLOR Y HOJA DE LA SOSA (*Solanum marginatum* L.). 2, 283-288.

Déciga-Campos, M., Rivero-Cruz, I., Arriaga-Alba, M., Castañeda-Corral, G., Angeles-López, G. E., Navarrete, A., & Mata, R. (2007). Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *Journal of ethnopharmacology*, 110(2), 334-342.

Desai, A. G., Qazi, G. N., Ganju, R. K., El-Tamer, M., Singh, J., Saxena, A. K., ... & Bhat, H. K. (2008). Medicinal plants and cancer chemoprevention. *Current drug metabolism*, 9(7), 581-591.

Domínguez, X. A. (1973). *Métodos de investigación fitoquímica* (No. 581.19 D6).

Dórame-López, N. A., Tejada-Tayabas, L. M., Galarza-Tejada, D. M., & Moreno-González, M. M. (2017). Detección precoz del cáncer en la mujer, enorme desafío de salud en México. Algunas reflexiones. *RESPYN Revista de Salud Pública y Nutrición*, 16(3), 14-22.

Duke, J. A. (1990). Promising phytomedicinals. In *Advances in new crops. Proceedings of the first national symposium'New crops: research, development, economics', Indianapolis, Indiana, USA, 23-26 October 1988.* (pp. 491-498). Timber Press.

Farnsworth, N. R., & Soejarto, D. D. (1991). Global importance of medicinal plants. *The conservation of medicinal plants*, 25-51.

Ferlay, J. (2010). GLOBOCAN 2008 v2. 0, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase No. 10. <http://globocan.iarc.fr>.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M. & Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*, 136(5).

Figuroa-Hernández, J. L., Sandoval, G. G., Ascencio, V. J., Figuroa-Espitia, J. L., & Fernández, G. S. (2005). Plant products with anti-cancer properties employed in the treatment of bowel cancer: literature review 1985 and 2004. In *Proceedings of the Western Pharmacology Society* (Vol. 48, pp. 77-83).

Folin, C., Ciocaleteau, V. (1927). Tyrosine and Tryptophan determination in proteins. *J. Biol.chem.* 73, 627-650.

Franceschi, S., Rajkumar, T., Vaccarella, S., Gajalakshmi, V., Sharmila, A., Snijders, P. J. & Herrero, R. (2003). Human papillomavirus and risk factors for cervical cancer in Chennai, India: A case-control study. *International journal of cancer*, 107(1), 127-133.

Fuentes-Cervantes I., Villavicencio-Nieto M.Á., Pérez-Escandón B.E. 2013. Plantas medicinales de Omitlán, Hidalgo, México. Estudios científicos en el estado de Hidalgo y zonas aledañas. 2(10): 129-135

Galindo, J., González, N., Sosa, A., Ruíz, T., Torres, V., Aldana, A. I., ... & Noda, A. C. (2011). Efecto de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray (Botón de oro) en la población de protozoos y metanógenos ruminales en condiciones in vitro. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 45(1).

García Barriga, H. (1974). *Flora medicinal de Colombia: botánica médica* (No. R QK99 G3).

García, M. G., Rodríguez, O. G. A., & Gómez, J. H. (2016). *Tratamiento del cáncer: Oncología médica, quirúrgica y radioterapia*. Editorial El Manual Moderno.

García-Lafuente, A., Guillamón, E., Villares, A., Rostagno, M. A., & Martínez, J. A. (2009). Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflammation Research*, 58(9), 537-552.

Gaviria, A., Correa, C. E., Mosquera, O. M., Niño, J., & Correa, Y. M. (2015). Evaluación de las actividades antioxidante y antitopoisomerasa de extractos de plantas de la ecorregión cafetera colombiana. *Revista Facultad de Ciencias Económicas: Investigación y Reflexión*, 11(1), 86.

Giron, M.C. (1992). "Determinación semi cuantitativa de saponinas en muestras vegetales aprovechando su capacidad hemolítica" *Tesis facultad de Química UNAM*. 92-92.

González-Robledo, L. M., González-Robledo, M. C., Nigenda, G., & López-Carrillo, L. (2010). Acciones gubernamentales para la detección temprana del cáncer de mama en América Latina: Retos a futuro. *Salud pública de México*, 52(6), 533-543.

Gordillo, E. G. G., Monterrubio, P. L. N., de Salud Pública, S., Hernández, E. R., San Román, M. L. L., Pineda, M. V. H. & Mora, M. N. S. Lic. José Francisco Olvera Ruiz Gobernador Constitucional del Estado de Hidalgo. (2010). Modelo Estratégico con Perspectiva de Género y Derechos Humanos de Prevención, Detección, Diagnóstico, Tratamiento y Seguimiento Oportuno del Cáncer de Mama y Cérvico-Uterino.

- Groce, N. E., & Reeve, M. E. (1996). Traditional healers and global surveillance strategies for emerging diseases. *Emerging infectious diseases*, 2(4), 351.
- Guerreiro, E., Kavka, J., & Giordano, O. S. (1982). 5, 8-Dihydroxy-3, 6, 7-trimethoxyflavone from *Gnaphalium gaudichaudianum*. *Phytochemistry*, 21(10), 2601-2602.
- Gutiérrez, E. R. E., Cisneros, R. N., González, M. A. B., Molina, A. S., & Garciglia, R. S. (2013). Plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana con propiedades antidiabéticas y antihipertensivas. *Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*, 14(1), 45-52.
- Guzmán-Santos, K., Morales-Cordero, K. V., Torres, E. G., & Sánchez-Rodríguez, S. H. (2012). Carcinoma ductal infiltrante, el tipo de cáncer de mama más común. *Archivos de Medicina*, 8(1).
- Hanahan, D. & Weinberg, A. R. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *cell*, 100(1), 57-70.
- Hartmann, T. (2007). From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68(22), 2831-2846.
- Haslam, E. (2007). Vegetable tannins—Lessons of a phytochemical lifetime. *Phytochemistry*, 68(22), 2713-2721.
- Henkel, T., Brunne, R. M., Müller, H., & Reichel, F. (1999). Statistical investigation into the structural complementarity of natural products and synthetic compounds. *Angewandte Chemie International Edition*, 38(5), 643-647.
- Hernández Sosa, E., Mora González, N., Morris Quevedo, H. J., Delgado Cobas, L., & Martínez Manrique, C. E. (2013). Actividad citotóxica de extractos acuosos de hojas de *Trichilia hirta* sobre células tumorales humanas. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 32(1), 93-101.
- Hernández, R., Lugo, E. C., Díaz, L., & Villanueva, S. (2005). Extracción y cuantificación indirecta de las saponinas de *Agave lechuguilla* Torrey. *e-Gnosis*, (3).

Hernández-Hernández, D. M., Apresa-García, T., & Patlán-Pérez, R. M. (2015). Panorama epidemiológico del cáncer cervicouterino. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 53(2).

Hertog, M. G., Hollman, P. C., & Katan, M. B. (1992). Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *Journal of agricultural and food chemistry*, 40(12), 2379-2383.

Hertog, M. G., Hollman, P. C., & Van de Putte, B. (1993). Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices. *Journal of agricultural and food chemistry*, 41(8), 1242-1246.

Hickman, J. A. (1992). Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer and Metastasis Reviews*, 11(2), 121-139.

Hildesheim, A., Herrero, R., Castle, P. E., Wacholder, S., Bratti, M. C., Sherman, M. E. & Helgesen, K. (2001). HPV co-factors related to the development of cervical cancer: results from a population-based study in Costa Rica. *British Journal of Cancer*, 84(9), 1219-1226.

Hitchcock, C. L., Cronquist, A., & OWN-BEY, M. (1969). Vascular plants of the Pacific Northwest. Part 1. Vascular cryptogams, gymnosperms and monocotyledons. *Vascular plants of the Pacific Northwest. Part 1. Vascular cryptogams, gymnosperms and monocotyledons*.

Hossain, M. A., & Shah, M. D. (2015). A study on the total phenols content and antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of endemic plant *Merremia borneensis*. *Arabian Journal of Chemistry*, 8(1), 66-71.

Hostettmann, K. (1999). Strategy for the biological and chemical evaluation of plant extracts. *IUPAC*, 70(11), 1-8.

Hostettmann, K. U. R. T., Hostettmann, M. A. R. Y. S. E., & Marston, A. N. D. R. E. W. (1991). Saponins. *Methods in plant biochemistry*, 7, 435-471

Hostettmann, K., Hostettmann, M., & Marston, A. (1991). Saponins. *Methods in plant biochemistry*, 7, 435-471.

[http://mapserver.inegi.org.mx/mgn2k/;](http://mapserver.inegi.org.mx/mgn2k/)

- Huerta, C. (1997). La herbolaria: mito o realidad. *CONABIO. Biodiversitas*, 12, 1-7.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI]. (2009). Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Epazoyucan, Hidalgo. Recuperado el 10 de noviembre de 2009, de:
- International Agency for Research on Cancer. (1995). Working group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *Human papillomaviruses*, 90.
- Isaza, M., & Hipólito, J. (2007). Taninos o polifenoles vegetales. *Scientia et Technica*, 13(33).
- Johnson, I. S. (1968). Historical background of Vinca alkaloid research and areas of future interest. *Cancer chemotherapy reports*, 52(4), 455.
- Kale, A., Gawande, S., & Kotwal, S. (2008). Cancer phytotherapeutics: role for flavonoids at the cellular level. *Phytotherapy Research*, 22(5), 567-577.
- Kanadaswami, C., Lee, L. T., Lee, P. P. H., Hwang, J. J., Ke, F. C., Huang, Y. T., & Lee, M. T. (2005). The antitumor activities of flavonoids. *In vivo*, 19(5), 895-909.
- Kumar, V., Cotran, R. S., & Robbins, S. L. (2008). *Patología humana*. Elsevier Health Sciences
- Kumazawa, S., Hamasaka, T., & Nakayama, T. (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food chemistry*, 84(3), 329-339.
- Kuskoski E., Asuero, A. G., Ana M. T., Jorge M.F., Roseane, F. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 25(4), 726-732.
- Lacey, J. V., Kreimer, A. R., Buys, S. S., Marcus, P. M., Chang, S. C., Leitzmann, M. F. & Hartge, P. (2009). Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort. *BMC cancer*, 9(1), 84.
- Le Marchand, L. (2002). Cancer preventive effects of flavonoids—a review. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 56(6), 296-301.

- Lee, S. H., Choi, W. C., & Yoon, S. W. (2009). Impact of standardized *Rhus verniciflua* stokes extract as complementary therapy on metastatic colorectal cancer: a Korean single-center experience. *Integrative Cancer Therapies*, 8(2), 148-152.
- López, L. (2001). *Inducción de apoptosis en células HeLa por extractos de Cupressus lindleyi Klotzsch* (Doctoral dissertation, Tesis de maestría. Facultad de Ciencias, UNAM).
- López, L., Villavicencio, M. A., Albores, A., Martínez, M., De la Garza, J., Meléndez-Zajgla, J., & Maldonado, V. (2002). *Cupressus lusitanica* (Cupressaceae) leaf extract induces apoptosis in cancer cells. *Journal of ethnopharmacology*, 80(2), 115-120.
- Lopez-Lazaro, M. (2002). Flavonoids as anticancer agents: structure-activity relationship study. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, 2(6), 691-714.
- Loraine, S., & Mendoza-Espinoza, J. A. (2010). Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 41(4).
- Lorincz, A. T., Castle, P. E., Sherman, M. E., Scott, D. R., Glass, A. G., Wacholder, S. & Schiffman, M. (2002). Viral load of human papillomavirus and risk of CIN3 or cervical cancer. *The Lancet*, 360(9328), 228-229.
- Lurssen, L. M. (2001). Cuantificación de saponinas esteroidales en *Yucca elephantantipes* (Flor de Izote). *Graduated Thesis, Universidad de San Carlos de Guatemala, Ciudad de Guatemala, Guatemala*.
- MacDonald-Wicks, L. K., Wood, L. G., & Garg, M. L. (2006). Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(13), 2046-2056.
- Maldonado, L., Santos, N., & Cura, M. (2008). TEMA 16: Neoplasias: Bases moleculares. *Biología del crecimiento*.
- Malikov, V. M., & Yunusov, S. Y. (1977). Vinca alkaloids. *Chemistry of Natural Compounds*, 13(5), 497-512.
- Mann, J. (2002). Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. *Nature Reviews Cancer*, 2(2), 143-148.

Mans, D. R., Da Rocha, A. B., & Schwartzmann, G. (2000). Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. *The oncologist*, 5(3), 185-198.

Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., & Tuñón, M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp*, 17(6), 271-278.

McLaughlin-Drubin, M. E., & Munger, K. (2008). Viruses associated with human cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1782(3), 127-150.

McLaughlin-Drubin, M. E., & Munger, K. (2008). Viruses associated with human cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1782(3), 127-150.

Medinilla, B. (1993). Manual de Laboratorio de Fitoquímica. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala, 8-9.

Meragelman, T. L., Silva, G. L., Mongelli, E., & Gil, R. R. (2003). ent-Pimarane type diterpenes from *Gnaphalium gaudichaudianum*. *Phytochemistry*, 62(4), 569-572.

Mitrus, I., Bryndza, E., Sochanik, A., & Szala, S. (2012). Evolving models of tumor origin and progression. *Tumor Biology*, 33(4), 911-917.

Montiel-Ortega, L.A. (1999). Estudio químico de *Verbena menthaefolia Benth*, *Gnaphalium viscosum Kunth* y *Gnaphalium stramineum*. Tesis de licenciatura. Centro de Investigaciones Químicas. UAEH. 101 p.

Morales, G., Sierra, P., Paredes, A., Loyola, L, Borquez J. (2006). Constituents of *Helenium atacamense* Cabr. *J Chil Chem Soc*, 51 (1), 769- 772.

Moreno, V., Bosch, F. X., Muñoz, N., Meijer, C. J., Shah, K. V., Walboomers, J. M., ... & International Agency for Research on Cancer (IARC) Multicentric Cervical Cancer Study Group. (2002). Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *The Lancet*, 359(9312), 1085-1092.

Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Met.* 65, 55-63.

- Munoz, N. (2003). International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Engl. J. Med.*, 348, 518-527.
- Muñoz, A. (2004). *Cáncer: genes y nuevas terapias*. Editorial Hélice.
- Murthy, N. S., & Mathew, A. (2000). Risk factors for pre-cancerous lesions of the cervix. *European Journal of Cancer Prevention*, 9(1), 5-14.
- Narayana, K. R., Reddy, M. S., Chaluvadi, M. R., & Krishna, D. R. (2001). Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian journal of pharmacology*, 33(1), 2-16.
- Nash, D. L. & L. O. Williams (eds.), 1976. Flora of Guatemala, Compositae. Part XII. Fieldiana Botany. 24, 96-97.
- Neves, J. M., Matos, C., Moutinho, C., Queiroz, G., & Gomes, L. R. (2009). Ethnopharmacological notes about ancient uses of medicinal plants in Trás-os-Montes (northern of Portugal). *Journal of Ethnopharmacology*, 124(2), 270-283.
- Newman, D. J. (2008). Natural products as leads to potential drugs: an old process or the new hope for drug discovery?. *Journal of medicinal chemistry*, 51(9), 2589-2599.
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of natural products*, 70(3), 461-477.
- Newman, D. J., Cragg, G. M., & Snader, K. M. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981– 2002. *Journal of natural products*, 66(7), 1022-1037.
- Nieto, V., Pérez Escandón, B. E., Mendoza Pérez, E., & Maldonado Lagunas, V. (2008). Citotoxicidad en células hela de extractos de tres especies de plantas medicinales de Hidalgo, México. *Polibotánica*, (26), 137-147.
- Noriega-Cisneros, R., Ortiz-Avila, O., Esquivel-Gutiérrez, E., Clemente-Guerrero, M., Manzo-Avalos, S., Salgado-Garciglia, R., & Saavedra-Molina, A. (2012). Hypolipidemic activity of *Eryngium carlinae* on Streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochemistry research international*, 2012.

- Novelo, M., Cruz, J. G., Hernández, L., Pereda-Miranda, R., Chai, H., Mar, W., & Pezzuto, J. M. (1993). Cytotoxic constituents from *Hyptis verticillata*. *Journal of natural products*, 56(10), 1728-1736.
- Ocegueda, S., Moreno, E., & Koleff, P. (2005). Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. CONABIO. *Biodiversitas*, 62, 12-15.
- Odabasoglu, F., Aslan, A., Cakir, A., Suleyman, H., Karagoz, Y., Bayir, Y., & Halici, M. (2005). Antioxidant activity, reducing power and total phenolic content of some lichen species. *Fitoterapia*, 76(2), 216-219.
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2016). Cáncer de mama: prevención y control. Factores de riesgo del cáncer de mama. Recuperado el 7 de septiembre de 2016, de: <http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/index2.html>
- Organización Panamericana de la Salud [OPS]. (2014a). Cáncer de mama en las Américas. Recuperado el 2 de septiembre de 2015, de: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=21588&Itemid
- Organización Panamericana de la Salud [OPS]. (2014b). La OPS observa el mes de concientización sobre el cáncer de mama. Recuperado el 2 de septiembre de 2015, de: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10087&Itemid=40591&lang=es
- Ortega, A. B. (2013). *Cáncer de mama*. Trillas.
- Paiva, S. R. D., Figueiredo, M. R., Aragão, T. V., & Kaplan, M. A. C. (2003). Antimicrobial activity in vitro of plumbagin isolated from *Plumbago* species. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(7), 959-961.
- Paladino, S. C., & Zuritz, C. A. (2011). Antioxidant grape seed (*Vitis vinifera* L.) extracts: efficiency of different solvents on the extraction process. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo*, 43(1), 187-199.
- Parmar, V. S., Bracke, M. E., Philippe, J., Wengel, J., Jain, S. C., Olsen, C. E., ... & Vennekens, K. L. (1997). Anti-invasive activity of alkaloids and polyphenolics in vitro. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 5(8), 1609-1619.

- Partanen, T., Monge, P., & Wesseling, C. (2009). Causas y prevención del cáncer ocupacional. *Acta Médica Costarricense*, 51(4).
- Patel, S., Gheewala, N., Suthar, A., & Shah, A. (2009). In-vitro cytotoxicity activity of Solanum nigrum extract against Hela cell line and Vero cell line. *International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, 1(1), 38-46.
- Pereira, S. C., Vega, D. T., Almeida, M. S., & Morales, G. T. (2009). Tamizaje fitoquímico de los extractos alcohólico, etéreo y acuoso de las hojas de la Trichilia hirta L. *Rev Química Viva*, 3, 192-199.
- Perez, A. T., Arun, B., Tripathy, D., Tagliaferri, M. A., Shaw, H. S., Kimmick, G. G. & Schactman, M. (2010). A phase 1B dose escalation trial of Scutellaria barbata (BZL101) for patients with metastatic breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 120(1), 111-118.
- Perez-Vizcaino, F., Duarte, J., Jimenez, R., Santos-Buelga, C., & Osuna, A. (2009). Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin. *Pharmacological Reports*, 61(1), 67-75.
- Peto, J. (2001). Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature*, 411(6835), 390.
- Plummer, M., de Martel, C., Vignat, J., Ferlay, J., Bray, F., & Franceschi, S. (2016). Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *The Lancet Global Health*, 4(9), e609-e616.
- Price, M. L., Buttler L. G. (1998). "Tannins and nutrition". Purdue University. Agriculture Experimental Station Boletin.
- Ramos, G., Frutos, P., Giráldez, F.J. y Mantecón, A.R. (1998). Los compuestos secundarios de las plantas en la nutrición de los herbívoros. *Arch. Zootec*, 47, 597-620.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS•+ radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, Biol. Med. 26(9), 1231-1237.

Rosales-Reyes, T., de la Garza, M., Arias-Castro, C., Rodríguez-Mendiola, M., Fattel-Fazenda, S., Arce-Popoca, E., ... & Villa-Treviño, S. (2008). Aqueous crude extract of *Rhoeo discolor*, a Mexican medicinal plant, decreases the formation of liver preneoplastic foci in rats. *Journal of ethnopharmacology*, 115(3), 381-386.

Ruiz-Marcial, C., Chilpa, R. R., Estrada, E., Reyes-Esparza, J., Fariña, G. G., & Rodríguez-Fragoso, L. (2007). Antiproliferative, cytotoxic and antitumour activity of coumarins isolated from *Calophyllum brasiliense*. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 59(5), 719-725.

Russo, A., Cardile, V., Sanchez, F., Troncoso, N., Vanella, A., & Garbarino, J. A. (2004). Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. *Life sciences*, 76(5), 545-558.

Rzedowski, G. D., & Rzedowski, J. (2001). Flora fanerogámica del Valle de México, Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.

Rzedowski, G.C., Rzedowski de, J. (2005). Flora fanerogámica del Valle de México. 2ª. Ed., 1 a. reimp., Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro (Michoacán), 1406 p.

Santana, J. L., Sánchez, L., & Sánchez, R. (1999). Evaluación de las propiedades antioxidantes de los taninos vegetales extraídos de la biomasa forestal: Actividad superóxido dismutasa e inhibición de la peroxidación lipídica. *Academia. C. Habana*, 100-105.

Sheng-Ji, P. (2001). Ethnobotanical approaches of traditional medicine studies: some experiences from Asia. *Pharmaceutical biology*, 39(sup1), 74-79.

Silva, I. D., & Beral, V. (1997). Socioeconomic differences in reproductive behaviour. *IARC scientific publications*, (138), 285-308.

Smith, J. S., Herrero, R., Bosetti, C., Munoz, N., Bosch, F. X., Eluf-Neto, J. & Ashley, R. (2002). Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 94(21), 1604-1613.

- Soejarto, D. D., Fong, H. H. S., Tan, G. T., Zhang, H. J., Ma, C. Y., Franzblau, S. G., & Xuan, L. T. (2005). Ethnobotany/ethnopharmacology and mass bioprospecting: Issues on intellectual property and benefit-sharing. *Journal of ethnopharmacology*, 100(1), 15-22.
- Soto, W. G. (2006). *El seno*. Editorial Del Nuevo Extremo.
- Sparg, S., Light, M. E., & Van Staden, J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of ethnopharmacology*, 94(2), 219-243.
- Srividya, A. R., Shalom, A., Chandrasekhar, R., & Vijayan, P. (2009). Antioxidant, antimicrobial and in vitro cytotoxicity studies of *Tithonia diversifolia* A. grey. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1, 276-279.
- Stanley, P., & Carver, J. P. (1977). Lectin receptors and lectin resistance in Chinese hamster ovary cells. In *Membrane Toxicity* (pp. 265-284). Springer US.
- Stehman, F. B., Rose, P. G., Greer, B. E., Roy, M., Plante, M., Penalver, M., & Wharton, J. T. (2003). Innovations in the treatment of invasive cervical cancer. *Cancer*, 98(S9), 2052-2063.
- Subdirección de Epidemiología. Secretaria del Estado de Hidalgo. (2010). [http://cedoc.inmujeres.gob.mx/ftpg/Hidalgo/HGO MA4 Modelo Cervico uterino 1 2.pdf](http://cedoc.inmujeres.gob.mx/ftpg/Hidalgo/HGO_MA4_Modelo_Cervico_uterino_1_2.pdf)
- Sun, C. A., Liu, J. F., Wu, D. M., Nieh, S., Yu, C. P., & Chu, T. Y. (2002). Viral load of high-risk human papillomavirus in cervical squamous intraepithelial lesions. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 76(1), 41-47
- Szarewski, A., & Cuzick, J. (1998). Smoking and cervical neoplasia: a review of the evidence. *J Epidemiol Biostat*, 3(3), 229-256.
- Thomas, C. M., Wood III, R. C., Wyatt, J. E., Pendleton, M. H., Torrenegra, R. D., Rodriguez, O. E., & Ramsauer, V. P. (2012). Anti-neoplastic activity of two flavone isomers derived from *Gnaphalium elegans* and *Achyrocline bogotensis*. *PLoS one*, 7(6), e39806.
- Thomas, D. B., Qin, Q., Kuypers, J., Kiviat, N., Ashley, R. L., Koetsawang, A., & Koetsawang, S. (2001). Human papillomaviruses and cervical cancer in Bangkok. II.

Risk factors for in situ and invasive squamous cell cervical carcinomas. *American journal of epidemiology*, 153(8), 732-739.

Torchio, F., Cagnasso, E., Gerbi, V., & Rolle, L. (2010). Mechanical properties, phenolic composition and extractability indices of Barbera grapes of different soluble solids contents from several growing areas. *Analytica Chimica Acta*, 660(1), 183-189.

Tovar, J. (2013). Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregión cafetera. *Trabajo de Grado. Facultad de Tecnología-Universidad Tecnológica de Pereira. Colombia*.

Uddin, M. S., Uddin, G. S., Begum, M. M., Begum, Y., Herrera-Calderon, O., Islam, M. M., & Abdel-Daim, M. M. (2017). Inspection of phytochemical content and in vitro antioxidant profile of *Gnaphalium luteoalbum* L.: An unexplored phytomedicine. *Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences*, 7(3), 136-146.

Valadez-Vega, C., Morales-González, J. A., Sumaya-Martínez, M. T., Delgado-Olivares, L., Cruz-Castañeda, A., Bautista, M. & Zuñiga-Pérez, C. (2014). Cytotoxic and antiproliferative effect of tepary bean lectins on C33-A, MCF-7, SKNSH, and SW480 cell lines. *Molecules*, 19(7), 9610-9627.

Van Duin, M., Snijders, P. J., Schrijnemakers, H. F., Voorhorst, F. J., Rozendaal, L., Nobbenhuis, M. A., & Meijer, C. J. (2002). Human papillomavirus 16 load in normal and abnormal cervical scrapes: an indicator of CIN II/III and viral clearance. *International journal of cancer*, 98(4), 590-595.

Vernhes, M., González-Pumariega, M., Andrade, L., Martins Menck, C. F., & Sánchez-Lamar, A. (2010). Efecto tóxico de los extractos acuosos de *pinus caribaea* y *halimeda monile* en células humanas. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 41.

Vibrans, H. (2009). Malezas de México. *CONABIO. Fecha de consulta*, 8.

Vicuña, N. C., Hernández, G. A., Alcázar, L. F., Muruchi Garrón, G. W., & Zúñiga, I. P. (2009). Cáncer cervicouterino. *Anales de Radiología, Mexico*, 8(1).

Villagómez-Ibarra, J. R., Sánchez, M., Espejo, O., Zúñiga-Estrada, A., Torres-Valencia, J. M., & Joseph-Nathan, P. (2001). Antimicrobial activity of three Mexican *Gnaphalium* species. *Fitoterapia*, 72(6), 692-694.

Villaseñor, J. L., & Espinosa, F. J. (1998). Catálogo de Malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario.

Waizel Bucay, J., Martínez Porcayo, G., Villarreal Ortega, M. L., Alonso Cortés, D., & Pliego Castañeda, A. (2003). Estudio preliminar etnobotánico, fitoquímico, de la actividad citotóxica y antimicrobiana de *Cuphea aequipetala* Cav.(Lythraceae). *Polibotánica*, (15).

Walboomers, J. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., & Munoz, N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of pathology*, 189(1), 12-19.

Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P., & McPhail, A. T. The isolation and structure of Taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from. *Texus brevifolia*, 2325-2327.

Weitzel, J. N., Blazer, K. R., MacDonald, D. J., Culver, J. O., & Offit, K. (2011). Genetics, genomics, and cancer risk assessment. *CA: a cancer journal for clinicians*, 61(5), 327-359.

Wiseman, M. (2008). The second World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research expert report. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. *Proceedings of the Nutrition Society*, 67(3), 253-256.

World Health Organization. (2002). WHO traditional medicine strategy 2002-2005.

Zani, C. L., Chaves, P. P. G., Queiroz, R., De Oliveira, A. B., Cardoso, J. E., Anjos, A. M. G., & Grandi, T. S. M. (1995). Brine shrimp lethality assay as a prescreening system for anti-Trypanosoma cruzi activity. *Phytomedicine*, 2(1), 47-50.

Zapata, K., Cortes, F. B., & Rojano, B. A. (2013). Polifenoles y actividad antioxidante del fruto de Guayaba Agria (*Psidium araca*). *Información tecnológica*, 24(5), 103-112.

Zhang, J. Y. (2002). Apoptosis-based anticancer drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1(2), 101-102.