

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO



EFECTO TÓXICO IN VIVO E IN VITRO DE LOS EXTRACTOS POLARES
DE NUEVE PLANTAS UTILIZADAS EN MEDICINA TRADICIONAL

Por

MA.GUADALUPE ERNESTINA GONZÁLEZ YÁÑEZ

Como requisito para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN QUÍMICA DE
PRODUCTOS NATURALES

2018

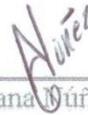
EFFECTO TÓXICO IN VIVO E IN VITRO DE LOS EXTRACTOS POLARES
DE NUEVE PLANTAS UTILIZADAS EN MEDICINA TRADICIONAL

Comité de Tesis



Dra. Catalina Leos Rivas

Presidente



Dra. María Adriana Núñez González

Secretario



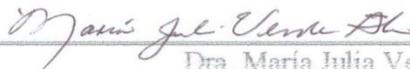
Dra. Catalina Rivas Morales

Vocal



Dra. María Azucena Granday Cárdenas

Vocal



Dra. María Julia Verde Star

Vocal

Marzo 2018

EFFECTO TÓXICO IN VIVO E IN VITRO DE LOS EXTRACTOS POLARES
DE NUEVE PLANTAS UTILIZADAS EN MEDICINA TRADICIONAL

Dirección de Tesis



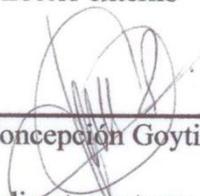
Dra. Catalina Leos Rivas

Director



Dr. Luis Benjamín Serrano Gallardo

Director externo



Dra. Raquel Concepción Goytia Acevedo

Co-director externo

Marzo 2018

AGRADECIMIENTOS

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a la dirección de becas ya que fui favorecida con el número de registro de becario: CVU/Becario 355424/267382

A la Universidad que me permitió realizar y obtener el grado de Doctor en Ciencias:
Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas

DEDICATORIAS

Escúchame, Señor, porque eres bueno

Ma. Guadalupe Ernestina González Yáñez

Del Salmo 68

W. Iníguez, B.P.1714

♩ = 100

Voice

Es cu - chá-me, Se - ñor, por - que e - res ju - e - no.

7 A tí, Se - ñor, - e - le - vo mi ple - ga - ría, ven en mi a - yu - da _pron - to_ es - cú - chá - me con - for - me a tu clem - en - cia.

11 Dí - os fí - el en el so - cor - ro, Es - cú - chá - me, Se - ñor, pues e - res ju - e - no y _en tu ten - tu - ra_ vuel - ve a mi tus -

16 Mi - ra - me en - fer - mo y a fi - j - gi - do de - fí - en - de - me y a - yú - da - me, Dí - os mi - o.

20 En mi can - tar ex - al - ta - ré tu nom - bre pro - cla - ma - ré tu glo - ría, a gra - de - ci - do.

25 Se a le - grá - ra - n al ver - lo los que su fren - que - nes - lus cana Dí - os ten - drán más á - ni - mo por - que e - se - ñor ja - más des -

30 o - ye al po - bre ni ol - vi - da al que se en - cuen - tra en ca - de - na - da. Cier - ta - men - te el

35 Se - ñor sal - va - rá a Si - ón, re - cons - truí - rá a Ju - dá la - te - re - da - rán los ni - ños de sus sje - vos, que - nes

40 a - man a Dí - os la - ta - bi - ta - rán.

A mis padres; Bentura y Alejandro que ya descansan en paz.

Hermanos; Socorro, José-José, Clementina y Alejandrina

A mis hijos; Clarita, Luigi y Francisco.

A mí esposo José Luis Quiñones Herrera. A quienes amo y son mi razón de vivir.

ÍNDICE GENERAL

No	Contenido	Página
	RESUMEN	
1	INTRODUCCIÓN	1
2	ANTECEDENTES	2
2.1	Generalidades	4
2.2	Toxicidad	5
2.2.1	Prueba de toxicidad en eritrocito	5
2.2.2	Ensayo en línea celular VERO	7
2.2.3	Ensayo en <i>Artemia salina</i>	7
2.2.4	Sistema del Citocromo P450	8
2.2.5	Compuestos con propiedades tóxicas	11
2.3	Descripción Botánica y uso etnofarmacológico de las plantas en estudio	11
2.3.1	Otros usos sobresalientes de las plantas en estudio	20
2.4	Extracción de metabolitos	21
3	JUSTIFICACIÓN	22
4	HIPÓTESIS	23
5	DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	24
6	OBJETIVOS DEL TRABAJO	25
6.1	Objetivo general	25
6.2	Objetivos particulares	25
7	MATERIAL Y MÉTODOS	26
7.1	Colecta e identificación del material vegetal en estudio	26
7.2	Obtención de extractos acuosos de las plantas	26
7.3	Identificación parcial de los componentes de los extractos	28

7.4	Análisis de los extractos de las plantas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	30
7.5	Evaluación de la actividad biológica de los extractos en eritrocitos humanos	31
7.5.1	Actividad biológica y citotóxica de los extractos en eritrocitos por Citometría de flujo	31
7.5.2	Manejo de extractos	33
7.5.3	Volumen Corpuscular Medio (VCM)	35
7.5.4	Ácido Tiobarbitúrico/ Malondialdehido (TBARS/MDA)	36
7.5.5	Peróxido de Hidrógeno (H ₂ O ₂)	37
7.5.6	Actividad biológica y toxicidad de los extractos en <i>Artemia salina</i>	39
7.5.7	Actividad biológica y evaluación citotóxica de los extractos sobre la línea celular normal VERO	40
7.5.8	Daño Histopatológico en ratas macho Wistar	42
7.5.8.1	Análisis Histopatológico de hígado y riñón	43
7.5.9	Actividad biológica de los extractos en la inducción de CYP450	44
8	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
8.1	Colecta e Identificación del material vegetal en estudio	46
8.2	Obtención de extractos de las plantas en estudio	46
8.3	Identificación parcial de los componentes de los extractos	47
8.4	Cromatogramas de los extractos de las plantas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	49
8.5	Actividad biológica y citotóxica de los extractos en eritrocitos por citometría de flujo (FASC)	58
8.6	Volumen corpuscular medio (VCM)	61
8.7	Ácido tiobarbitúrico / malondialdehido (TBARS/MDA)	63
8.8	Peróxido de Hidrógeno (H ₂ O ₂)	65
8.9	Actividad biológica y toxicidad de los extractos en <i>Artemia salina</i>	67

8.10	Actividad biológica y evaluación citotóxica de los extractos sobre la línea celular normal VERO	69
8.11	Daño histopatológico en hígado y riñón de ratas macho Wistar	71
8.12	Análisis de parámetros bioquímicos en ratas macho Wistar en la exposición a extractos de las plantas en estudio	73
8.13	Actividad biológica de los extractos en la inducción de CYP450	74
9	CONCLUSIONES	77
10	PERSPECTIVAS	79
11	BIBLIOGRAFIA	80
12	RESUMEN BIOGRÁFICO	103

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Descripción	Página
1	Esquema de trabajo para los extractos acuosos de las plantas en estudio para evaluar el proceso de eriptosis	33
2	Proceso para la elaboración de la curva en eritrocitos expuestos a rifampicina	35
3	Preparación del estándar colorimétrico para la medición de MDA a partir de una solución de 125 μ M de MDA	37
4	Proceso de dispensación de muestras, controles y estándar en el ensayo de H ₂ O ₂	39
5	Nombre científico y común de las plantas en estudio	46
6	Rendimiento de los extractos acuoso y metanólico de las plantas en estudio	47
7	Pruebas químicas realizadas a los extractos acuosos de las plantas en estudio	48
8	Pruebas químicas realizadas a los extractos metanólicos de las plantas en estudio	48
9	Datos obtenidos de los cromatogramas de las plantas en estudio y los estándares por HPLC	50
10	Eriptosis de los extractos acuosos a diferente concentración de las plantas en estudio, sobre eritrocitos humanos de donador sano	60
11	Diseño de trabajo en el estándar colorimétrico de MDA	63
12	Actividad biológica sobre <i>Artemia salina</i> de los extractos de las plantas en estudio	68
13	Citotoxicidad de los extractos acuosos de las plantas en estudio sobre la línea celular VERO	70
14	Actividad de los extractos acuosos de las plantas en estudio a diferentes concentraciones sobre baculosomas humanos y la inhibición en % de CYP3A4	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	Sistema de defensa antioxidante en el núcleo celular con la síntesis del sistema glutatión reducido (GSH)	10
2	Viabilidad de células normales VERO, observadas en microscopio invertido	42
3	Cromatograma de <i>Gnaphalium oxyphyllum</i>	52
4	Cromatograma de <i>Loeselia mexicana</i>	52
5	Cromatograma de <i>Tillandsia recurvata</i>	52
6	Cromatograma de <i>Eryngium heterophyllum</i>	53
7	Cromatograma de <i>Calea ternifolia</i>	53
8	Cromatograma de <i>Prosopis glandulosa</i>	53
9	Cromatograma de <i>Sphaeralcea angustifolia</i>	54
10	Cromatograma de <i>Tecoma stans</i>	54
11	Cromatograma de <i>Cassuarina equisetifolia</i>	54
12	Estándar de ácido gálico	55
13	Estándar de ácido clorogénico	55
14	Estándar de rutina	55
15	Estándar de catequina	56
16	Estándar de epicatequina	56
17	Estándar de quercetina	56
18	Estándar de ácido siríngico	57
19	Curva de rifampicina en eritrocitos	58
20	Volumen corpuscular medio (VCM) en los eritrocitos después de la exposición de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, de los extractos acuosos de las plantas en estudio con controles (+) y (-).	61
21	Volumen corpuscular medio (VCM) en los eritrocitos después de la exposición de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, de los extractos metanólicos de las plantas en estudio con controles (+) y (-)	62

22	Cuantificación de MDA/TBARS en eritrocitos en presencia de los extractos metanólicos de las plantas en estudio	64
23	Cuantificación de MDA/TBARS en eritrocitos en presencia de los extractos acuosos de las plantas en estudio	64
24	Cuantificación de peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) en eritrocitos en presencia de los extractos metanólicos de las plantas en estudio	66
25	Cuantificación de peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) en eritrocitos en presencia de los extractos acuosos de las plantas en estudio	66
26	Curva de ensayo para la citotoxicidad de los extractos de las plantas en estudio en células normales VERO	69
27	Corte histológico de tejido renal mostrando daño esponjiforme en túbulo proximales	72
28	Corte histológico de tejido hepático mostrando infiltrado linfocítico	72
29	Comportamiento de los parámetros hemáticos (plaquetas), en los animales de experimentación	73
30	Comportamiento de los parámetros hemáticos (leucocitos), en los animales de experimentación	73
31	Comportamiento de los parámetros bioquímicos (AST, ALT, F. Alk), en los animales de experimentación	74

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ADHP	10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine
ALAT	Alanina aminotransferasa
Anexina FITC	Proteína celular del grupo de las anexinas
ASAT	Aspartato aminotransferasa
ATP	Adenosin trifosfato
Baculosoma	Microsomas preparados a partir de células de insectos que expresan la isoenzima humana citocromo P450 reductasa (humano recombinante)
Bcl-2	Familia de proteínas que regulan los procesos de permeabilización mitocondrial y de apoptosis celular
BIO	Nombre del <i>P.glandulosa</i> en Tepehuano
C(-)	Control negativo
C(+)	Control positivo
Ca²⁺	Iones calcio
CD/ADSOL	Citrato, dextrosa, fosfato, adenina, y modificaciones de solución salina, adenina y glucosa
Cell Pack	Solución buffer de fosfatos diluyente
Células VERO	Células VERO ATCC CCL81 de Sigma de riñón de mono verde africano (<i>Chlorocebus aethiops</i>).
CH₃-CH₂-OH	Alcohol etílico
CIB	Centro de Investigación Biomédica
CIIDIR	Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Durango
CL₅₀	Concentración Letal media
CO₂	Bióxido de carbono
CoA	Acetil Coenzima A
CONABIO	Comisión Nacional de la Biodiversidad y de la EMCV
CRB	Centro de Registro Botánico-Agroecología

Cu (I)	Estado de oxidación del catión Cu^{2+} (óxido cuproso)
Cu (II)	Estado de oxidación del catión Cu^{2+}
CYP3A4	Miembro del sistema funcional de las oxidasas
CYP450	Citocromo P450 es una familia de hemoproteínas encontradas en bacterias, archea y eucariotas
CYPs	Abreviación de citocromo por sus siglas en Ingles
DAD	Detectores de absorbancia
DFNH	2,4-dinitrofenilhidrazina
DL₅₀	Dosis Letal media
DMEM	Eagle's Medium-High glucose –L- glutamina
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (por sus siglas en Ingles)
FACS	Clasificación de células activadas mediante fluorescencia aplicada en citometría de flujo (por sus siglas en Ingles)
FS	Fosfatidil serina
G6PD	Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
GCL	Glutamato cisteína ligasa
GCLM	Glutación cisteína ligasa moduladora
GS	Glutación sintetasa
GSH	Sistema glutación reducido
GSSG	Glutación unido a proteínas
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HAAS	Nombre de <i>P. glandulosa</i> por el Pueblo Seri del noroeste de México.
Hanks-solución	Sal modificada y balanceada con glucosa y cloruro de potasio
HCl	Ácido clorhídrico
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta resolución
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
KCl	Cloruro de potasio
LDo	Dosis oral letal

mAU	Unidades de absorbancia en el cromatograma de HPLC.
MTT	Bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NADP+	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NaHCO₃	Bicarbonato de sodio
NO	Monóxido de nitrógeno
NOM-033-1995	Norma Oficial Mexicana. Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres.
NOM-059 SEMARNAT-2010	NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo
NOM-062-ZOO-1999	Norma Oficial Mexicana. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio
NOM-220 SSA1 2002	Norma Oficial Mexicana NOM-220-SSA1-2002 , Instalación y operación de la farmacovigilancia
O₂	Oxígeno
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Buffer de fosfato salina
PFH	Pruebas de función hepática
Plumbagin	5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone, 1
<u>RfDo</u>	Dosis de referencia oral
RNA	Ácido ribonucleico
SAG	Solución salina adenina y glucosa
SFB	Suero fetal bovino
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
Sig	Longitud de onda en la que parece la señal en forma de pico y tiempo de retención en la detección de un componente
TBARS/MDA	Ácido Tiobarbitúrico/ Malondialdehido
UAAAN	Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro
VCM	Volumen corpuscular medio

VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
VIVID-RED	Estándar fluorescente utilizado en el ensayo de CYP3A4
YAG MEZQUIT	Nombre de <i>P. glandulosa</i> por el Pueblo Seri del noroeste de México

RESUMEN

Los vegetales son fuente de metabolitos secundarios que pudieran ser sustancias biológicamente activas, pero también podemos encontrar compuestos con toxicidad de leve a aguda como: terpenos, esteroides, cumarinas, alcaloide y flavonoides. Estos últimos tienen la propiedad de causar de formación, fragilidad osmótica y agregación en eritrocitos (E). El objetivo de este estudio es determinar efecto tóxico *in vivo* e *in vitro* de los extractos acuoso (A) y metanólico (M) de nueve plantas utilizadas en medicina tradicional mexicana. Se realizó la caracterización e identificación de compuestos fitoquímicos por pruebas colorimétricas y por HPLC, DL_{50} con el ensayo de *Artemia salina*, presencia de: TBARS, H_2O_2 , eriptosis por marcaje con Annexina V-FITC y VCM en E humanos de donador sano, citotoxicidad en línea celular VERO, daño histológico y bioquímico en ratas macho Wistar e inducción de CYP3A4. El rendimiento de las plantas fue de 1.20 a 17%. Los cromatogramas por HPLC muestran componentes similares a los estándares utilizados. En el análisis por Citometria de flujo la exposición de los E a los extractos causó la inducción de eriptosis en un % similar al control positivo. En peroxidación lipídica sobre E se encontró que para TBARS/MDA los extractos A y M observaron una media por encima de lo establecido como normal. En la cuantificación de H_2O_2 en los E tratados con los extractos M, mostraron una media de 2.6 μM , y los A una media de 15.0 μM en comparación con los E sin tratamientos de 4.0 μM y con el valor citotóxico de \geq a 50 μM . En *A. salina* los extractos que mostraron toxicidad fueron *Tillandsia recurvata*, *Sphaeralcea angustifolia* y *Gnaphallium oxyphyllum*. En células VERO, *T. recurvata* y *Loeselia mexicana* presentaron citotoxicidad. El extracto de *Calea ternifolia*, mostró cambios histológicos en riñón en ratas macho Wistar. Los extractos de las plantas presentaron inhibición en la enzima CYP3A4 en baculosomas humanos. En conclusión los componentes fitoquímicos de *C. ternifolia*, *Prosopis glandulosa*, *L. mexicana*, *Eryngium heterophyllum*, *G. oxyphyllum*, *Casuarina equisetifolia*, *T. recurvata*, *S. angustifolia* y *Tecoma stans* con propiedades medicinales también inducen eriptosis, peroxidación lipídica e incremento de H_2O_2 , efecto tóxico y citotóxico e inducen la expresión de CYP3A4.

ABSTRACT

The vegetables represent a source of secondary metabolites. Not only we can find biologically active substances, but also we can find compounds with high and low toxicity. For instance, terpenes, steroids, coumarin, alkaloids and flavonoids. The last compounds, can cause deformation, osmotic fragility and erythrocyte aggregation. The objective of this research is to determine the toxic effect, *in vivo* e *in vitro*, from the aqueous and methanol extract of nine plants used in the traditional mexican medicine. The following tests were done: the characterization and identification of phytochemical compounds by colorimetric test and HPLC, DL_{50} using *Artemia salina* model, presence of TBARS, H_2O_2 and eryptosis by Annexin V-FITC and VCM (in E humans and healthy donor), cytotoxicity on Vero cell lines, Histological and biochemical damage in male Wistar rats and CYP3A4 induction. The performance of the plants was from 1.20 to 17%. The HPLC's chromatograms showed similar components to the standards. The analysis, via flow cytometry, showed that the exposition from erythrocytes to extracts causes an induction of eryptosis in a similar percentage to the positive control. As a result, in the erythrocytes' lipid peroxidation, for TBARS/MDA, was observed that the A and M extracts had a median above the established value (normal value). In the H_2O_2 quantification, from the erythrocytes treated with M extracts, was showed a median of 2.6 μM . In the other hand, the erythrocytes treated with A extracts, showed a median of 15.0 μM . In comparison with the erythrocytes without treatment which showed a median of 4.0 μM , and a cytotoxicity value greater than or equal to 50 μM . Using *Artemia salina*, in fact, the extracts which showed toxicity were: *Tillandsia recurvata*, *Sphaeralcea angustifolia* y *Gnaphallium oxyphyllum*. By comparison, in VERO cells, the extracts which showed cytotoxicity were: *Tillandsia recurvata* y *Loeselia mexicana*. Furthermore, the *Calea ternifolia's* extract showed histological changes in the male Wistar rats' kidney. In addition, the plants' extracts showed inhibition in the CYP3A4 enzyme, as well as in human baculosomes. All things considered, the *Calea ternifolia's* phytochemical components, *Prosopis glandulosa*, *Loeselia mexicana*, *Eryngium heterophyllum*, *Gnaphallium oxyphyllum*, *Casuarina equisetifolia*, *Tillandsia recurvata*, *Sphaeralcea angustifolia* y *Tecoma stans*, with medical properties, also induces eryptosis as well as lipid peroxidation, increased of H_2O_2 , toxic and cytotoxic effect and the expression of CYP3A4.

1. INTRODUCCIÓN

Desde el punto de vista antropocéntrico a los vegetales se les ha considerado como; fuentes de alimento, origen de nuevas cepas y variedades biológicas, obtención de nuevas drogas, prevención de extinción en masa e identificación de sustancias “nocivas” causantes de posible intoxicación; en su hábitat silvestre se les ha considerado como origen de genes, búsqueda de especie próxima con ruta metabólica similar, control biológico y antagonistas naturales en su lugar de hábitat (Navarro 2009). El interés actual en la medicina herbolaria, está encaminado a la búsqueda de opciones terapéuticas que presenten mayor eficacia y al mismo tiempo que su toxicidad sea leve o nula (Bisset 1994; Hersch MP 2007; WHO1998). Con una tendencia a reencontrar valores y adoptar modos de vida más “naturales” (González et al. 2002), las plantas medicinales se han utilizado en la Comarca Lagunera (Estados de Coahuila y Durango) al Norte de México como una herencia cultural, dentro del Catálogo de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro se tiene conocimiento de aproximadamente 150 plantas de uso medicinal, además de las que se mencionan en la Base de Datos de INEGI; algunos ejemplos de las plantas que crecen en esta región son *Sphaeralcea angustifolia* (hierba del negro), *Eryngium heterophyllum* (hierba del sapo), *Loeselia mexicana* (huachichile), *Prosopis glandulosa* (mezquite local), *Tillandsia recurvata* (heno), *Cassuarina equisetifolia* (pinabete), *Calea ternifolia* (prodigiosa o hierba amarga), *Gnaphalium oxiphyllum* (gordolobo) y *Tecoma stans* (flor de San Pedro), las plantas mencionadas han sido utilizadas en la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos con aplicación en Etnomedicina Mexicana, debido a esto dichas plantas requieren una validación científica (Qnais et al.2012) ya que es posible encontrar principios activos que muestren actividad biológica y tóxica (Sorza 2009; Hersch 2007).

2. ANTECEDENTES

Los vegetales son fuente de una gran cantidad de metabolitos secundarios, algunos de estos presentan toxicidad como los flavonoides que tienen la propiedad de causar deformación, fragilidad osmótica y agregación en eritrocitos (Bilto y Abdalla 1998). Otros ejemplos de metabolitos con propiedades tóxicas son glucósidos, inhibidores de colinesterasa, aminas vasoactivas, latirógenos, sustancias fenólicas, alcoholes, fitoestrógenos, inhibidores de proteasas, antiminerales, antivitaminas entre otros (Ruiz 2005; Ruiz 2012). Se han implementado diversas metodologías de ensayo experimental para la búsqueda de compuestos de las plantas con actividad antinutricional, antitumoral y antibacteriana dirigidos a los productos secundarios de las plantas como los polifenoles en general que además de ser capaces de captar radicales libres y actuar como antioxidantes, también pueden llevar a cabo reacciones prooxidantes, actividad citotóxica, anti-inflamatoria y efecto antiapoptótico. Por lo que se hace necesaria la investigación para bioseguridad *in vivo* e *in vitro* (Kondo et al. 1999; Veciana et al. 2014; Murakami et al. 2015; Das et al. 2017).

El proceso de oxidación tiene lugar en plantas y animales y se produce por la presencia de radicales libres generando moléculas llamadas especies reactivas de oxígeno (ROS) las cuales se han vinculado con más de 100 enfermedades (Halliwell 1992). En el caso de la peroxidación se produce una disminución del contenido en ácidos grasos poliinsaturados lo que sensibiliza la integridad celular de las membranas celulares con un incremento de los productos derivados de la reacción que altera las características estructurales y físicas de la bicapa lipídica de las membranas, este proceso puede ser observado en eritrocitos de conejo oxidados (López-Revueltas et al. 2005) y en eritrocitos humanos (Deuticke et al. 1986; Mawatari y Murakami 2001). A los eritrocitos (células especializadas) en la actualidad se le atribuyen otras funciones como intercambio de NO, O₂, CO₂ con proteínas transportadoras, moléculas de adhesión, receptores y vías de señalización.

El eritrocito maduro carece de núcleo, mitocondrias, ribosomas y con imposibilidad de mitosis (Webert et al.2009). Y el 95% de su citoplasma está formado por hemoglobina y enzimas que le ayudan a producir energía y mantener a la hemoglobina en estado reducido (Nguyen et al.2011). El eritrocito es una célula eucariota con proteínas integrales en el citoesqueleto (glucocáliz y cubierta celular), su mayoría constituida por oligosacáridos con funciones de protección física y mecánica, con cargas negativas que atraen cationes y agua del medio extracelular al intracelular (Romer et al.2002), su membrana dinámica le permite desplazarse en todas direcciones sobre el plano de la bicapa, que es afectada por la temperatura, concentraciones de colesterol y ácidos grasos saturados (Sánchez-Yagüe 1987; Sánchez 2009). Además de poseer fluidez en la membrana y proteínas (receptoras) en la superficie de la membrana (González et al.2011; Staroverov et al.2011), los eritrocitos son sensibles al daño por radicales libres y están protegidos por los componentes del plasma como la transferrina, ferritina, y ceruloplasmina que secuestran algunos iones metálicos, enzimas, melanina y sistema glutatión, sin embargo los carotenoides, tocoferoles y flavonoides pueden ejercer su acción tras incorporarse a la membrana, estos compuestos están presentes en organismos fotosintéticos, variando su concentración con la especie vegetal y el medio ambiente en el cual se desarrolla, tienen actividad biológica, farmacológica ó tóxica (Henschler et al.2011). El efecto citotóxico de los compuestos fitoquímicos sobre las líneas celulares VERO, se puede determinar mediante la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) que permite determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas, este método ha sido utilizado para medir supervivencia y proliferación celular (Mosmann 1983; Denizot y Lang 1986; de Castro 2006). Por otro lado también es posible evaluar el grupo de la familia de enzimas que metabolizan los compuestos xenobióticos llamadas citocromos P450 (CYPs), y en particular la enzima CYP3A4. La inhibición de la actividad de las enzimas CYPs causa efectos tóxicos en el organismo y la inducción aumenta su expresión, afectando al metabolismo, eliminación y la eficacia de la droga administrada. Ambos procesos pueden ser evaluados y cuantificados, con la modulación del CYP3A4 (James et al.2009).

2.1 Generalidades

La medicina herbolaria está integrada en el marco legal de la Política Nacional de Medicinas Complementarias e Integrativas en el Sistema Nacional de Salud en México (García Ramírez 2009; NOM-220-SSA1-2012). Existen otros modelos de atención a la salud en las preferencias de la población sin reconocimiento, sin validación y regulación suficiente. Ante este marco de referencia la política intercultural en salud a través de la Secretaría de Salud ha creado en el año 2003 la Dirección de Medicina Tradicional y Desarrollo Intercultural, en la que reconoce la composición multicultural de la sociedad y la realidad en el mundo, la vida, el cuerpo, la salud, la enfermedad y la muerte. Ha incluido herramientas con aporte sinérgico entre los diversos modelos de atención a la salud como es la incorporación de un área específica para abordar la medicina herbolaria (Argueta et al.2000; Argueta et al. 1994). Así pues, la Subsecretaría de Innovación y Calidad, la Dirección General de Planeación y Desarrollo en Salud, y la Dirección de Medicina Tradicional y Desarrollo Intercultural han reconocido la existencia de modelos y aportes con respecto a la salud y la enfermedad, además de otros organismos internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS) (García 2009).

En México en el año 2005, una encuesta telefónica a población abierta, encontró que en 20 ciudades del país se utilizan medicinas complementarias dentro de las que se incluye la herbolaria. El Estado de Durango resultó con el porcentaje más alto (77.8%).Las plantas de la región han sido utilizadas en la Etnomedicina mexicana por lo que requieren una validación científica (Qnais et al. 2012) ya que es posible encontrar principios activos que muestren actividad biológica y tóxica (Sorza 2009). Los vegetales son fuente de flavonoides (Lock O et al. 1994) los cuales tienen la propiedad de causar deformación, fragilidad osmótica y agregación en eritrocitos (Bilto y Abdalla 1998); además de otras toxinas vegetales como glucósidos,

inhibidores de colinesterasa, aminos vasoactivas, latirógenos, sustancias fenólicas, alcoholes, fitoestrógenos, inhibidores de proteasas, antiminerales, antivitaminas entre otros. (Ruiz2012). Por otra parte, los carotenos y tocoferoles son los principales antioxidantes lipofílicos que al unirse a la membrana biológica ejercen su acción (Mahfouz y Kummerow 2000).

2.2 Toxicidad

2.2.1 Prueba de toxicidad en eritrocito

Esta prueba se utiliza para evaluar el efecto tóxico de los extractos de las plantas en estudio sobre la membrana del eritrocito, esto se hace mediante un citómetro de flujo por un proceso que confronta sustancias para valorar el daño en la membrana y requiere de la Anexina V marcada con fluoresceína (Anexina V FITC) que permite identificar en la bicapa de la membrana del eritrocito la exposición de fosfatidilserina (FS) al ser analizada por el proceso de selección celular activada mediante fluorescencia (FACS) y la dispersión de luz (forward and scatter of light) por las células objeto de estudio. Se utiliza como control negativo eritrocitos humanos de donador sano y como control positivo rifampicina para determinar el grado de daño del eritrocito en forma de eriptosis, tamaño y lisis celular en un histograma de fluorescencia.

La prueba de hemólisis de acuerdo a Salvati y Tenti (1981) y Romero et al.(2011) es un examen rápido del potencial de irritación de las sustancias tensoactivas. Los eritrocitos, células especializadas, contienen una amplia categoría de antígenos comprendidos en 29 sistemas, 6 colecciones y dos series. Se creía que su función principal era el intercambio de O₂ y de CO₂, sin embargo, en la actualidad se le conocen otras funciones tales como intercambio de NO y en el sistema inmune dónde contribuye con la liberación de citocinas como IL-1, IL-33 en enfermedad inflamatoria (Kitty de Jong et al. 1997; Kiruthiga et al. 2011; Wei-Min et al. 2014). El eritrocito maduro carece de núcleo, mitocondrias, ribosomas y con imposibilidad de la mitosis; se le considera como un saco de hemoglobina ya que el 95% de su

citoplasma está formado por esta hemoproteína además de enzimas que le ayudan a producir energía y mantener a la hemoglobina en estado reducido, es capaz de expresar proteínas con funciones asociadas a otras células incluyendo una variedad de proteínas transportadoras, moléculas de adhesión, receptores y vías de señalización por lo que el eritrocito es ahora reconocida como el actor principal de un gran número de funciones complejas en los seres vivos (Nguyen et al. 2011).

El eritrocito es una célula eucariota que posee proteínas integrales en el citoesqueleto, que interactúan en su propio medio, parte de estas proteínas forman el glucocáliz, cubierta celular que en su mayoría está constituida por oligosacáridos con funciones de protección física y mecánica en la célula, con cargas negativas que atraen, cationes y agua del medio extracelular al intracelular, reconocimiento y adhesión de moléculas externas (Romer et al. 2002). La membrana del eritrocito le confiere una dinámica que permite que los componentes de ambos lados de la misma puedan desplazarse en todas direcciones sobre el plano de la bicapa (mosaico fluido) y es afectada por factores como; temperatura, concentración de colesterol y ácidos grasos saturados que dificultan su empaquetamiento (Sánchez 2009). La fluidez de la membrana se puede determinar experimentalmente tratando células con anticuerpos fluorescentes que son reconocidos y que se unen a proteínas (receptoras) presentes en la superficie de la membrana plasmática y que posteriormente se agrupan en el polo celular para luego ingresar a la célula por endocitosis (González et al. 2011; Staroverov et al. 2011).

Los eritrocitos son sensibles al daño por radicales libres (Kondo et al. 1999), y sus membranas tienen la capacidad de expandirse alterando su estado físico y la asimetría lipídica en presencia de agentes físicos y químicos, manifestando cambios estructurales y funcionales, los cuales están presentes en diferentes patologías asociadas al estrés oxidativo (Slater 1984; Ritcher 1987; Dinis et al. 1993).

En muchos casos se observa un descenso en la defensa antioxidante, lo que ocasiona una propagación del daño oxidativo en el organismo (Halliwell B 1992; Mahfouz y Kummerow et al. 2000). El eritrocito dispone de diferentes mecanismos de protección frente al daño oxidativo como son algunos componentes del plasma, transferrina, ferritina y ceruloplasmina, que secuestran algunos iones metálicos,

enzimas, melanina y el sistema glutatión y en el caso de los carotenoides, tocoferoles y flavonoides se ha considerado que ejercen su acción tras incorporarse a la membrana celular. Los flavonoides son un grupo muy amplio de sustancias presentes en organismos fotosintéticos, variando su concentración con la especie vegetal y el medio ambiente en el cual se desarrollan y proporcionando a los seres vivos actividad biológica (Henschler et al. 2011).

2.2.2 Ensayo en línea celular VERO

La prueba de proliferación con células VERO tiene el propósito de utilizar el método de tamizaje MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol], cuyo principio se basa en la reducción metabólica de este compuesto por la enzima succinato-deshidrogenasa derivando en un compuesto coloreado (azul) llamado formazán, que permite determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas y es muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular ya que la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. Este método fue desarrollado por Mosmann en 1983, posteriormente fue modificado en 1986 por Francois Denizot y Rita Lang (de Castro 2006; Zandi K et al. 2011; Buchet al. 2012).

2.2.3 Ensayo en *Artemia salina*

El ensayo de letalidad sobre *A. salina* fue propuesto por Michael et al. en 1956, este estudio se basa en la habilidad de matar artemias cultivadas en el laboratorio (Carballo et al. 2002) y es considerado una herramienta muy útil para la evaluación preliminar de la toxicidad (Solis et al. 1993). Se considera a los compuestos biológicamente activos como altamente tóxicos los que presentan una concentración letal media (CL₅₀) de 0 a 5 µg/mL, tóxicos de 6 a 200 µg/mL y no tóxicos de 200 a

1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Meyer et al. 1982). Sin embargo los criterios anteriormente expuestos se recomienda aplicarlos en la citotoxicidad celular. En el presente estudio se utilizó el siguiente criterio: Valores de $\text{DL}_{50} > 1000 \mu\text{g}/\text{mL}$ no tóxico, $\geq 500 \leq 1000 \mu\text{g}/\text{mL}$ toxicidad débil y $< 500 \mu\text{g}/\text{mL}$ tóxico (Déciga-Campos 2007).

2.2.4 Sistema del Citocromo P450

La familia de enzimas conocidas como “sistema del citocromo P450” CYP4A1, CYP4A2, CYP4A y CYP3A4 entre otras (Keshava et al. 2004), desempeñan un importante papel en el metabolismo de fármacos (Danielson 2002). Cuando una sustancia interactúa con esta familia de enzimas aparece una aceleración o una ralentización (ralentiza; es la inhibición de las enzimas CYP450) del metabolismo de esta sustancia y los niveles del fármaco en un organismo pueden aumentar, causando toxicidad y efectos secundarios. Cuando se estimula la producción de las enzimas CYP450 se acelera el metabolismo de los fármacos y estos se eliminan demasiado rápido, haciendo que las concentraciones del medicamento disminuyan hasta niveles ineficaces, por otra parte si se metabolizan múltiples fármacos a través de una vía compartida se puede producir un bloqueo del metabolismo ya que todos los fármacos compiten por los sitios de unión de las enzimas CYP450 (Gang y Suresh 2003). Las isoenzimas de CYP3A4 son las más abundantes y se expresan en el hígado y en menor grado en el aparato digestivo, riñón, pulmón y en las membranas lipofílicas del retículo endoplasmático. Tanto en el hombre como en la rata las enzimas CYP pueden ser inhibidas o inducidas por la administración de las sustancias mencionadas. Otro aspecto importante de CYP450, es que tiene la capacidad de producir metabolitos activos cancerígenos (James et al. 2009).

Este amplio grupo de familia de enzimas involucradas en el metabolismo de fármacos tiene la posibilidad de ser analizado mediante ensayo de inducción enzimática de los CYP3A4, para valorar la toxicidad de los extractos vegetales (Lou et al. 2003). Algunos compuestos xenobióticos como los fármacos, compuestos nutricionales, productos naturales, infusiones y fórmulas tradicionales de medicina pueden producir citotoxicidad hepática, aunque algunas plantas son beneficiosas otras resultan hepatotóxicas. Lo ideal para descubrir los problemas hepáticos ocasionados

por estas sustancias es probar en seres humanos, sin embargo, éticamente no es permitido y para este propósito se han utilizado animales de experimentación aunque ambas especies pueden metabolizar las sustancias de diferente manera, por lo que la toxicidad hepática observada en animales no pudiera ser la misma que en seres humanos. Después de ingerir alguna de estas sustancias, estas pasan al torrente sanguíneo desde los intestinos al hígado, dónde se metabolizan o descomponen en sustancias químicas activas y productos derivados (metabolitos). Algunos de estos metabolitos resultan tóxicos para el hígado y también pueden ser excretados por la bilis, heces y orina. Por otra parte, los productos naturales también pueden modificar las enzimas en las pruebas de función hepática (PFH) como alanina aminotransferasa/aspartato aminotransferasa (ALAT/ASAT) (Nelson 2005). El daño a los hepatocitos es el resultado de un abanico de situaciones como hepatitis, enfermedades autoinmunes, desordenes metabólicos, congénitos o adquiridos, exposición a drogas, productos químicos y fármacos. Sin embargo, el aumento de ALAT/ASAT (enzimas transaminasas) conocido como hipertransaminasemia en suero humano, tiene como una de las causas el consumo de fármacos, sustancias tóxicas y aún productos naturistas aparentemente inocuos. Dentro de los fármacos están los anti-inflamatorios no esteroideos, antibióticos, anticonvulsivantes, inhibidores de la hidroximetilglutaril CoA-reductasa y antituberculosos entre otros. Dentro de los metabolitos secundarios presentes en los vegetales se encuentran los flavonoides y entre estos compuestos están hesperidina (flavonona), naringinina (flavonona), rutina (flavonol), y quercitina (flavonol) los cuales son considerados como moléculas atóxicas. Otros compuestos de los vegetales son los glucósidos cumarínicos también llamados lactónicos y las saponinas. Pero sin duda el grupo de los flavonoides y su empleo como antioxidantes ha tenido un gran auge en el último decenio, más sin embargo no ejercen los efectos esperados o por el contrario estos resultan dañinos. Los mecanismos a través de los cuales ejercen su acción antioxidante resultan de una combinación de propiedades quelantes de metales de transición y secuestradores de radicales libres, así como de la inhibición y acción de otras enzimas. Sin embargo estos compuestos también pueden actuar como agentes prooxidantes, factor probablemente responsable de los efectos mutagénicos y

genotóxicos encontrados para algunos metabolitos secundarios en diversos sistemas experimentales. Algunos de estos mecanismos incluyen la reducción temporal de Cu(II) a Cu(I), la generación de especies reactivas del oxígeno y la afectación de los componentes del sistema de defensa antioxidante en el núcleo celular con la síntesis del sistema glutatión reducido (GSH) [Figura 1], y glutatión unido a proteínas (GSSG) que en su primer paso es llevado a cabo por la enzima glutamato cisteína-ligasa y dónde la velocidad de la síntesis de GSH, liga a cisteína y glutamato, y en un segundo paso es llevado a cabo con la participación de la enzima glutatión sintetasa (Pérez 2003).

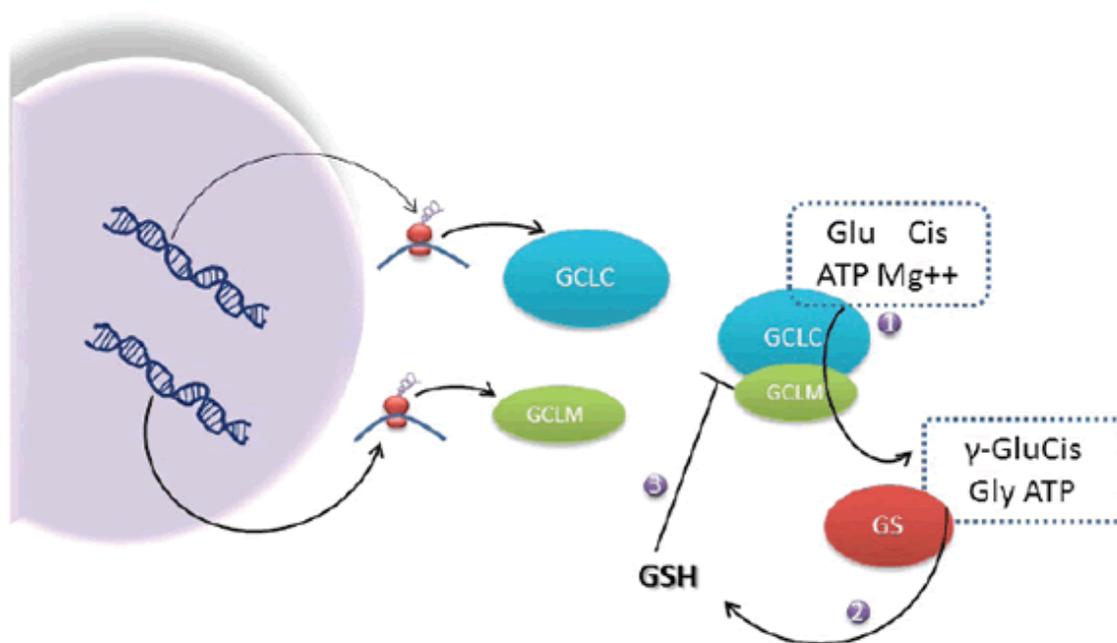


Figura 1. Esquema de la síntesis de GSH.. El primer paso en la síntesis de GSH es llevado a cabo por la enzima glutamato cisteína ligasa (GCL), que está compuesta por una subunidad catalítica (GCLC), y una subunidad moduladora (GCLM). 1. En un paso que limita la velocidad de la síntesis de GSH, GCL liga cisteína y glutamato para formar el dipéptido γ -L-glutamil-L-cisteína. 2. El segundo paso es llevado a cabo por la enzima glutatión sintetasa (GS) que une glicina a γ -L-glutamil-L-cisteína. Ambos pasos son dependientes de ATP. 3. Feedback negativo de GSH sobre la actividad de GCL.

2.2.5 Compuestos con propiedades tóxicas

Dentro de los compuestos químicos que contienen las plantas con propiedades tóxicas en ganado y en la cadena alimenticia están los alcaloides (Harborne 1980), glucósidos (cianógenos o saponinas principalmente), aceites irritantes, ácidos orgánicos, minerales como nitratos, selenio, molibdeno, resinas o resinoides, fitotoxinas y principios tóxicos que ocasionan fotosensibilidad patogénica, algunas plantas contienen dos o más de los principios tóxicos que se mencionan,(Muensher 1951; Kingsbury 1964; González 1989) y ácido oxálico.

2.3 Descripción Botánica y uso etnofarmacológico de las plantas en estudio

A) *Sphaeralcea angustifolia*

Reino: Plantae

Subreino: Traqueobionta

Superdivisión: Spermatophyta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Dillenidae

Orden: Malvales

Familia: Malvaceae

Género: *Sphaeralcea*

Especie: *S. angustifolia*

S. angustifolia también conocida con el nombre común de hierba del negro o cordón, pertenece a la familia Malvaceae. Planta herbácea de 50 cm a 1.5 m de altura. Las hojas son angostas pero más largas que anchas de 5-12 cm de largo, sus bordes son ondulados o a veces con lóbulos más grandes, las flores son moradas o rosadas,

acomodadas en grupos formando un racimo angosto. El cáliz casi redondo dividido en 10-16 partes iguales (Argueta 1994).

Uso etnobotánico: cocimiento de hojas para la vejiga, lavarse el pelo, machacada se usa en golpes, diarrea crónica, y como agua de uso en el estado de Aguascalientes para la diabetes. También en medicina tradicional a *S. angustifolia* se le ha utilizado como emoliente, en tumores, inflamaciones y antidiabético. La capacidad antiinflamatoria ha sido comprobada en estudios experimentales en un modelo en ratas (Meckes et al. 2004).

Compuestos activos: *S. Angustifolia* se le han aislado lignanos- β -peltatin y 4-dimetil-deoxi-podofilotoxina, triterpenos, ácido oleanólico y esteroides. Estudios más recientes muestran los hallazgos de ácido esferálcico y tormentina está última conocida como una cumarina (Argueta 1994; García-Rodríguez et al. 2012). Y ácido 2-(1,8-dihidroxi-4-isopropil-6-metil-7-metoxi)-naftóico, denominado ácido esferálcico (Pérez-Hernández et al. 2014).

B) *Tecoma stans*

Reino: Plantae

Subreino: Traqueobionta

Superdivisión: Spermatophyta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Lamiales

Familia: Bignoniaceae

Género: *Tecoma*

Especie: *T. stans*

T. stans, también conocida con el nombre común de tronadora, flor de San Pedro y alacrancillo, pertenece a la familia Bignoniaceae. Es un arbusto que crece en montes pequeños pedregosos, sus hojas están divididas de 5-13 foliolos, con o sin

vellosidades en la parte de abajo. Produce flores en racimo que semejan pequeñas campanas amarillas. Los frutos son cápsulas de color café oscuro con las semillas provistas de alas (Argueta 1994).

Uso etnobotánico: Hipoglicemiante (Ibarra et al. 2009). Además, se utilizan como aromatizante de jarabes, forraje de ganado aún cuando es considerada venenosa, se encuentra considerada entre las 82 plantas mexicanas hipoglicemiantes de las 269 utilizadas con este fin. También ha sido utilizada por sus propiedades antidiurética y antihelmíntica en ganado, control de fiebre, dolor de estómago, trastornos bucales, ojos inflamados, y en polvo como veneno para cucarachas. En estudios recientes se ha comprobado el efecto nefroprotector de esta planta y además de su importancia como protector en las especies reactivas del oxígeno (ROS) (Raju et al. 2011; Rojo et al. 2002).

Compuestos activos: hojas y raíces contienen monoterpenos y alcaloides (Argueta 1994). En otros estudios se ha encontrado que contiene además, actividad, tecomanina, tecostatina y tecostidina; alcaloides indólicos, eskatol y triptamina, aucubin, plantarenalósido, stanside, stansioside, α -stansioside, β -stansioside, y 5-deoxistansioside; componentes bencílicos ácido cafeico, paracumarico y ferulico y flavonoides como ácido siríngico. En las flores se han identificado dos flavonoides el glucósido y el rutinosido de cianidin (Santillan et al. 2011; Ibarra et al. 2009).

C) *Prosopis glandulosa*

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Subfamilia: Mimosoideae

Tribu: Mimoseae

Género: *Prosopis*

Especie: *P. glandulosa*.

P. glandulosa también conocida con el nombre tepehuano “*bió*” y cuyo nombre científico corresponde a *Prosopis glandulosa* Torr. Clasificada por el autor en la familia de las leguminosas sin embargo en taxonomías más recientes es clasificada en la familia *Fabaceae*. Otros nombres son mezquite, chukata y también conocida como *yag mezquit* y *haas* por el pueblo Serí del noreste de México. Son árboles o arbustos de hasta 12 m de altura y tiene espinas en el tronco. Las hojas están divididas, con apariencia de plumas. Presenta espigas largas de flores blanco-amarillentas. Sus frutos miden hasta 20 cm de largo, se ven aplanados y son de color café-amarillento (Argueta 1994; De Jesús-Gabino 2010). Crece en el suroeste de Estados Unidos y norte de México en matorrales xerófilos y pastizales y en Durango en zonas áridas. También se le conoce como mezquite dulce comestible por especies silvestres y con velocidad de crecimiento mediana, aunque en algunos lugares es considerada como la especie invasora más dañina del mundo (Lowe et al. 2000). Su uso etnobotánico como emético, problemas oculares, erupciones cutáneas, dolor de garganta, diarrea, indigestión crónica, hernia umbilical, constipación, tumores, dolor de estómago y su goma es usada como antiséptico y pegamento, alivia cólicos de bebés, salpullido y sus frutos son comestibles (Lowe 2008). La capacidad antihelmíntica y parasitaria en ganado ha sido demostrada en estudios recientes (López-Aroche et al. 2008; De Jesús-Gabino et al. 2010).

Compuestos activos: monosacáridos como xilosa, manosa, arabinosa y ácido úrico (Argueta 1994; Chogeet al. 2007; George et al. 2011).

D) *Gnaphalium oxyphyllum*

Reino: plantae

Subreino: Tracheobionta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Asterales

Familia: (Compositae) Asteraceae

Subfamilia: Asteroideae

Tribu: Gnaphalieae

Género: *Gnaphalium*

Especie: *G. oxyphyllum*

G. oxyphyllum también conocida con el nombre común de gordolobo. Se distingue por ser hierba lanosa con tallos simples y/o profundamente ramificados. Hojas alternas sésiles, margen entero, terciopeladas, de color verde grisáceo o blanquecino. Capítulos florales pequeños de color blanquecino o amarillento, sin flores liguladas vistosas y a veces solitarias, pero por lo regular agrupados en glomérulos. De amplia distribución desde el sur de Estados Unidos hasta Centro América, pasando por Durango y Tamaulipas hasta Guatemala. Crece en matorrales xerófilos y pastizales en la región de los valles y en bosques templados en la región de la sierra.

Uso etnobotánico como emoliente, expectorante, en afecciones respiratorias, bronquitis, pulmonía, antitusígeno, en cólicos y dolor de estómago.

Compuestos activos: terpenos, flavonoides, glucósidos y compuestos poliacetilados (Torrenegraet al. 1978, 1992; Villagómez-Ibarraet al. 2001).

F) *Eryngium heterophyllum*

Reino: Plantae

División: Angiosperms

Clase: Eudicots

Subclase: Asterids

Orden: Apiales

Familia:(Umbelliferarr) Apiaceae

Género: *Eryngium*

Especie: *E.heterophyllum*

E. heterophyllum también conocida con el nombre común de hierba del sapo. Hierbas bianuales o perennes de aspecto verde grisáceo a plateado cuando están maduras. Tiene hojas coriáceas, que son ásperas, rígidas y frecuentemente en forma de dientes o divisiones espinosas, varias especies tienen hojas basales que se agrupan en forma de roseta, como también hojas solitarias a lo largo del tallo. Las flores están rodeadas de brácteas espinosas blancas, azules y moradas. El fruto es globoso a ovoide y un poco aplanado lateralmente. Crece en bosques templados y en pastizales de la región de la sierra y de los valles.

Uso etnobotánico para calmar la tos, la raíz para aliviar el dolor de estómago y la diarrea, para el mal de orín, para la tiricia, en problemas pulmonares, de vesícula, fiebre, golpes y eliminar las piedras en el riñón. Seca y molida se hierve para golpes internos, y para detener el exceso de menstruación y disminuye los niveles de colesterol y triglicéridos en la sangre.

Compuestos activos: fillocladeno, biciclogermacleno, gama-muuroleno, cariofilleno y diterpenoides (Palá-Paúl et al. 2005).

G) *Loeselia mexicana*

Reino: Plantae

Subreino: Traqueobionta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Solanales

Familia: Polemoniaceae

Género: Loeselia

Especie: L. mexicana

L. mexicana también conocida con el nombre común de Huachichile. Subarbusto densamente glanduloso-pubescente con tallos ramificados desde la base. Hojas simples alternas, subsésiles, espinosas, con margen aserrado. Flores solitarias o en pequeños grupos en las axilas de las hojas, corolas rojas, en forma de embudo largo, hasta de 35 cm con estambres y estilo sobrepasando la corola. El fruto es una pequeña cápsula subglobosa. Común en todo el país en matorrales xerófilos, pastizales y bosques abiertos de encino.

Uso etnobotánico para bajar la fiebre, dolor de cabeza, baños y para que crezca el cabello, propiedades eméticas, purgativa, sudorífica, aumenta la secreción biliar y salival, en dosis mayores provoca vómito y es fungicida. Se usa en el ganado cuando presenta sangre en la orina o en las heces.

Compuestos activos: un alcaloide la loeselina, un terpenoide, fructosa y sacarosa (Márquez et al. 1999; Navarro-García et al. 2007).

H) *Tillandsia recurvata*

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Subclase: Commelinidae

Orden: Bromeliales

Familia: Bromeliaceae

Género: *Tillandsia*Especie: *T. recurvata*

T. recurvata es una planta epífita crece comúnmente en los árboles de roble, encino, mezquite y huizache de la región, requiere apoyo físico y no se nutre de su huésped, recibe nutrientes del polvo y partículas que colectan sus barbas. No afecta la salud de su huésped.

Uso etnobotánico ha demostrado gran actividad antitumoral y en aplicaciones *in vitro* contra VIH/SIDA. El Dr. Henry Lowe en 2008 ha demostrado que produce la muerte de células tumorales por apoptosis (Lowe 2008).

Compuestos activos: dentro de la familia de esta planta se han encontrado: azúcares reductores, flavonoides, taninos y aminoácidos libres. (Alvarado 2007; Lowe 2008; Lowe et al.2013).

I) *Cassuarina equisetifolia*

Reino: Plantae

División: Fanerógama Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Fagales.

Familia: Cassuarina

Género: *Cassuarina L.*Especie: *C. equisetifolia*

C. equisetifolia L. J. R. Forst & G. Forst. 1775. Es un árbol siempre verde de tamaño mediano y crecimiento rápido que alcanza una altura de hasta 45 m. La casuarina es indígena de las áreas costeras tropicales de Australia y el sudeste de Asia. Este árbol se distingue por su corteza áspera y arrugada, de color marrón gris claro y una copa rala de ramillas fotosintéticas de color verde oscuro que se inclinan hacia abajo. Es plantada ampliamente como barrera contra el viento, control de la erosión, a lo largo de las costas arenosas, dunas y al margen de los ríos. También se cultiva como una planta de ornamento y como un árbol de sombra en las costas, al podarse puede formar setos. Es una especie valiosa para la rehabilitación de tierras degradadas o naturalmente estériles debido a su capacidad para la fijación de nitrógeno y a sus altas tasas de producción de hojarasca, lo que facilita el desarrollo sucesional temprano de la microflora y microfauna con comunidades de insectos y aumento de la disponibilidad de nutrientes. La corteza de la casuarina es rica en tanino por lo que junto con las ramillas son usadas para la diarrea y como astringente para granos en la cara en México y en otras partes del mundo por los indígenas de Nueva Zelanda en el tratamiento del beriberi, debido a que poseen propiedades medicinales (Parrotta 1993). En las últimas investigaciones se ha encontrado que es posible utilizarse como biomonitora y bioacumuladora de metales (Upkeboret al. 2010)

J) *Calea ternifolia*

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Asterales

Familia: Asteraeae

Subfamilia: Asteroideae

Tribu: Neurolaenea

Género: *Calea*

Especie: *C. Ternifolia*

Sus tallos y hojas son utilizados con atribuciones medicinales para la bilis, desórdenes gastrointestinales, para el apetito, para la disentería, clarificación de los sentidos, otros nombres y sinónimo científico que se le atribuyen son *Calea zacatechichi* Schltl, *Calea ternifolia* Kunth y establecidos como sinónimos desde Wussow et al., en 1985.

Compuestos bioactivos; sesquiterpenos (calaxin, ciliarin); germacranolidos (1- β -acetoxi zacatechinolido, 1-oxo zacatechinolido, caleochromeno A, y B, calein A, y B, caleicine I y II); acacetin (O-metil acacetin, zexbrevin además de uno y varios análogos de budlein A, neurolenin B, y cefalin A) (Lee et al. 1982; Martínez et al. 1987).

2.3.1 Otros usos sobresalientes de las plantas en estudio

S. angustifolia en el estado de Aguascalientes se utiliza en el agua de uso.

T. stans es utilizada como aromatizante, en forraje para ganado, veneno para cucarachas y como planta de ornato.

P. glandulosa el mezquite dulce es un fruto comestible, también produce una goma que es utilizada como pegamento.

G. oxyphyllum *E. heterophyllum* son utilizadas en el poblado de Doroteo Arango, Durango como bebida en forma de té para acompañar los alimentos.

T. recurvata es utilizada en la decoración de nacimientos navideños y como sensor de contaminación ambiental al captar las partículas de polvo con sus barbas.

C. equisetifolia es plantada ampliamente como barrera contra el viento, en el control de la erosión, a lo largo de las costas arenosas (dunas) y al margen de los ríos. También se cultiva como una planta de ornamento y como un árbol de sombra en las costas. Al podarse puede formar setos. En las últimas investigaciones se ha encontrado que es posible utilizarse como biomonitora y bioacumuladora de metales.

En el caso de *L. mexicana* y *C. ternifolia* sus usos están dirigidos a la medicina tradicional.

2.4 Extracción de metabolitos

Los extractos metanólicos han sido utilizados para separar los compuestos biológicos activos presentes en los tejidos de la planta acompañada de un proceso de extracción adecuada (Wagner et al.1984; USP Pharmacist's 2008). En extracciones de fitoquímicos con aplicación en microbiología tienen una mayor efectividad en un 86% v/v (Aguilar et al. 2010) y en la búsqueda de compuestos naturales con actividad citotóxica y antitumoral en líneas celulares han sido utilizados con éxito por la estabilidad de sus propiedades (Alzadora et al. 2007). Además, al analizar la actividad inmunomoduladora del extracto metanólico de *Caesalpinia spinosa* (Taya) en ratones en dosis hasta de 200-800 mg/kg se concluyó que no alteró la respuesta humoral frente a eritrocitos de cordero en forma significativa y que aún en dosis más elevadas de extracto fitoquímico llegó a mostrar protección frente a la mielosupresión inducida por ciclofosfamida (Bafna et al.2005). Otros estudios relevantes de etnofarmacología con extractos alcohólicos y acuosos en 341 especies de plantas usadas como remedios en humanos concluyeron que los métodos de preparación tradicional tienen diferentes niveles de toxicidad (Cañigual et al. 2003; Bussmann et al. 2011), en extractos obtenidos con diferentes solventes como diclorometano, hexano, etanol, acetona, metanol y agua el comportamiento experimental de la actividad biológica de los extractos crudos de plantas difiere siendo los solventes polares los de mayor toxicidad. Con todo lo anteriormente expuesto (Sanuanpong U. et al. 2008) se atribuye como cualidad importante la polaridad del metanol por su parecido a la molécula de agua y la necesidad de la purificación de los extractos hidroalcohólicos (Boeris 2007). Además de la extracción y caracterización de compuestos bioactivos de las plantas (Sasidharan et al. 2011).

En otro aspecto bioquímico y toxicológico para el metanol se indican los siguientes valores de toxicidad LDo (oral en humanos): 4.28 mg/kg; LD₅₀ (oral en ratas): 5628 mg/kg; LC₅₀ (inhalado en ratas): 64000 ppm /4h; LD₅₀ (en piel con conejos): 15800 mg/kg; Niveles de irritación a piel de conejos: 500mg/24h, moderada; Niveles de irritación a ojos de conejos: 40 mg, moderada (Roger 2006).

3. JUSTIFICACIÓN

La aparición de reacciones adversas, puede tener gran impacto en la salud de los individuos que se encuentren bajo un tratamiento con sustancias bioactivas, dichos compuestos pueden ser de origen natural (Kingsbury 1964). Es escasa la información científica que avale su uso y respalde la seguridad al consumirlo, la mayoría de esas sustancias son metabolitos secundarios que son producidos por la planta principalmente bajo condiciones estresantes como sequía o como mecanismo de defensa ante plagas, por tal motivo es de suponerse que estos compuestos presentan toxicidad al consumirse sin precaución y/o en dosis elevadas, lo que hace necesario el estudio en la medicina herbolaria (Capasso et al. 2000; Lundell et al 1967). En la flora de la Comarca Lagunera existen especies silvestre utilizadas en medicina tradicional para diversos padecimientos, pero se desconoce si estos son seguros para su consumo (Lau et al. 2006; Marinoff et al. 2009; Lomenicket al, 2010).

4. HIPÓTESIS

Los extractos polares (acuoso y metanólico) de los vegetales de *S. angustifolia*, *E. heterophyllum*, *L. mexicana*, *P. glandulosa*, *T. recurvata*, *C. equisetifolia*, *C. ternifolia*, *G. oxyphyllum* y *T. Stans* son tóxicos.

5.DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

Los metabolitos secundarios son sustancias biológicamente activas (terpenos, esteroides, flavonoides, cromenos, benzofuranos, cumarinas, quinonas, fenoles, tioles, y alcaloides), en los últimos años se ha retomado el uso de estos compuestos para beneficio de la salud y se ha demostrado que generan protección contra una gran cantidad de enfermedades tales como:el cáncer, hipoglicemiantes, reductores de colesterol, anticoagulantes, antibacteriales, antimicóticos (Sánchez 2009). La medicina tradicional herbolaria posee poco reconocimiento, sin validación, regulación y sin aprovechamiento suficiente, aun cuando hay cientos de plantas que son utilizadas empíricamente (George 1892; Rafinesque y George 1985), es necesaria la investigación científica en productos naturales. Por tal motivo es importante estudiar las propiedades tóxicas de las plantas medicinales para sí poder garantizar su uso seguro.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Determinar el efecto tóxico *in vivo* e *in vitro* de los extractos acuosos y metanólico de nueve plantas utilizadas en medicina tradicional de la Comarca Lagunera.

6.2 Objetivos particulares

1. Caracterizar los compuestos fitoquímicos de nueve plantas en estudio
2. Determinar el efecto de los extractos acuosos y metanólicos de las plantas en estudio sobre la membrana del eritrocito con peroxidación.
3. Determinar la DL_{50} de los extractos acuosos y metanólicos de las plantas en estudio con el ensayo de *Artemia salina*.
4. Evaluar la citotoxicidad de los extractos acuosos y metanólicos de las plantas en estudio sobre la línea celular VERO.
5. Determinar el daño hepático *in vivo* de los extractos de mayor actividad en ratas Wistar
6. Determinar la inducción enzimática de los citocromos CYP450 de los extractos de mayor actividad.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Colecta e identificación del material vegetal en estudio

Se recolectaron las plantas (*S. angustifolia*, *E. heterophyllum*, *L. mexicana*, *P. glandulosa*, *T. recurvada*, *C. equisetifolia*, *C. ternifolia*, *G. oxyphyllum* y *T. stans*) que posteriormente fueron identificadas en la UAAAN Unidad Torreón, con el N° CRB- Agroecología 002/012. Las plantas fueron recolectadas de acuerdo a las consideraciones bioética del Convenio de Diversidad Biológica (CDB), decisión VI/9 relativa a la Estrategia Global para la Conservación de Plantas (GSPC, por sus siglas en Inglés), (Ginebra 2000, 2002; CIOMS 2009), y condiciones de ética (OMS 2000) y a nivel nacional en la decisión VII/10 en el ámbito Mexicano con responsabilidad en la (CONABIO) Comisión Nacional de la Biodiversidad y de la Estrategia Mexicana para la Conservación Vegetal (EMCV) y consideraciones tomadas de Comisión para la Protección contra Riesgos Sanitarios del Estado de Morelos (COPRISEM 2012). Así como de la NOM-059 SEMARNAT-2010 para la conservación de plantas y los tipos de vegetación más vulnerable. Además, el proyecto recibió el registro: CEI-PROMEPA/103.5/11/5575P/CA 180.

Fueron secadas a la sombra por tres semanas. Enseguida se procedió a moler el material vegetal de cada una de las plantas en molino manual modelo “Victoria”, después de secado y molido el material vegetal se procedió a la preparación de extractos acuosos y metanólicos de las plantas en estudio.

7.2 Obtención de extractos acuosos de las plantas

a. Se colocaron 30 g de material seco de cada una de las plantas en 250 mL de metanol por 2d, en agitación a 20 rpm. El equipo utilizado para agitación fue un Agitador Bag ^{GER} Bill marca Thermolyne [Modelo N° M499235 Serial N°

7219304675S2.] Pasado este tiempo se realizó el primer filtrado utilizando papel filtro de poro grande.

- b. Se obtuvo el extracto crudo del primer filtrado
- c. El marco de la extracción de la planta obtenido del primer filtrado se sometió a una segunda extracción con 250 mL de metanol para extraer la totalidad de los compuestos fitoquímicos de las plantas en estudio.
- d. Posteriormente se recuperó la segunda filtración y se mezclaron ambas partes.
- e. El extracto así obtenido se sometió a rotavapor de la marca Büchi Rotavapor R-200, Heating Bath B-490, Bomba PG 3000 Modelo 282-2F-88/1, High Vacuum Pump Lav-3 Schaumburg, IL, de Fisher Technical Company. Con temperatura sostenida de 55 °C hasta la cantidad de 30mL. Posteriormente fue pasado a una estufa de extracción Vacuum oven Modelo 5831: Precision Scientific Inc. Cat. N° 51220166 Serial n° 603041050 marca NAPCO. Bomba de vacío High vacuum pump Lav-3 de Fisher Technical Company por espacio de 5-8 d, a temperatura de 45 °C hasta completa sequedad. Al terminar el proceso fue guardado en frasco de vidrio ámbar tapa hermética a 4°C hasta su uso.
- f. Para la obtención de los extractos acuosos se utilizó agua bidestilada y desionizada en cantidad de 100mL previamente hervida y medida después del proceso de calentamiento para luego añadir 10g de material vegetal que con anterioridad fue triturado en molino común y de uso manual marca Victoria. Enseguida se procedió a someter la mezcla en agitación constante por 2h a 50 rpm. Después fue filtrada la mezcla agua/vegetal previo enfriamiento y se colocó en viales para después pasar a estos a un congelador So-Low Environmental Equipment Modelo n° C85-9 Serial N° 0506232, a temperatura de -70 °C para posteriormente ser liofilizado en equipo Marca Labconco Serial N° |00627212F Cat. N° 7400030 Marca Triad™.

g. Y se determinó el rendimiento de los extractos con respecto al peso seco en (% p/p).

7.3 Identificación parcial de los componentes de los extractos

Para la disolución de los extractos antes de realizar las pruebas fitoquímicas se utilizó un sonicador (Marca Ultrasonik™ NEY 19H), de 40-50 min y calor hasta su disolución por 2-3 min.

Se realizaron pruebas fitoquímicas colorimétricas para los siguientes compuestos y grupos funcionales: taninos, flavonoides, carbohidratos, dobles enlaces, grupo carbonilo, esteroides, triterpenos, cumarinas, alcaloides, saponinas y sesquiterpenlactonas, siguiendo el proceso que se describe enseguida: de acuerdo a lo descrito por Domínguez (1973, 1988; Palomino 2001; Bruneton 2001).

➤ Taninos

Se realizó la prueba de cloruro férrico también conocida como de oxhidrilos fenólicos disolviendo de 1-2 mg de muestra en un mL de etanol, posteriormente se le añadió a esta mezcla de 3-5 gotas de cloruro férrico al 5%, previamente disuelto en etanol. Para la interpretación se consideró como prueba positiva una coloración verde oscura o negra y una coloración diferente como resultado negativo.

➤ Flavonoides

En la prueba de Shinoda se disolvió de 1-2 mg de la muestra en un mL de etanol, enseguida se agregaron de 3-5 gotas de ácido clorhídrico concentrado y de una a dos limaduras de magnesio. Para la interpretación de la prueba se consideró la formación de una coloración roja intensa como positiva, y la presencia de color anaranjado, verde ó azul es considerado como posible presencia de flavonas, flavononas, flavonoles y xantonas.

➤ Carbohidratos

Conocida como prueba de antrona, para la cual se disolvió 1-2 mg de muestra en agua, enseguida se dejó resbalar por las paredes del tubo la solución recientemente preparada de antrona al 2% disuelta en ácido sulfúrico concentrado. En la prueba

positiva se consideró la aparición de una interfase en forma de anillo azul-verdoso ó violeta.

➤ Dobles enlaces

Se disolvieron de 1-2 mg de muestra en agua (otros disolventes alternativos son acetona o metanol) y se añadió de 3-5 gotas de permanganato de potasio al 2% disuelto en agua. La prueba positiva se interpretó por la observación de decoloración o formación de precipitado café indicativo de bióxido de manganeso.

➤ Grupo carbonilo

En la prueba de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DFNH), se procedió a preparar 100 mg de DFNH + 10mL $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ + 3 mL de HCl, para luego aforarse a 100 mL de agua destilada. De esta preparación se colocan de 3-5 gotas en la muestra previamente disuelta en etanol. Para la interpretación de la prueba se consideró la presencia de color amarillo, naranja ó rojo como positiva, otra coloración como negativa.

➤ Esteroles y triterpenos

Para esta prueba se procedió a preparar 1mL de ácido acético anhidro, 1mL de cloroformo y tres gotas de ácido sulfúrico concentrado. La muestra se disolvió en 1 mL de cloroformo (también es posible realizarse sin disolver la muestra). Para la interpretación se consideró como prueba positiva para esteroles la presencia de color azul o morado, y para triterpenos un color rojizo.

➤ Cumarinas

Se procedió a disolver la muestra (1-2 mg), en una solución de hidróxido de sodio al 10% en agua. La prueba positiva se consideró por la aparición de coloración amarilla, color que desaparece al añadirse unas gotas de ácido clorhídrico al 10%.

➤ Alcaloides

En la prueba de Dragendorff (modificada) se prepararon los reactivos; A) se disolvió 0.85 g de nitrato de bismuto en una mezcla 10:40 mL de ácido acético:agua. B) 8.0 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua destilada. Se preparó una mezcla de la solución A y B a razón de 5:5 mL + 20 mL de ácido acético y se aforó con agua a 100 mL. Una pequeña cantidad de muestra se colocó en placa de porcelana, se

disolvió en etanol y de la mezcla de reactivo preparada se le añadieron dos gotas. La formación de un precipitado naranja se consideró como prueba positiva.

➤ Saponinas

Se disolvieron 1-2 g de la muestra en 1 mL de agua, se agitó vigorosamente y se observó la presencia de abundante espuma persistente en las muestras con respuesta positiva.

➤ Sesquiterpenlactonas

En la prueba de Baljet se partió de la preparación de dos soluciones: A) 1g de ácido pícrico en 100 mL de etanol, B) 10g de hidróxido de sodio en 100 mL de agua. La muestra se disolvió de 3-4 mg en 1 mL de etanol, de esta última solución se tomaron 100 μ L y se les añadió de la mezcla de los reactivos A y B, en partes iguales de 3-4 gotas. La interpretación positiva de la prueba se da por una coloración anaranjada ó roja oscura.

7.4 Análisis de los extractos de las plantas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Se utilizó un cromatógrafo de líquido AgilentTechnology modelo 1200 (AgilentTechnology, CA, EUA) acoplado a bomba cuaternaria y detector de arreglo de diodos. La separación se realizó con dos columnas Discovery® C18 de 15cm x 4.6 mm, 5 μ m (SupelcoAnalytical, PA, USA) conectadas en serie y un loop de 20 μ L. La fase móvil consistió de fosfato de amonio 50mM ajustada a un pH de 2.6 con ácido fosfórico (A), acetonitrilo:fosfato de amonio 80:20 (B) y ácido fosfórico 200mM (C). El gradiente fue: 100% de A por 5 min, 92% A y 8% B por 8 min, 14% B y 86% C por 20 min, 16.5% B y 83.5% C por 25 min, 21.5% B y 78.5% C por 35 min, 50% B y 50% C por 70 min, 100% A por 75 min. La rutina fue monitoreada a 365 nm y las antocianinas a 520 nm (Del Caro y Piga 2008). La cuantificación de los compuestos se llevó a cabo por curvas de calibración con estándares de los mismos en concentración de (1000 μ g mL⁻¹) 70:30 metanol: agua. Para los extractos de las plantas en estudio se procedió de la misma manera. Se utilizaron como estándares: rutina (cat. 78095), ácido clorogénico (cat. 00500590), ácido gálico (cat. G7384),

ácido siríngico (cat. S6881), catequina (cat. 43412), epicatequina (cat. 68097) y quercetina (cat.1592409) de Sigma-Aldrich respectivamente.

7.5 Evaluación de la actividad biológica de los extractos en eritrocitos humanos

Se trabajó con eritrocitos humanos de donador voluntario y sano obtenidos mediante consentimiento informado para realizar las pruebas que se describen a continuación.

7.5.1 Actividad biológica y citotóxica de los extractos en eritrocitos por Citometría de flujo

Se recolectó la muestra y se determinó biometría hemática completa (BHC) en el contador hematológico Modelo Sysmex KX-21N. Marca Roche Sysmex. Utilizando anticoagulante CDP/ADSOL™. [Citrato, dextrosa, fosfato, adenina y modificaciones de solución salina, adenina y glucosa (SAG); ADSOL: mayor concentración de adenina y glucosa] para asegurar la sobrevivencia de los eritrocitos, preservar la inalterabilidad de la membrana, prevenir hemólisis, conservación de factores de coagulación y evitar el desarrollo microbiano. Con las siguientes funciones: el citrato de sodio: fija los iones calcio (Ca^{2+}) en la sangre y los intercambia por sal de sodio que impide la coagulación. Fosfato: asegura el metabolismo de los eritrocitos durante el almacenamiento permitiendo que al ser transfundidos continúen con la función de liberar oxígeno a los tejidos. Dextrosa: mantenimiento de la membrana. Adenina: provee de energía al eritrocito.

Las concentraciones utilizadas fueron: citrato de sodio dihidratado 2.63 g, ácido cítrico anhidro 299 mg, dextrosa anhidra 2.32 g, fosfato de sodio monobásico monohidratado 222 mg, hidróxido de sodio 1.0 N, para ajuste de pH en agua inyectable cbp 100mL.

Se procedió al ajuste de células $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ tomado $1 \mu\text{L}$ de sangre total en 5mL de PBS (solución buffer de fosfatos diluyente Cell Pack) y $1 \mu\text{L}$ de sangre total en 5mL de solución de HANKS´ [sal modificada y balanceada Cat. H-2387; KCL 1-5%; glucosa 9,5-11,6 %: pH 7,1-7,4] ajustado después de ser preparado a pH 7,4 y

suplementado con NaHCO_3 en solución de 0.35 g L^{-1} . La solución se preparó con 9.5 g L^{-1} de polvo de HANKS' en 1 L de agua inyectable. La solución de HANKS' se filtró con una bomba de vacío Barnant.CO Modelo 400-1901, utilizando un filtro # 431154 Corning Incorporated de 150 mL; sistema de filtro $0,22 \mu\text{m}$ celulosa acetato (CA). Y para el análisis por citometría de flujo se utilizó un equipo, FACSCalibur E4807-Becton Dickinson. Para este proceso se requiere un marcaje previo de los eritrocitos, basado en la unión de la fosfatidil serina (PS) exteriorizada con la proteína anticoagulante anexina V conjugada con el compuesto fluorescente isotiocianato de fluoresceína (FITC) y donde la intensidad de la fluorescencia emitida por la muestra puede ser cuantificada mediante citometría de flujo, siendo directamente proporcional al grado de exteriorización de la PS en la superficie del eritrocito. Además, los eritrocitos (100% de hematocrito) se suspenden al 0.4% de hematocrito (Kitty de Jong et al.1997) y $/\text{ó } 10^5\text{-}10^6 \text{ células mL}^{-1}$.

Se utilizó Rifampicina, antibiótico bactericida del grupo de las rifamicinas y componente semisintético derivado de *Amycolatopsis rifamycinica* (previamente conocido como *Amycolatopsis mediterranei* y *Streptomyces mediterranei*). Y su mecanismo de acción bacteriana es inhibir la RNA polimerasa mediante su unión a la subunidad beta de esta molécula (Trevor et al. 2004).

El efecto de la rifampicina es conocido en los tratamientos de tuberculosis y sus efectos incluyen anemia hemolítica y pérdida de eritrocitos circulantes como resultado de la estimulación de eriptosis que es la muerte suicida del eritrocito caracterizada por encogimiento de la membrana celular y la exposición de fosfatidil serina (PS) expuesta en la superficie de la célula con incremento de la actividad del Ca^{2+} en el citosol y formación de ceramida (Abed et al. 2012; Jilani y Lang 2013). Por lo anteriormente expuesto la rifampicina se utilizó para la curva del proceso de eriptosis y se preparó de la siguiente manera: una capsula de rifampicina de 300 mg fue disuelta previamente en 1mL de etanol al 96% y se aforó a 300 mL de agua inyectable, posteriormente se ajustó la concentración de $1\mu\text{g}$ de rifampicina en $1\mu\text{L}$ de solución. Se conservó a $2\text{-}8^\circ\text{C}$ hasta el momento de su uso.

7.5.2 Manejo de extractos

Se eligieron los extractos acuosos en vez de los metanólicos ya que la forma de infusión es la más frecuentemente utilizada. Se consideraron los criterios de Toxicidad de Déciga-Campos et al. 2007, con los valores de concentración Letal (CL_{50}) de $CL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ (no tóxico); $\geq 500 \leq 1000$ (toxicidad leve); < 500 (tóxico). Y se trabajó con las concentraciones de 1500, 1000, 500, 100, $\mu\text{g/mL}$ de los extractos diluidos en agua de mar artificial de las plantas en estudio.

Para el ensayo de los extractos con los eritrocitos se partió de una concentración de acuerdo a la siguiente conversión: 1 mg de extracto en un mL= 1000 μg en 1000 μL = $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$. Se resuspendido cada extracto en solución de HANKS'. Tabla 1.

Tabla 1. Esquema de trabajo para los extractos acuoso de las plantas en estudio para evaluar el proceso de eriptosis.

	C. sin teñir	C. teñido	C. Rif (μg)	Planta en estudio Concentración (μg)			
Células							
$1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$, en HANKS	√	√	√	√	√	√	√
Extracto				1000	500	100	10
Rifampicina			50				
24 h, 37°C	√	√	√	√	√	√	√
Anexina-V- FITC		√	√	√	√	√	√

C= Control, √=Incluido en el proceso, este esquema de trabajo se realizó con n=3.

1. De las células ajustadas a la densidad 1×10^6 en HANKS' se tomó 1 mL, se centrifugaron a 1500 rpm; 22 °C; aceleración de 5/desaceleración de 5; tiempo 5 min.

2. Se decantó el sobrenadante con un movimiento rápido y seguro en un solo evento.
3. Se resuspendió el pellet suavemente en 1 mL de HANKS', (dispensando con puntilla y sobre el borde del tubo con suavidad) y se repite el proceso nuevamente.
4. Del pellet resuspendido se tomaron 100µL y se colocaron en tubo de Selección Celular Activada mediante Fluorescencia (FACS), perfectamente limpio y rotulado.
5. A los 100 µL de la suspensión celular se le añadió 200 µL de HANKS', se mezcló suavemente (con pequeños golpecillos con la yema del dedo índice sin que se formará espuma o se agitate bruscamente para evitar destrucción y daño celular).
6. Se realizó lectura en Clitómetro de Flujo. En todo el proceso se utilizó tubo (FACS).

Para establecer el recuento normal y el proceso de eriptosis así como el ajuste de eventos s^{-1} del control sano.

Para el protocolo de Tinción con Anexina V-FITC (Annexin V FITC, cat. 11-8005), se procedió de la siguiente manera:

1. Se diluyó el buffer de unión (10X Binding Buffer -cat. 00-0055), con H₂O destilada (1mL de buffer de unión + 9 mL H₂O destilada) antes de utilizarse en el protocolo en cuestión.
2. Las células fueron lavadas en HANKS' una vez y una segunda vez con buffer de unión.
3. Enseguida las células se resuspendieron en 1 mL de buffer de unión al $1-5 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$.
4. Se tomaron 100 µL de la suspensión celular previamente ajustada y se añadió 5 µL de anexina V-fluorocromo-conjugada.
5. Se Incubó 22-28 °C por 10-15 min.
6. Se lavaron las células en buffer de unión. Posteriormente se resuspendieron en 200 µL de buffer de unión.

7. Y se analizaron por citometría de flujo dentro de las siguientes 4 h, conservándose en obscuridad a 2-8 °C. Tabla.2.

Tabla 2. Proceso para la elaboración de la curva en eritrocitos expuestos a rifampicina.

	C. sin teñir	C. teñido	Rifampicina (µg)			
			25	50	75	100
Células 1×10^6 mL ⁻¹ en HANKS´	√	√	√	√	√	√
4h a 37 °C	√	√	√	√	√	√
ANEXINA-V-FITC		√	√	√	√	√

C = control√; incluido en el proceso, este esquema de trabajo se realizó con n=3.

7.5.3 Volumen Corpuscular Medio (VCM)

Para el ensayo de Volumen Corpuscular Medio (VCM) en eritrocitos, que es indicativo del volumen individual del eritrocito, dónde el promedio del volumen de las células rojas es un valor utilizado para clasificar anemia y que prevé los primeros indicios patológicos de los desórdenes en eritrocitos al indicar el decremento ó incremento en el tamaño normal de la célula. Se procedió a ajustar las células a 1×10^6 cel mL⁻¹ en buffer de fosfatos (Cell Pack) de concentración 0.1M; pH 7.5, con uso de Calibradores y controles, EIGHTCHECK-3WP, de Sysmex. Los extractos de las plantas en estudio se procesaron en una dilución 1:1, extracto: células ajustadas a 1×10^6 , a razón de 100µL:100 µL. La concentración fue de 500µg de cada uno de los extractos acuosos y metanólicos además de realizarse por triplicado, posteriormente se mezcló suavemente y se mantuvo a 20- 25 °C por 24 h, después se realizó la lectura de VCM en equipo automatizado Sysmex KX-21. Se tomó como valor normal (VN), 80-97fL (Williams y Wilkins. 2009).

7.5.4 Ácido Tiobarbitúrico/ Malondialdehido (TBARS/MDA)

Los extractos acuosos y metanólicos en concentración de 500µg también fueron sometidos a ensayo de sustancias reactivas de ácido tiobarbiturico (TBARS)/(MDA) malondialdehido para la búsqueda de peroxidación de lípidos como mecanismo de daño celular siguiendo el método de (Yagi K. 1998; Armstrong et al 1994; Dawn-Linsley et al 2005) y se utilizó TBARS Assay Kit ítem N°.10009055 de *Cayman-CHEMICAL* www.caymanchem.com

Los eritrocitos se ajustaron a una concentración de 2×10^7 células en buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.5, se sonicaron a 40V tres veces y se colocaron en hielo, para luego utilizar la totalidad del homogenizado en el ensayo y el blanco de reactivo fue solución de buffer de fosfatos. Posteriormente se preparó una suspensión de extracto-eritrocito de 100µL:100µL respectivamente. Los reactivos fueron preparados previamente antes del ensayo de acuerdo a las especificaciones del kit, los estándares, calibradores, blanco de ensayo y extractos de cada una de las plantas en estudio a concentraciones de 1500, 1000, 750, 500, 250, 100, 10, 1 µg mL⁻¹), se corrieron por duplicado así como el blanco de ensayo, utilizando una placa de 96 pocillos con un volumen final de 150µL, la absorbancia fue monitoreada a 530-540 nm, emisión de longitud de onda de 550nm y excitación de 530 nm. Por colorimetría los valores de TBARS/MDA son de 0- 50µM, y fluorométricamente de 0-5 µM, con valores normales en plasma humanos de 1.86- 3.94 µM. En el presente ensayo la prueba fue de tipo colorimétrico. La preparación del estándar se describe en la Tabla 3.

Tabla.3. Preparación del Estándar colorimétrico para la medición de MDA a partir de una solución de 125 μ M de MDA.

Tubo	MDA(μL)	Agua (μL)	MDA Concentración (μM)
A	0	1000	0
B	5	995	0.625
C	10	990	1.25
D	20	980	2.5
E	40	960	5
F	80	920	10
G	200	800	25
H	400	600	50

Una vez numerados e identificados cada uno de los estándares y las muestras de las diferentes concentraciones de cada extracto en tubos FACS de 5 mL se añadieron 100 μ L de extracto y/o estándar + 100 μ L de solución de sodio dodecil sulfato (SDS) y se mezcló, enseguida se dispensaron 4 mL, de reactivo de color depositándose hasta el fondo del tubo, se tapó cada vial y se llevaron a ebullición todos los viales por 1h. Pasado este tiempo se sacaron los viales y se colocaron en baño de hielo para detener la reacción por espacio de 10 min. Y se centrifugaron a 1600 x g a 4°C, enseguida se dispuso del contenido de los viales a placa transparente de 96 pocillos la cantidad de 150 μ L y se leyó la absorbancia en lector de ELISA (WHY 101).

7.5.5 Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂)

Se utilizó un kit de Hydrogen Peroxide Cell-Based assay, de Cayman Chemical Item Number 600050. El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) es un subproducto natural de metabolismo de oxígeno y tiene la capacidad de ser un fuerte oxidante por lo que es considerado una especie de oxígeno reactiva (Varma y Devamanoharan 1991; Zhou et al. 1997). Está bien establecido que H₂O₂ es un agente citotóxico, sin

embargo, otras pruebas también sugieren que pueda ser un regulador importante de transducción de señal en células eucariotas (Song et al. 2007). Este ensayo es simple y hace posible la cuantificación sensible de H_2O_2 en células cultivadas ó en suspensión. La molécula de H_2O_2 es detectada utilizando 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (ADHP), una sonda muy sensible y estable para esta molécula. En presencia de peroxidasa de rábano, ADHP reacciona con el H_2O_2 con una estequiometría 1:1 la cual produce resorufin que es sumamente fluorescente (excitación = 530-560 nm; emisión = 590 nm). Además, se utilizó la enzima catalasa que provee el mismo kit como control para la comprobación de la reacción de eliminación del H_2O_2 , por la catalasa, así como también agua grado HPLC. Para la preparación de los reactivos y los eritrocitos se siguieron las condiciones del pre-ensayo establecidos en el kit, para estándar y controles de H_2O_2 y solución de la enzima de reacción. Las células se ajustaron a 10^4 - 10^5 , en 100 μ L de solución de HANKS'. El control y estándar (a concentraciones de 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.313, 0.156 y 0.0 μ M, respectivamente) y se realizó por duplicado, mientras que las muestras que contenían los extractos por triplicado. En los pocillos se colocó la cantidad de 100 μ L de células y 100 μ L de cada extracto (acuoso y metanólico) en concentración de 1500, 1000, 750, 500, 250, 100, 10, y 1 μ g mL^{-1} , respectivamente, por triplicado. Y se incubaron en una atmósfera de 13-15% de CO_2 , a 37°C, por 24 h, las placas se centrifugaron a 400 g por 5 min, enseguida se transfirieron 80 μ L del sobrenadante al sitio correspondiente de la nueva placa negra, se añadieron 10 μ L de buffer de ensayo a las muestras que contenían los extractos para medir su actividad, así como al estándar. Y la enzima catalasa se añadió solo al control positivo. De la solución de enzima de reacción 10 μ L a estándar, muestra control y muestras problema, este esquema de proceso se indica en Tabla. 4.

Tabla.4. Proceso de dispensación de muestras, controles y estándar en el ensayo H₂O₂.

Pocillo de la placa reacción	Estándar μ L	M control μ L	M con extracto μ L
Muestra y / ó Estándar	80	80	80
Buffer de reacción	10	-	10
Catalasa	-	10	-
Solución de enzima de reacción	10	10	10

M = muestra

La placa se incubó con agitación orbital constante de 20 min a temperatura de 20-25°C, y se midió la fluorescencia a 530-590nm. En lector de ELISA (WHY 101). Se conoce que los valores fisiológicos normales extracelulares de H₂O₂ son de (1-10 μ M) y en concentraciones más elevadas produce estrés oxidativo y daño al DNA (Amundson et al. 1999; Song et al. 2007; Zhou et al. 1997).

7.5.6 Actividad biológica y toxicidad de los extractos en *Artemia salina*

Ensayo de letalidad sobre *A. salina*

Se pesaron 0.1g de huevecillos de *A. salina* (Brine Shrimp Eggs® San Francisco Bay Brand, Inc.), y se les añadieron 300mL de agua de mar artificial (Cora life Scientific Grand Marine Salt) para incubarse a pH 8.1-8.4, 20-30°C por 48 h, con bomba de aire (ELITE-799) y se permitió la eclosión de nauplios. Se probaron cuatro concentraciones (100, 500, 1000 y 1,500 μ g mL⁻¹) de cada uno de los extractos por triplicado y previamente disueltos en agua de mar artificial. Para el control positivo se utilizó K₂Cr₂O₇ al 5%, la prueba se realizó utilizando 10 larvas de *A. salina* por pozo en 100 μ L de agua salada artificial en microplacas de 96 pozos, las diferentes concentraciones de los extractos fueron agregadas en alícuotas (100 μ L) a los pozos con larvas, la microplaca se incubó a temperatura ambiente por 24 h (Meyer y Ferrigni 1982). Se contó el número de organismos vivos y muertos para determinar la viabilidad y la dosis letal 50% (DL₅₀). Se calculó la desviación estándar de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. El criterio de

toxicidad fue el siguiente, los valores de $DL_{50} > 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ se consideraron como no tóxicos, de $\geq 500 \leq 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ con toxicidad débil y de $< 500 \mu\text{g mL}^{-1}$ tóxicos (Déciga-Campos 2007). Los datos se analizaron con el paquete estadístico IBM SPSS-20 Statistics por Regresión Provit para calcular la DL_{50} .

7.5.7 Actividad biológica y evaluación citotóxica de los extractos sobre la línea celular normal VERO

Las células VEROATCC CCL81 de Sigma de riñón de mono verde africano (*Chlorocebusaethiops*) fueron donadas por Departamento de Inmunología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional por la Dra. Ma. Maximina Bertha Moreno Altamirano del Laboratorio de Inmunorregulación. El desarrollo del experimento fue realizado en Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Autónoma de Coah. (CIB).

Previo al ensayo del cultivo celular se procedió a realizar las pruebas de esterilidad de los reactivos y materiales a utilizar de proveedor Sigma Aldrich. Dulbecco's Modified Eagle's Medium-High glucose -L- glutamina (DMEM) cat. 6429, tripsina al 0.25% T4049, suero fetal bovino (SFB) y tampón de fosfato salino (PBS). Las células fueron cultivadas en condiciones de humedad, 5% de CO_2 , a 37°C , manteniéndose del pase No 19 hasta el No 25 para ajustar las condiciones de proliferación y mantenimiento celular. Para el ensayo de citotoxicidad las células fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con SFB al 10%, antibiótico-antimicótico 10 mL L^{-1} A5955, en envases de cultivo (Sigma® 150 cm cell culture flask) SIAL0825-50EA. En la siembra se utilizó campana NuairTM Mod. NU425-300 clase II, la incubación se hizo en estufa Cole Parmer Equipar con 5% CO_2 a 37°C , con observaciones de cada 24 h, utilizando microscopio invertido Labomed^R TCM400 hasta la aparición de monocapa. Las células se lavaron con 5mL de PBS y con ligero "vaivén" se mezclaron suavemente, se decantó el lavado, se añadió DMEM con SFB al 2% y se pasaron a caja de Petri True Line TR4002 de 100mm para cultivo celular (con la finalidad de ayudar en el intercambio de gases). Se añadió 5mL de tripsina al 0.25% y se pasaron a incubación con 5% de CO_2 a 37°C

por 5-10 s, y para su separación hasta despegar la monocapa. Pasado este tiempo se añadieron 10 mL PBS + 5mL de DMEM-SFB, se mezcló y centrifugó a 8000 rpm a 22°C por 12 s, se decantó el sobrenadante y se trabajó con el pellet celular. (Simultáneamente se realizó el siguiente pase celular con su respectivo registro y se observó al microscopio para constatar la viabilidad). El pellet celular fue resuspendido con 1mL de medio de cultivo, se mezcló suavemente y se tomaron 10µL de la suspensión celular más 90µL (1:10) de azul de tripan al 4%, se montó en cámara de Neubauer y se procedió a leer en microscopio invertido contando los cuatro cuadrantes de los extremos, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Recuento total de células/mm}^3 = \frac{\text{Células contadas} \times \text{factor de dilución}}{\text{área (4mm}^2\text{)} \times \text{profundidad (0.1)}}$$

Se sacó el número de células mL⁻¹ y se procedió al llenado de placa de 96 pocillos ajustadas a 100 000 cel. mL⁻¹, en cada pocillo en 100µL de volumen final (10 000 células). La placa fue incubada con 5% CO₂ a 37° C por 24 h. Posteriormente fueron lavadas con PBS 100µL en cada pocillo y se decantó. Los extractos fueron preparados previamente en diluciones de 1000, 100, 10 µg mL⁻¹ respectivamente en medio DMEM-SFB al 2% y añadidos a las células en ensayos por triplicado para cada planta (y repetido dos veces más) posteriormente se procedió a la incubación por 24 h en las condiciones mencionadas.

Pasado este tiempo las células fueron lavadas con 100 µL de PBS por cada pocillo, se decantó el lavado, se añadió PBS 100µL y se realizó el ensayo de Invitrogen- alamarBlue® (DAL1025) para la viabilidad celular y muerte celular. El reactivo alamarBlue® penetra al interior de la célula no es tóxico, no es fluorescente sin embargo cuando penetra al interior de las células íntegras estas son capaces de reducir el compuesto resazurin a resorufin, un compuesto de color rojo altamente fluorescente. Las células viables continúan convirtiendo el resazurin a resorufin incrementando la fluorescencia alrededor de la célula. Figura 2.

A cada pocillo se le añadieron 10µL de reactivo alamarBlue® por cada 100µL de muestra colocada en el pocillo. Se esperó un lapso entre 1-4 h de incubación con 5%

de CO₂ a 37° para posteriormente ser leído en lector de ELISA-Dynatech MR5000 a 570nm. Posteriormente los datos fueron analizados en GraphPad Prism 6-Demo.

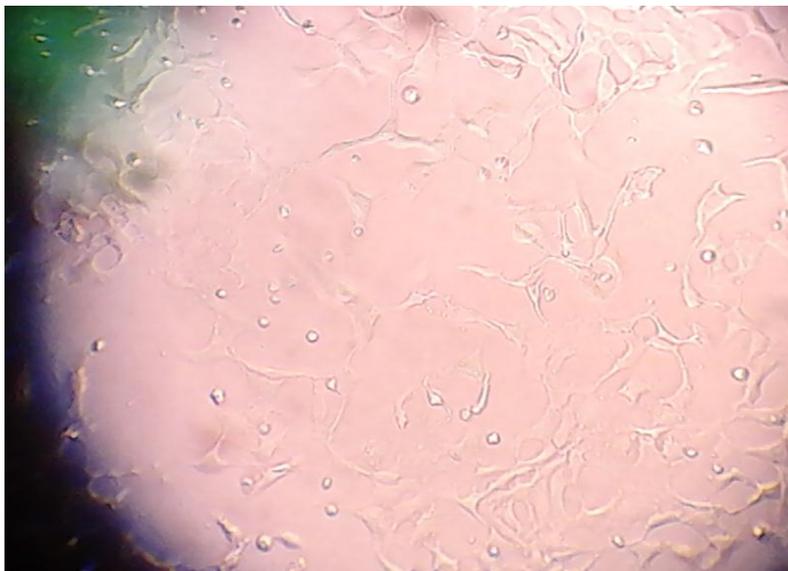


Figura 2. Viabilidad de células normales VERO observadas en microscopio invertido.

7.5.8 Daño Histopatológico en ratas macho Wistar

El estudio se realizó en el Centro de Investigaciones Biomédicas (CIB) de la Universidad Autónoma de Coahuila en la Ciudad de Torreón, 24 ratas macho (*Rattus norvegicus*) de la cepa Wistar de 6-8 semanas de edad, peso aproximado 200 g. Se mantuvieron en un ambiente con temperatura de 22-24°C; ciclos de luz / oscuridad 12/12 h. 55-60% de humedad relativa y con acceso al alimento y agua *ad libitum*. La ruta de exposición de ingestión fue la dosis de referencia oral (RfDo) para sustancias tóxicas no carcinogénicas (Moo-Puc et al. 2011), por 7 d a razón de una dosis c/24 h. Se trabajó con los extractos acuosos de *C. ternifolia* y *P. glandulosa*. Los extractos acuosos fueron preparados en agua inyectable en las concentraciones de 250, 750 y 1700 $\mu\text{g mL}^{-1}$, de cada una de las plantas previamente mencionadas por triplicado. Como control positivo se utilizó rifampicina 1700 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (antibiótico que es oxidado por la isoenzima CYP3A4, además de inmunosupresor

e inductor de mayor relevancia clínica para [CYP3A4] y como control negativo agua inyectable a razón de 1mL, también por triplicado.

Las 24 unidades experimentales (ratas) fueron pesadas previo al ensayo y distribuidas en jaulas 8 x 3 unidades experimentales. Pasado el tiempo establecido se recolecto muestra de sangre con anticoagulante para análisis hemático y sin anticoagulante para análisis bioquímico, enseguida se sacrificaron por dislocación y se realizó la recolección de tejidos y órganos para análisis histopatológico en formalina tamponada al 10 % (agua destilada 900mL; formalina al 37% 100mL; fosfato de sodio monobásico 4g; fosfato de sodio dibásico 6.5g. [disponible en; [http://: www.sovepem.org.ve](http://www.sovepem.org.ve)].

Otra parte de tejido fue lavado en formalina tamponada y conservado en RNA*later*, RNA Stabilization Reagent (cat.76106) de QIAGEN, colocando (100µL de Buffer de lavado + 100µL de RNA-later) con aproximadamente 3-5µg (0.5cm) de tejido en tubo eppendorf y se guardó a -20° C por tiempo indefinido, para identificación posterior de RNA.

Parte del tejido conservado en formalina tamponada se sometió a fragmentación celular utilizando sacarosa 0.34 M y en un *Potter* de 10 mL (Modelo-196310) tomando de 5-10 g de tejido. El tejido se disoció utilizando hielo seco para evitar el calor y la pérdida de orgánulos celulares y se suspendió en exceso de medio de sacarosa (de 4-10 veces el volumen del tejido antes de centrifugar). Se inició con 600 gravedades por 10 min, seguidas de 10 000 por 15 min, 10 000 por 15 min, 20 000 por 60 min (dos veces) y 10 000 por 15 min. En cada evento se homogenizaba el tejido triturado con sacarosa antes de volver a centrifugar en Ultracentrífuga-PB02.

7.5.8.1 Análisis Histopatológico de hígado y riñón

Los órganos conservados en formalina tamponada al 10%, fueron trasladados al Laboratorio Tisular y Molecular Matriz-Torreón Coah, dónde se procedió a colocar cada una de las piezas en la plancha de disección, seleccionando el lóbulo principal

en el caso del hígado para realizar el corte y ser colocado en la capsula de proceso, de la misma forma se trabajó para la pieza de riñón. En este paso se realiza la primera descripción anatómica como medición y características físicas observables. El tejido en la cápsula se colocó en formalina por 7 h posteriormente fue sacado y colocado en Histokinet (Van Wissel – procesador digital de tejidos), con 12 jarras de proceso y por un tiempo de 12 h quedando lista la cápsula y embebida en parafina, se sacó se pasó al molde en cubo para realizar la inclusión del tejido en parafina, se permitió que se enfriara colocándose sobre hielo posteriormente los cubos de parafina con el tejido fueron rebajados utilizando equipo de Microtome (“820” Spencer), con navaja de bajo perfil hasta cortar piezas del tejido de interés. Los finos cortes de parafina se pasaron a baño de flotación (Tissue Floating Bath. XH-1001) a 52°C para lograr el extendido perfecto del corte realizando dos por cada pieza de tejido, se sacaron y colocaron en laminillas previamente identificadas, se procedió a desparafinar de 15-30 min en estufa (Fisher Scientific IsoTemp Incubator) a 60°C, se sumergieron en xilol concentrado por 10 min y se procedió a la tinción en el tren de quirúrgica de la siguiente manera: 20 pases en alcohol absoluto, 20 pases en alcohol al 96°, se secaron las laminillas en toallas de papel y se enjuagaron con agua corriente, se secaron y se dejaron 5 min en hematoxilina, se enjuagó con agua corriente y secó, luego 20 pases en alcohol al 96°, se secó y se tiñeron 1 min con eosina-Golden, se metieron en alcohol al 96° 20 pases, luego 20 pases en alcohol absoluto, se secó y paso a xilol 5 min, posteriormente se realizó el montaje con resina diluida en xilol para posteriormente realizar la lectura microscópica.

7.5.9 Actividad biológica de los extractos en la inducción de CYP450

Ensayo de CYP3A4

El ensayo de inducción de CYP3A4 por método cinético enzimático con kit comercial VIVID® CYP450 RED [CAT. N° P2856] (Marks 2002, 2004; Marks et al. 2003). La finalidad del ensayo consistió en exponer los extractos de las plantas en estudio en presencia de Baculosomas Plus Reagent para identificar la inducción

o inhibición de los CYP50, utilizando un estándar VIVID-RED Fluorescente, de concentración 0.1 μmol , Ketoconazol 10 μM (como inhibidor positivo) Sigma Aldrich (Cat. N° UC280), Rifampicina 10 μM (Patente Rifadin, como inductor) y buffer 2X diluido con agua grado HPLC como blanco de reactivo. Los reactivos Vivid CYP450 de buffer de reacción-I (Cat. N° p2881) se almacenaron a temperatura ambiente, CYP3A4 Baculosoma Plus Reagent (Cat. N° P2377) a -80°C, Vivid substrato BOMR (Cat. N° P2865) y Vivid Red Fluorescente estándar a -20°C y con protección de la luz hasta el momento de su utilización. El substrato fue reconstituido con 150 μL de acetonitrilo anhidro y a atemperado a 50°C para su uso; la reconstitución del Estándar Fluorescente fue de 500 μL DMSO + 500 μL de H₂O grado HPLC, para ajustar a una concentración final de 100 μM ; el buffer de reacción Vivid® CYP450 se diluyó en H₂O grado HPLC y se conservó a 18- 25°C y posteriormente con este mismo se prepararon los estándares, inhibidores, inductores, solución de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP⁺), y los extractos de las plantas en estudio en concentraciones de 1500, 750, y 375 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por triplicado cada dilución de cada planta respectivamente.

Para la curva de calibración se consideraron siete puntos por triplicado, más el blanco de reactivo partiendo de una concentración de (500 μM). El volumen final en cada pocillo de reacción fue de 200 μL ; para las muestras de las plantas, Ketoconazol y rifampicina se añadieron 100 μL de la concentración preestablecida y 100 μL de Buffer de reacción y en el blanco 200 μL de buffer. Se añadió 50 μL de Baculosomas de concentración 5nM a cada pocillo, se incubó la placa 10 min a temperatura de 18-25°C, para permitir que los componentes interactuaran en ausencia de la enzima y se realizó una pre-lectura. Se preparó el sustrato Vivid-NADP⁺ y se dispensó en cada pocillo 10 μL y se leyó inmediatamente en lector de ELISA (WHY 101) a 520nm.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Colecta e identificación del material vegetal en estudio

En la colecta de las plantas en estudio seis especies fueron silvestres: *T. recurvata*, *G. oxyphyllum*, *E. heterophyllum*, *S. angustifolia*, *P. glandulosa* y *L. mexicana*, y tres de parcela agrícola: *T. stans*, *C. ternifolia*, y *C. equisetifolia*. Y se identificaron en la UAAAN Unidad Torreón, con el N° CRB- Agroecología 002/012. En la Tabla 5 se mencionan los nombres común y científico de las plantas utilizadas en este trabajo.

Tabla 5. Nombre científico y común de las plantas en estudio

Nombre científico	Nombre comun
<i>Sphaeralcea angustifolia</i> (Cav.) G. Don.	Hierba del negro (cordón)
<i>Prosopis glandulosa</i> Torr.	Mezquite local
<i>Tecoma stans</i> (L.) Juss.	Lágrima de San Pedro
<i>Tillandsia recurvata</i> L.	Heno
<i>Loeselia mexicana</i> (Lam.) Brandege	Huachichile
<i>Gnaphalium oxyphyllum</i> DC.	Gordolobo
<i>Eryngium heterophyllum</i> Engelman	Hierba del sapo
<i>Casuarina equisetifolia</i> (L.)	Pinabete
<i>Calea ternifolia</i> (Kunth.)	Prodigiosa (hierba amarga)

El proyecto recibió el registro: CEI-PROMEP/103.5/11/5575P/CA 180. UANL-FCB.

8.2. Obtención de extractos de las plantas en estudio

Las plantas utilizadas en este estudio son empleadas por los habitantes de la Comarca Lagunera como parte de la farmacognosia cultural en forma de infusiones o cataplasma (González et al. 2002). Los rendimientos de los extractos acuosos y

metanólicos de las plantas en estudio se muestran en la Tabla 6. En estudios previos se ha encontrado que la familia Asterácea tiene un rendimiento del 8-10% al extraer látex de su raíz (Vito y Petenatti 2009) y de partes aéreas (Cabrera y Hiran 2012) como es el caso de *Phania matricarioides* (manzanilla) en extracto acuoso con un 16%, y en el presente estudio *Calea ternifolia* siendo de la misma familia presentó un 17% de rendimiento, siendo el más alto.

Tabla 6. Rendimiento de los extractos acuosos y metanólicos de las plantas en estudio.

Planta	% p/p de los extractos	
	Acuoso	Metanólico
1) <i>Gnaphalium oxyphyllum</i>	3.78	6.05
2) <i>Tillandsia recurvata</i>	3.61	5.56
3) <i>Loeselia mexicana</i>	7.00	7.05
4) <i>Prosopis glandulosa</i>	11.39	13.81
5) <i>Sphaeralcea angustifolia</i>	1.20	10.32
6) <i>Tecoma stans</i>	16.90	9.33
7) <i>Cassuarina equisetifolia</i>	10.06	13.52
8) <i>Calea ternifolia</i>	17.00	12.36
9) <i>Eryngium heterophyllum</i>	8.79	5.58

8.3 Identificación parcial de los componentes de los extractos

En nuestro estudio las pruebas fitoquímicas dieron resultados positivos para taninos, flavonoides, carbohidratos, dobles enlaces, grupo carbonilo, triterpenos, cumarinas, alcaloides, saponinas y sesquiterpenlactonas, además las plantas pueden presentar otras toxinas vegetales como glucósidos, inhibidores de colinesterasa, aminos vasoactivos, latirógenos, sustancias fenólicas, alcoholes, fitoestrógenos, inhibidores

de proteasas, antiminerales, antivitaminas, como lo indica Ruiz (2012). Los extractos obtenidos, se sometieron a pruebas químicas, encontrando que los extractos acuosos con mayor número de grupos funcionales fueron: *L. mexicana*, *P. glandulosa*, *C. ternifolia* y *E. heterophyllum* y en los extractos metanólicos fueron: *G. oxyphyllum*, *C. ternifolia*, *T. stans*, *P. glandulosa* y *T. recurvata* como se muestra en la Tabla 7 y Tabla 8.

Tabla 7. Pruebas químicas realizadas a los extractos acuosos de las plantas en estudio.

	<i>L.mexicana</i>	<i>P. glandulosa</i>	<i>C. ternifolia</i>	<i>E. heterophyllum</i>
Taninos	-	-	+	-
Flavonoides	+	+	-	+
Carbohidratos	+	+	+	+
Dobles enlaces	-	-	-	-
Grupo carbonilo	-	-	-	+
Esteroles	-	-	-	-
Triterpenos	+	-	-	-
Cumarinas	+	+	+	+
Alcaloides	+	+	-	-
Saponinas	+	+	+	+
Sesquiterpen- lactonas	-	-	+	+

Presencia de grupo o compuesto (+). Ausencia de grupo o compuesto (-)

Tabla 8. Pruebas químicas realizadas a los extractos metanólicos de las plantas en estudio.

	<i>G.oxyphyllum</i>	<i>T. recurvata</i>	<i>P.glandulosa</i>	<i>T. stans</i>	<i>C. equisetifolia</i>
Taninos	+	+	-	+	+
Flavonoides	+	-	+	-	+
Carbohidratos	+	-	+	+	+
Dobles enlaces	+	+	-	-	+
Grupo carbonilo	-	+	-	+	-
Esteroles	-	-	-	-	-
Triterpenos	+	-	-	+	-
Cumarinas	+	+	+	+	+
Alcaloides	-	-	+	-	-
Saponinas	+	-	-	-	+
Sesquiterpen- lactonas	+	+	+	+	+

Presencia de grupo o compuesto (+). Ausencia de grupo o compuesto (-).

En *G. oxyphyllum* estudios previos han reportado diterpenos (Meragelman et al. 2003), flavonoides, compuestos acetilados y carotenos (Villagómez-Ibarra et al. 2001), en el presente estudio en el extracto acuoso se encontraron carbohidratos, cumarinas, saponinas y sesquiterpenlactonas. En el caso de *T. recurvata* se ha reportado la presencia de alcaloides y taninos (Espinoza 2003) en nuestro caso no se identificaron fitocomponentes en el extracto acuoso. En *L. mexicana* se han reportado flavonoides como la quercitina (Smith et al. 1977), la cual es posible que confiera protección a los eritrocitos humanos (Zbikowska et al. 2014), triterpenos (Jiménez et al. 1989) y cumarinas (Navarro et al. 2007) y en el presente estudio se encontró flavonoides, carbohidratos, triterpenos, cumarinas y alcaloides. En *P. glandulosa* se han encontrado carbohidratos, proteínas, aflatoxinas y ochratoxina A (Choge et al. 2007), en el presente estudio también se encontraron carbohidratos, flavonoides, cumarinas, alcaloides y saponinas. (Zamora-NF et al. 2008), también se han encontrado en semillas de la familia *Fabaceae* alcaloides. En *T. stans* se han encontrado alcaloides, cumarinas, flavonoides, sesquiterpenlactonas, esteroides, multiesteroides, saponinas, azúcares, quinonas, e insaturaciones (Ibarra et al. 2009), en la presente investigación se detectaron cumarinas y saponinas. En el caso de *C. ternifolia* se le han aislado compuestos como flavonas (Martínez et al. 1987) y sesquiterpenlactonas (Lee et al. 1982), en este estudio se encontraron taninos, carbohidratos, cumarinas saponinas y sesquiterpenlactonas. Y para *E. heterophyllum*, en el estudio fitoquímico mostró la presencia de flavonoides, carbohidratos, grupos carbonilo, cumarinas, saponinas y sesquiterpenlactonas, en estudios previos se le han encontrado: aceites esenciales acetilados, cumarinas, saponinas, flavonoides y derivados del ácido rosmarínico (Marroquín-Segura et al. 2013; Pietta 2000).

8.4 Cromatograma de los extractos de las plantas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Los componentes identificados en las plantas de uso en medicina tradicional en la región tienen compuestos fenólicos como muestran los tiempos de retención de los

estándares utilizados y los cromatogramas de los extractos de las plantas en estudio en análisis por HPLC de acuerdo al método utilizado (Del Caro y Piga2008). Solo se muestran los cromatogramas de las plantas que presentaron mayor toxicidad o citotoxicidad.

En la Tabla 9 se muestran los datos obtenidos en los cromatogramas de las plantas en estudio y los estándares de referencia del: ácido clorogénico, ácido gálico, rutina, quercetina, epicatequina, ácido siríngico y catequina. Se muestran los tiempos de retención (min) la altura del pico (mAU) y el área del pico (%), DAD, Sig= 280. Para *E. heterophyllum* no se presentaron tiempos de retención similares a los estándares utilizados.

Tabla 9. Datos obtenidos de los cromatogramas de las plantas en estudio y los estándares de referencia por HPLC.

Planta o estándar	Tiempo de retención (min)	Altura(mAU)†	Área (%)
<i>G. oxyphyllum</i>	12.315	170.79034	5.8019
	33.435	312.15176	8.5775
	36.266	80.04171	2.7834
	52.572	30.46993	1.5179
	55.614	376.76300	7.3752
<i>L. mexicana</i>	17.631	8.62556	3.1619
	52.437	35.05265	34.2319
	54.216	18.00462	18.2952
	55.808	9.92788	12.4810
<i>T. recurvata</i>	17.254	1.36402	1.6117
	33.498	3.76931	4.7383
	37.657	6.94531	12.8087
<i>C. equisetifolia</i>	17.645	3.93459	4.9175
	33.655	2.91672	7.1478
	42.102	22.62092	64.1881
<i>C. ternifolia</i>	34.661	46.81346	16.4344
	42.277	12.62434	3.9257
	53.297	42.22793	5.7286
	56.880	172.52284	30.8306
<i>P. glandulosa</i>	53.447	2.75334	10.8808
	56.972	3.96386	13.2239
<i>S. angustifolia</i>	2.598	6.10945	17.5677

	5.013	12.82531	41.9564
	17.837	5.00209	3.8973
	6.570	25.16522	11.4406
	48.048	11.44309	22.4872
<i>T. stans</i>	53.676	9.38178	18.1373
	55.606	11.72399	25.8470
	61.469	16.24419	32.1157
<i>E. heterophyllum</i>	35.393	15.76963	19.6608
	61.390	57.44682	45.3663
Catequina	2.162	197.35651	98.8124
Epicatequina	34.661	46.81346	16.4344
Rutina	52.515	1830.73480	96.9008
	56.652	33.74489	1.4891
Quercetina	53.409	3.96	0.4802
Ácido clorogénico	33.882	1610.18945	99.1247
Ácido gálico	17.662	668.90607	43.6375
	18.132	1622.90588	55.9797
Ácido siríngico	37.322	3141.47656	99.5139

†mUA (mil unidades de absorbancia en luz ultravioleta a 280nm)

En los cromatogramas de los extractos de las plantas en estudio se encontró similitud en los tiempos de retención de los estándares utilizados.

Las figuras 3-18 corresponden a: *G. oxyphyllum*, con un tiempo de retención de 33.435, 52.572 y 55.614; *L. mexicana* 17.631, 52.437 y 54.216; *T. recurvata* 33.498; *E. heterophyllum* 35.393 y 61.390; *C. ternifolia* 34.661; *P. glandulosa* 53.447 y 56.972; *S. angustifolia* 2.598 y 5.013; *T. stans* 55.606 y 61.469; *C. equisetifolia* 17.645; y los estándares de: ácido gálico con 17.662, ácido clorogénico 33.882, rutina 52.515, catequina 2.162, epicatequina 34.661, quercetina 53.409 y ácido siríngico con 37.322 min respectivamente. Se encontró en las plantas en estudio tiempos de retención similares a los estándares de los siguientes compuestos: *G. oxyphyllum* con rutina y ácido clorogénico, *L. mexicana* con ácido gálico y rutina, *T. recurvata* con ácido siríngico y ácido gálico, *C. ternifolia* con quercetina, rutina y epicatequina, *P. glandulosa* con quercetina y rutina, *C. equisetifolia* con ácido gálico y quercetina, *S. angustifolia* con catequina y ácido gálico y *Tecoma stans* con quercetina. Solo en *Eryngium heterophyllum* no se encontró cromatograma con similitud a los estándares utilizados.

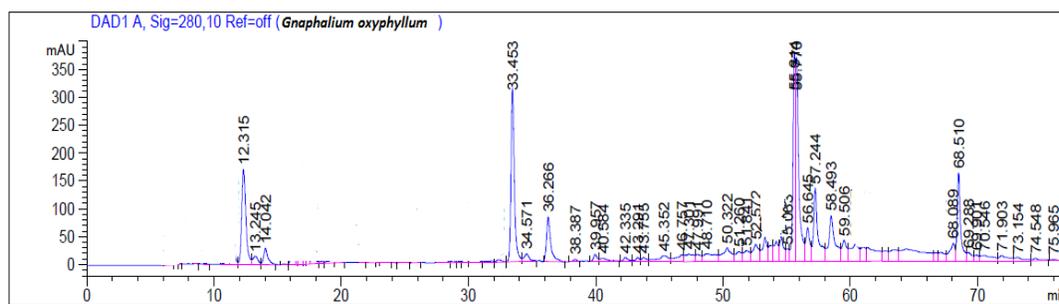


Figura 3. Cromatograma del extracto de *G. oxyphyllum* a una concentración de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, en una proporción 70:30 (metanol:agua grado HPLC).

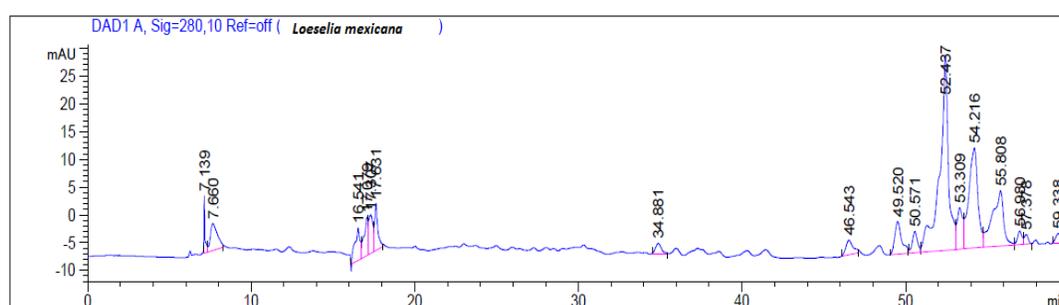


Figura 4. Cromatograma del extracto de *L. mexicana* a una concentración de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, en una proporción 70:30 (metanol:agua grado HPLC).

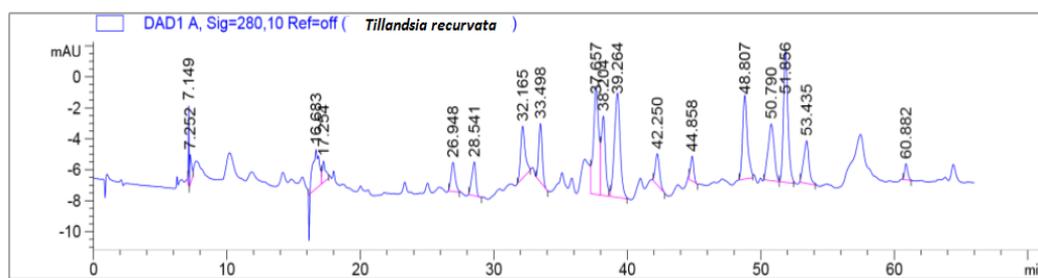


Figura 5. Cromatograma del extracto de *T. recurvata* a una concentración de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, en una proporción 70:30 (metanol:agua grado HPLC).

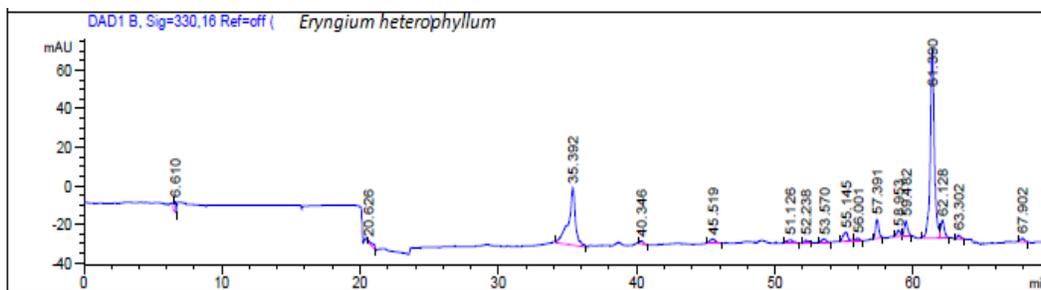


Figura 6. Cromatograma del extracto de *E. heterophyllum* a una concentración de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, en una proporción 70:30 (metanol:agua grado HPLC).

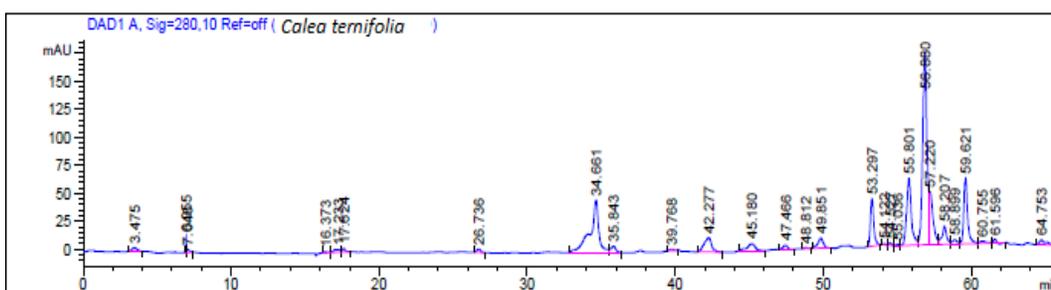


Figura 7. Cromatograma del extracto de *C. ternifolia* en una concentración de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, en una proporción 70:30 (metanol:agua grado HPLC).

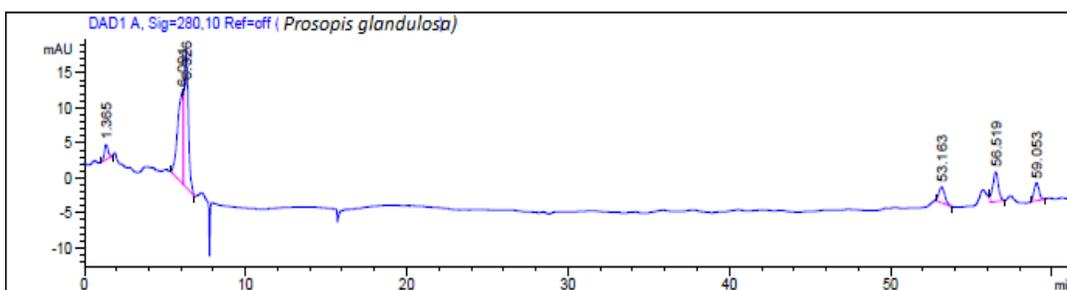


Figura 8. Cromatograma del extracto de *P. glandulosa* a una concentración de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, en una proporción 70:30 (metanol:agua grado HPLC).

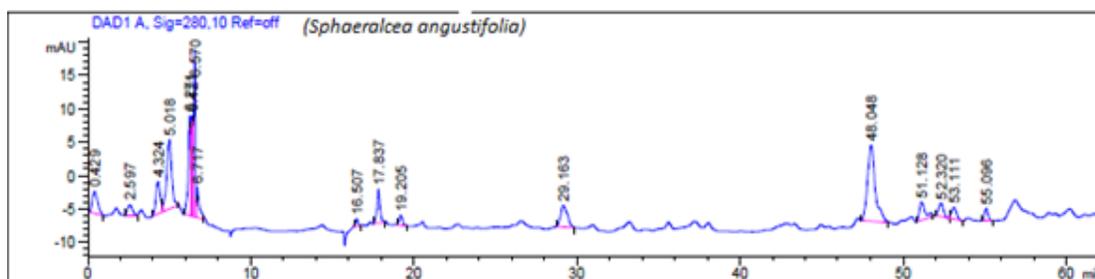


Figura 9. Cromatograma del extracto de *S. angustifolia* a una concentración de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, en una proporción 70:30(metanol:agua grado HPLC).

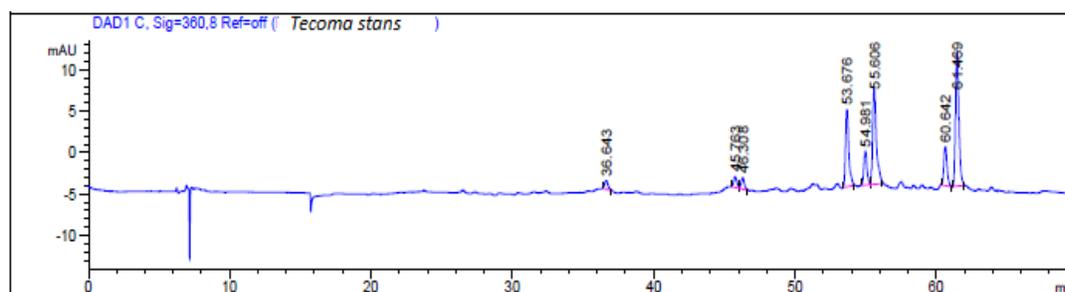


Figura 10. Cromatograma del extracto de *T. stans* a una concentración de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, en una proporción 70:30(metanol:agua grado HPLC).

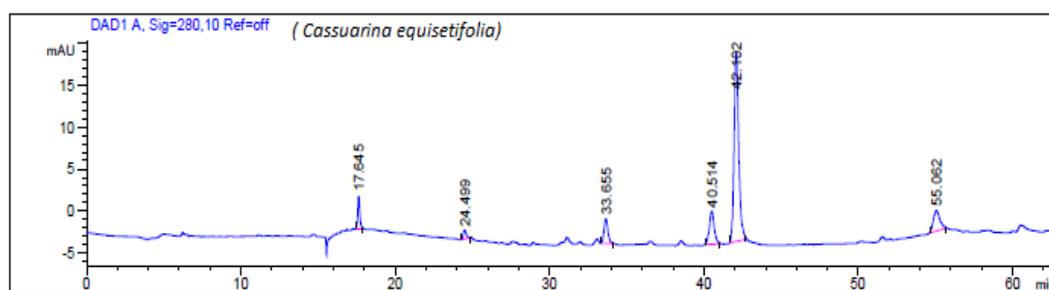


Figura 11. Cromatograma del extracto de *C. equisetifolia* a una concentración de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, en una proporción 70:30 (metanol:agua grado HPLC).

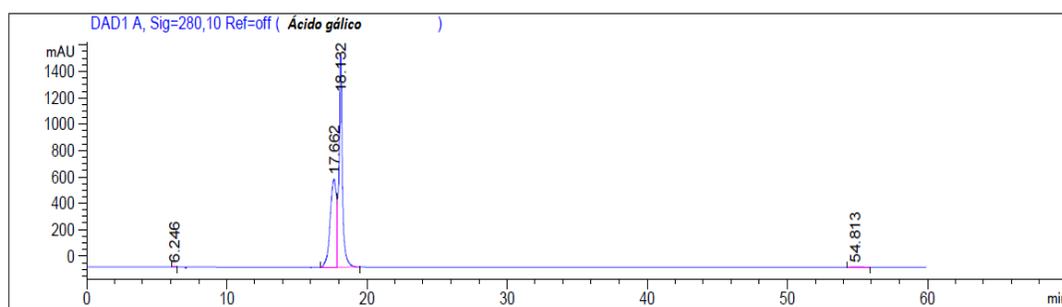


Figura 12. Cromatograma del estándar de ácido gálico a una concentración de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, en una proporción 70:30 (metanol:agua grado HPLC).

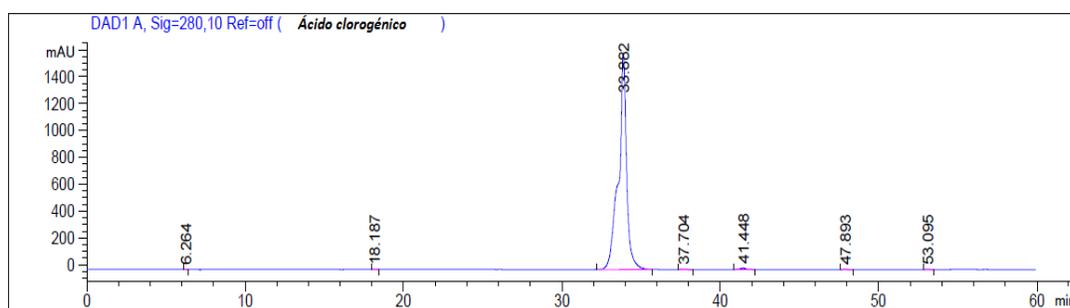


Figura 13. Cromatograma del estándar de ácido clorogénico a una concentración de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, en una proporción 70:30 (metanol:agua grado HPLC).

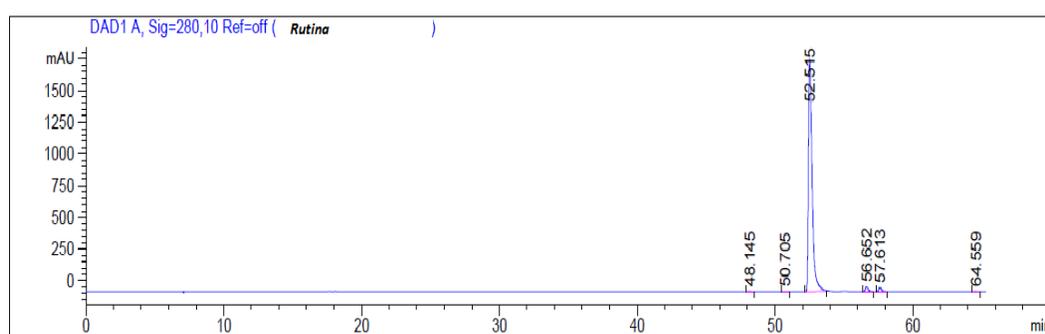


Figura 14. Cromatograma del estándar de rutina en una concentración de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, en una proporción 70:30 (metanol:agua grado HPLC).

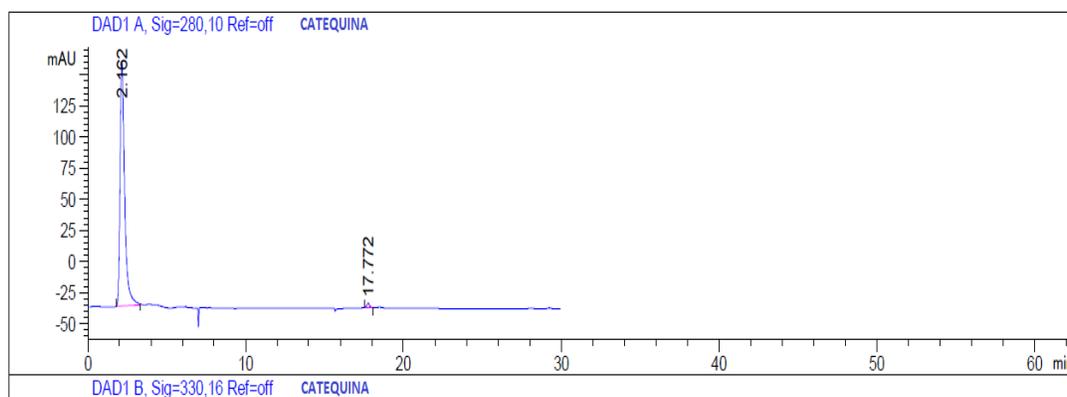


Figura 15. Cromatograma del estándar de catequina a una concentración de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, en una proporción 70:30(metanol:agua grado HPLC).

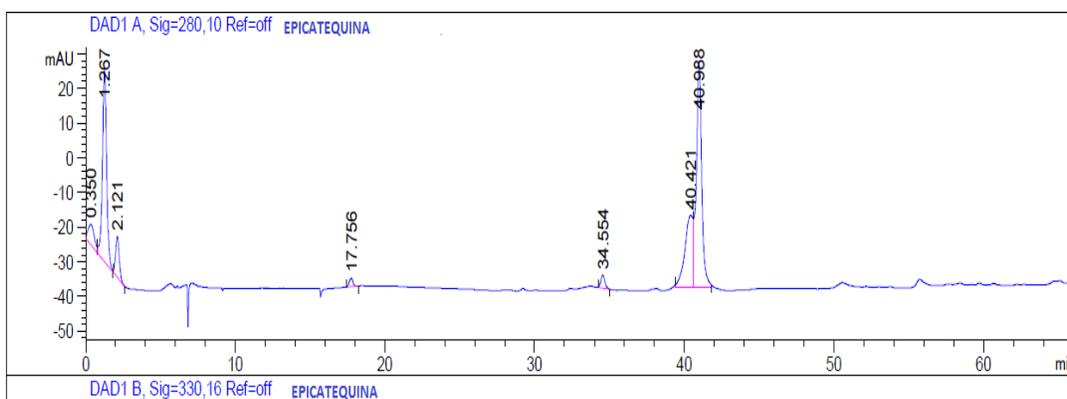


Figura 16. Cromatograma del estándar de epicatequina a una concentración de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, en una proporción 70:30 (metanol:agua grado HPLC).

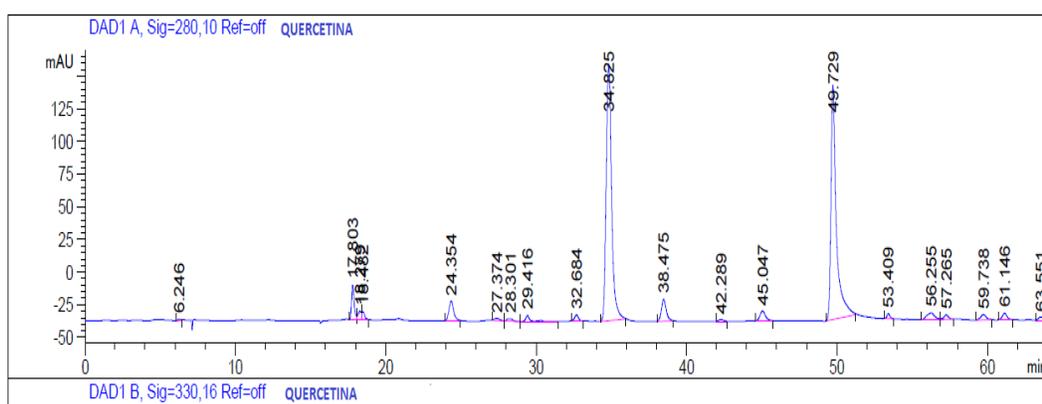


Figura 17. Cromatograma del estándar de quercitina a una concentración de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, en una proporción 70:30 (metanol:agua grado HPLC).

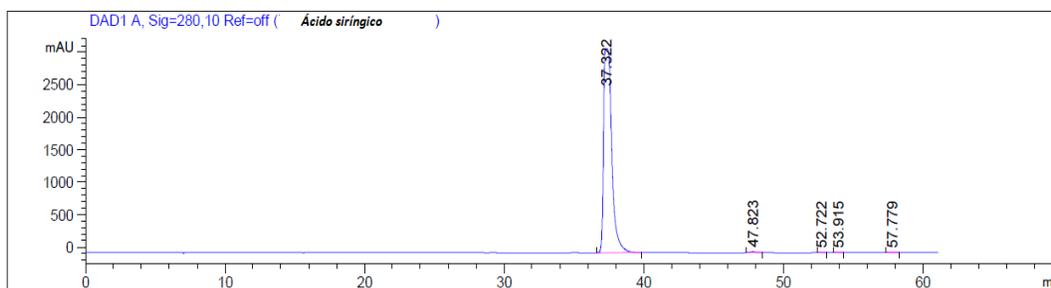


Figura 18. Cromatograma del estándar de ácido siríngico a una concentración de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, en una proporción 70:30 (metanol:agua grado HPLC).

En *G. oxyphyllum* y *L. mexicana* se identificó rutina, esta se sintetiza a partir de la quercetina y ambas son consideradas de baja toxicidad, la rutina es un flavonoide y se ha reportado que estos reducen los radicales libres y quelan metales, impidiendo reacciones catalizadoras a nivel celular (Thompson et al. 1976). El ácido clorogénico está considerado como "posiblemente carcinógeno para los humanos" (Peppercorn y Goldman, 1972; Gonthier et al. 2003), en este trabajo se observó toxicidad considerable sobre *A. salina*. (Moon et al. 2006), mencionan que es importante la acción enzimática de los flavonoides, su concentración en la ingesta y su viabilidad oral puede ser baja a diferencia de los estudios que se realizan *in vitro*, por lo que es difícil dar seguimiento a los preparados herbales ingeridos y el incremento de su concentración en plasma sanguíneo ya que puede haber variación entre individuos, factores genéticos y ambientales, metabolismo enzimático y padecimiento u enfermedad de un individuo así como la interacción que estos pudieran tener con otros fármacos utilizados. Wei-Min Zhang y Wu-Yang Huang en (2014), señalan la importancia de compuestos polifenólicos como el ácido siríngico, epicatequina y ácido gálico por su gran relevancia en los alimentos que los contienen y que les confieren gran capacidad antioxidante. En el presente estudio estos componentes se detectaron en las plantas estudiadas mostrando así que la mayoría de los estudios consideran la parte benéfica de los metabolitos secundarios de las plantas y existen escasos reportes como el presente que buscan los efectos tóxicos de estas.

8.5 Actividad biológica y citotoxicidad de los extractos en eritrocitos por citometría de flujo (FACS)

Para la prueba de Eriptosis en eritrocitos de donador sano se realizó la curva de ensayo utilizando rifampicina ampliamente utilizada en el tratamiento de la tuberculosis y cuyos efectos son anemia hemolítica como resultado de la estimulación de eriptosis. Estudios previos que han utilizado este fármaco en concentración mayor o igual a $24 \mu\text{g mL}^{-1}$, al exponer a los eritrocitos por 48 h, han encontrado la evidencia de eriptosis al marcar los eritrocitos utilizando Annexina-V-FITC e interpretando por FACS (Abed et al. 2012; Adem et al. 2014).

Previamente a la realización del ensayo se corrió la curva de estandarización, figura. 19, dónde se muestra la eriptosis producida por el efecto de la rifampicina a diferentes concentraciones, control positivo y negativo sobre eritrocitos humanos de donador sano.

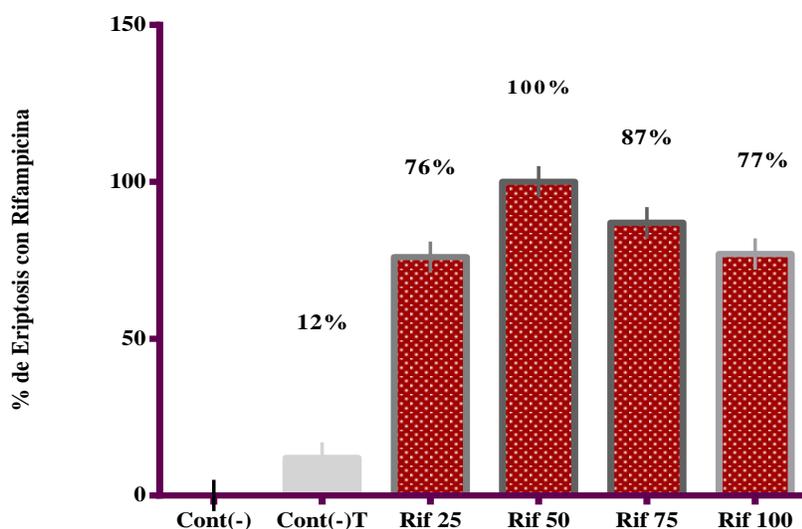


Figura 19. Curva de Rifampicina en eritrocitos (E) vs control. Control negativo sin teñir[Cont (-)], control negativo teñido [Cont(-)T], Rifampicina (Rif) de 25,50,75,100 mg mL^{-1} respectivamente. Los (E) de donador sano y expuestos 24hrs, 37°C , sol. Hank's; 1×10^6 (E)/mL, teñidos con Annexina V-FITC, y analizados en FACS. Como resultado del efecto de la exposición se observa eriptosis (%), en Rif 25(76%); Rif 50(100%); y en Rif 75(87%) y Rif 100 (77%) los eritrocitos presentan alteraciones morfológicas y lisis celular.

La eriptosis es la muerte suicida del eritrocito caracterizada por el encogimiento y la ruptura de la célula que causa una exposición y asimetría de la fosfatidilserina en la superficie de la membrana del eritrocito que incrementa la actividad del Ca^{2+} en el citosol. Esta actividad puede ser analizada mediante el análisis de FACS considerando que al quedar expuesta en la membrana la fosfatidil serina, es posible estimarla mediante una unión fluorescente utilizando Annexina V-FITC (Jilani y Lang 2013). En estudios previos en los que se han utilizado compuestos fenólicos y polifenólicos, muestran que estos compuestos en concentraciones de hasta $15 \mu\text{M}$ en un periodo de exposición de 48 h incrementan el Ca^{2+} en el citosol y la consecuente deformación de la membrana del eritrocito que expone a la fosfatidil serina la cual puede ser detectada por la presencia de Annexina V-FITC y la presencia de eriptosis (Zbidah et al. 2013). Existen otros componentes de origen vegetal que también pueden ocasionar eriptosis (Jilani y Lang 2013), también el uso de medicamentos como los utilizados para la enfermedad obstructiva pulmonar (Bromuro de Ipratropium, y Sulfato de Albuterol) ocasionan eriptosis (Shaik et al. 2012). Aunque hay componentes naturales de las plantas que les confieren propiedades farmacológicas para una sola planta que van desde antimicrobiana, antiparasitaria, anti-inflamatoria, anticancerígena, cardiotónica, inmunosupresora, acción anti-infertilidad, neuroprotectiva, anti-ateroesclerótica, como el Plumbagin (5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone, 1), sin embargo este componente orgánico propicia la inducción de eriptosis y /ó apoptosis por despolarización de mitocondrias al inhibir a la familia de proteínas Bcl-2 que regulan los procesos de permeabilización mitocondrial constituyendo así un bloqueo para la muerte en las células nucleadas y anucleadas (como el eritrocito) que evitan la contracción citoplasmática, condensación nuclear y desorganización de la membrana plasmática (Lupescuet al. 2012). Además, se ha explorado si los flavonoides en la dieta provenientes de cítricos (como la naringina) con propiedades antiapoptóticas y antioxidantes en células nucleadas y anucleadas interfieren con la eriptosis y han concluido que los flavonoides incrementan el Ca^{2+} en el citosol y con ello la modificación de la membrana del eritrocito por el agotamiento de energía y el subsecuente proceso de eriptosis (Shaik et al. 2012).

En el presente estudio se encontró que las plantas estudiadas poseen compuestos fenólicos y la exposición de los eritrocitos a los extractos causó la inducción de eriptosis. Para *G. oxyphyllum*, *T. recurvata*, y *C. equisetifolia* en la concentración de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ presentaron un % de eriptosis similar al control (+) de rifampicina, en *L. mexicana*, *P. glandulosa*, *S. angustifolia* y *C. ternifolia* la eriptosis se presentó en la concentración de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ y en *T. stans* y *E. heterophyllum* en $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente (Tabla 10).

Tabla 10. Eriptosis de los extractos acuosos a diferente concentración de las plantas en estudio sobre eritrocitos humanos de donador sano.

Planta	Extracto acuoso ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Eriptosis (%)
<i>G. oxyphyllum</i>	10	74
<i>T. recurvata</i>	10	78
<i>C. equisetifolia</i>	10	72
<i>L. mexicana</i>	100	82
<i>P. glandulosa</i>	100	70
<i>S. angustifolia</i>	100	99
<i>C. ternifolia</i>	100	73
<i>T. stans</i>	1000	100
<i>E. heterophyllum</i>	1000	71
Control negativo (1×10^6 eritrocitos mL^{-1})	0	12
Control positivo 25mg mL^{-1} de Rifampicina)	0	76

8.6 Volumen corpuscular medio (VCM)

Los eritrocitos humanos en presencia de componentes polifenólicos han mostrado una mínima actividad hemolítica (Gangwar et al. 2014; Mawatari y Murakami 2001) y en el presente estudio los extractos de las plantas y la modificación del VCM, en los eritrocitos por la exposición a componentes naturales y/o como los compuestos fenólicos se vieron incrementados con valores ($>$ a 97 fL) y se muestra en la Figura 20 y Figura 21.

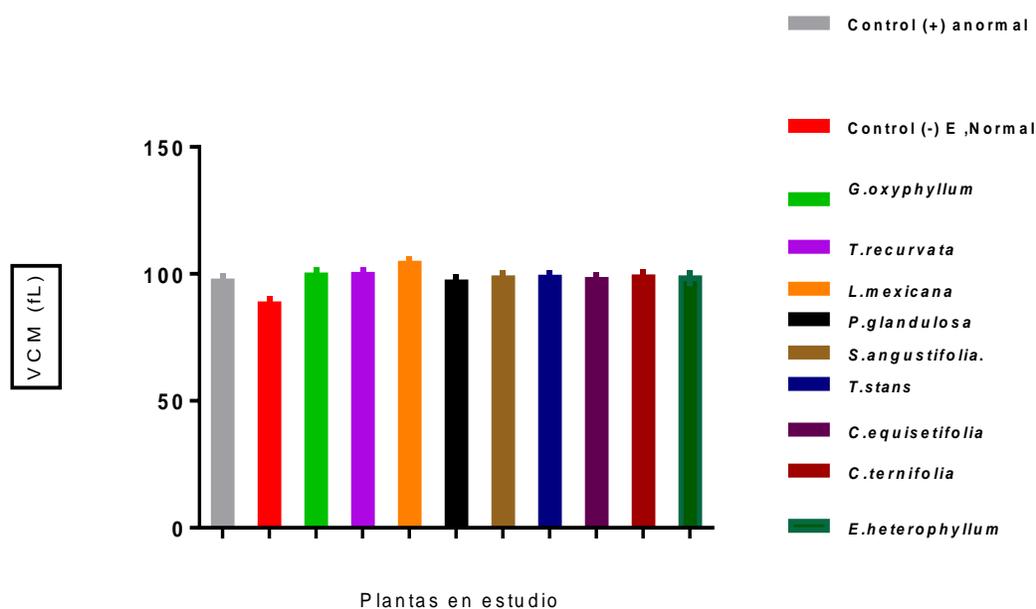


Figura 20. Volumen corpuscular Medio (VCM) en los eritrocitos después de la exposición a los extractos acuosos de las plantas en estudio ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$). Control (+) y Control (-).

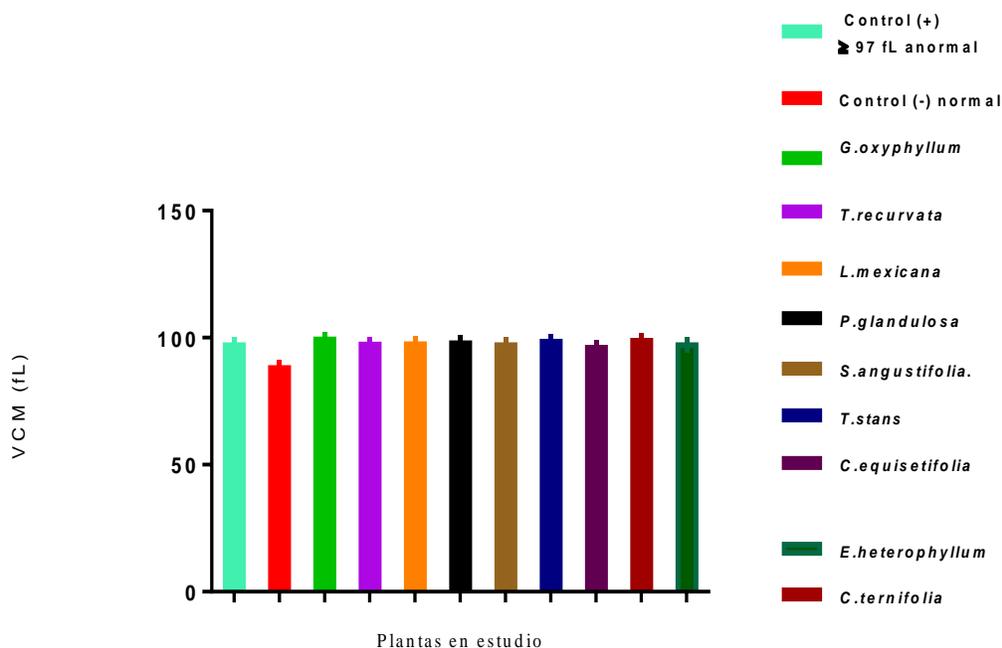


Figura 21. Volumen Corpuscular Medio (VCM) en los eritrocitos después de la exposición a los extractos metanólicos de las plantas en estudio ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$). Control (+) y Control (-).

En ambas figuras se observan valores cercanos al control (+) anormal y aunque son escasos los estudios en los que se ha medido el VCM, de eritrocitos expuestos *in vitro* a componentes naturales, hay evidencia de otros investigadores que han trabajado para conocer el efecto de los compuestos fenólicos *in vitro* sobre el efecto de inhibir a glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGD) y dentro de sus hallazgos se encontró que algunos componentes fenólicos inhiben a ambas enzimas, sin embargo se ha mostrado que el ácido clorogénico y ácido sirínico no inhibieron a las enzimas mencionadas (Adem et al. 2014). En el presente estudio es de importancia mencionar que se encontró la presencia de estos componentes fenólicos en las plantas estudiadas.

8.7 Ácido tiobarbitúrico / malondialdehído (TBARS/MDA)

La evaluación de peroxidación lipídica por la medición de sustancias reactivas de ácido tiobarbitúrico así como la actividad de las enzimas catalasa y superóxido dismutasa como mecanismo de daño celular en eritrocitos ha sido investigada en eritrocitos de rata sometidas a intoxicación con fluoruro de sodio, lo que causa un incremento en la peroxidación lipídica y una disminución en la actividad de las enzimas, sin embargo estos estudios *in vivo* han demostrado que compuestos fenólicos como el ácido gálico y la vitamina C, confieren un estado de protección que evita la peroxidación y la disminución de la actividad enzimática (Mawatari y Murakami 2015; Nabavi et al. 2013). En peroxidación lipídica sobre los eritrocitos estudiados se encontró que para TBARS/MDA, los valores están por encima de lo establecido como normal (18.6-39.4 μ M) y los resultados se muestran en la Tabla 11 y Figura 22, Figura 23.

Tabla 11. Diseño de trabajo en el estándar colorimétrico de MDA.

Tubo	MDA (μ L)	Agua (μ L)	MDA (μ M)
A	0	1,000	0
B	5	995	0.625
C	10	990	1.25
D	20	980	2.5
E	40	960	5
F	80	920	10
G	200	800	25
H	400	600	50

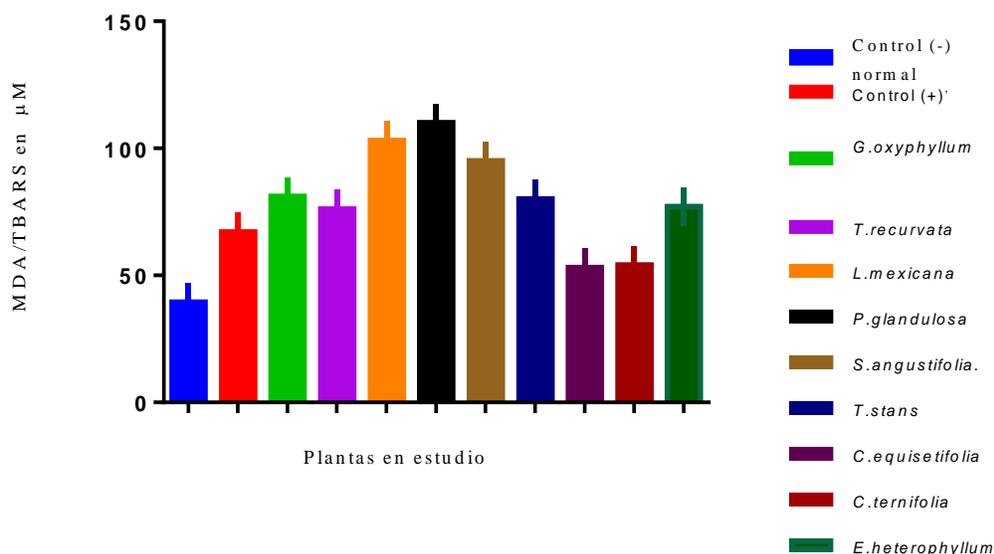


Figura 22. Cuantificación de Malondialdehído ácido tiobarbitúrico (MDA/TBARS) en eritrocitos (E) (2×10^7) lisados. Después de la exposición al extracto metanólico ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) de las plantas en estudio. Control (+) E, expuestos a lipoperoxidación y Control (-) E, no expuestos a lipoperoxidación y un V.N., referido para el ensayo de MDA/TBARS de 18.6 a $39.4 \mu\text{M}$.

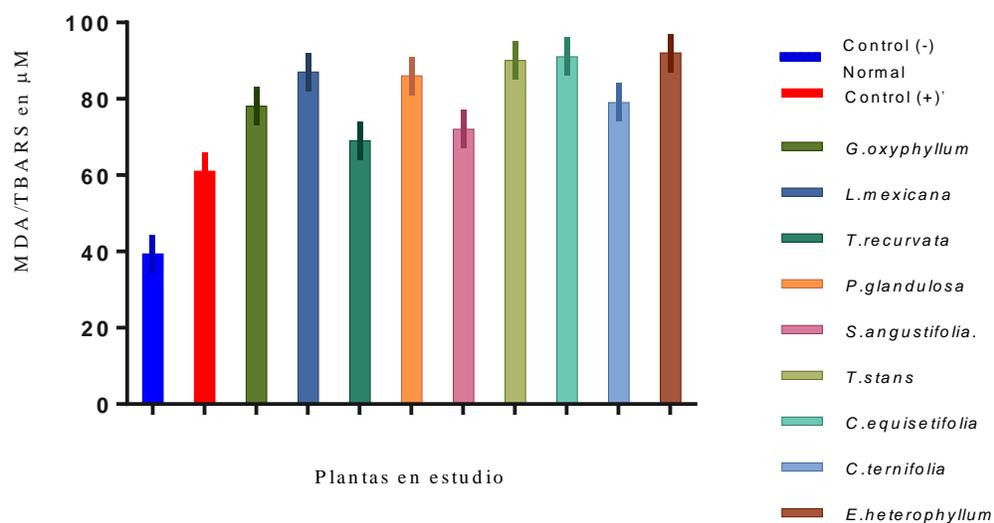


Figura 23. Cuantificación de Malondialdehído ácido tiobarbitúrico (MDA/TBARS) en eritrocitos (E) (2×10^7) lisados. Después de la exposición en extracto acuoso de ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) de las plantas en

estudio. Utilizando Control (+) E, expuestos a lipoperoxidación y Control (-) E, no expuestos a lipoperoxidación y un V.N., referido para el ensayo de MDA/TBARS de 18.6 a 39.4 μM .

En otro estudio se ha analizado la membrana de los eritrocitos humanos expuestos a radiación en presencia de quercetina, encontrando que la concentración de TBARS se incrementa, siendo mayor en los glóbulos rojos irradiados en presencia de quercetina (2-50 μM), además de encontrarse la presencia de hemólisis (Zbikowska et al. 2014). También en este estudio se observa un valor aumentados de TBARS/MDA superiores al valor normal de (VN =18.6 -39.4 μM).

8.8 Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2)

Para la determinación de H_2O_2 ambos extractos (acuoso y metanólico) de las plantas estudiadas presentaron valores superiores a 14.7 μM . Los valores normales para esta molécula se han considerado que una concentración mayor o igual a 50 μM , es citotóxica, para animales, plantas y bacterias. Sin embargo, en sangre humana es de ~ 35 μM (Varma y Devamanoharan 1991; Deskur et al. 1998), aunque otros autores indican que es cercano a cero (Frei et al. 1988).

A continuación, se muestran los resultados obtenidos en la determinación de H_2O_2 , en el extracto metanólico. Se observó una media de 3.9 μM (Figura 24) y en el extracto acuoso una media de 14.7 μM (Figura 25) estos comparados con el control (sin exposición a extractos) de 4.0 μM .

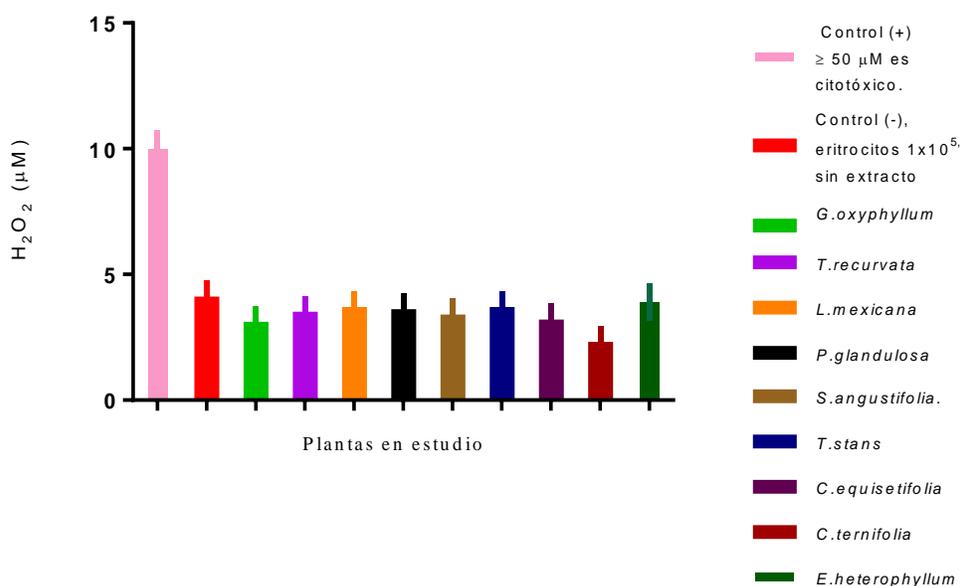


Figura 24. Cuantificación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en eritrocitos después de la exposición de 500 µg mL⁻¹ de los extractos metanólicos de las plantas en estudio. Control (+) y Control (-).

La producción de peróxido de hidrogeno (H₂O₂) por los eritrocitos después de la exposición a 500 µg mL⁻¹ de los extractos metanólicos fue de 5 µM menor o igual que el control negativo.

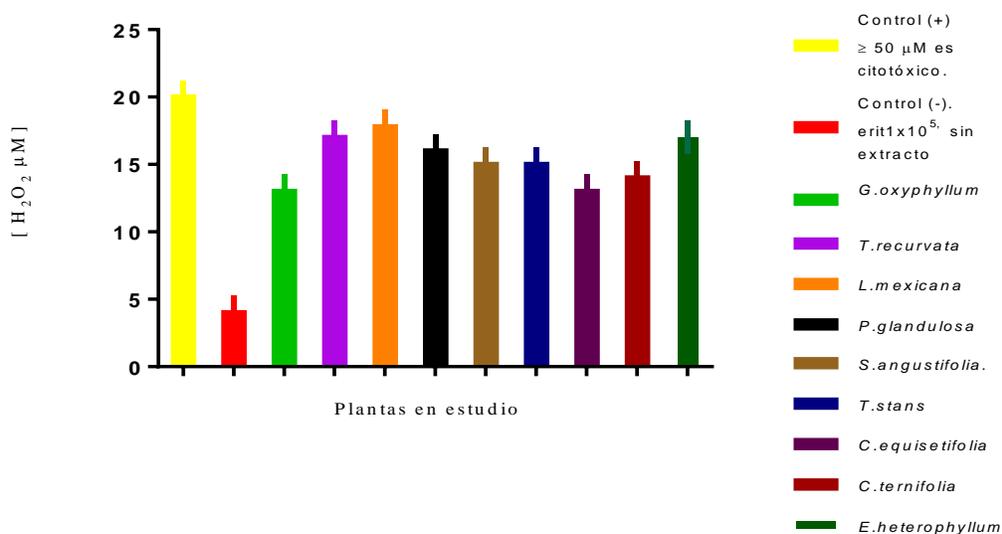


Figura 25. Cuantificación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en eritrocitos después de la exposición de 500 µg mL⁻¹ de los extractos acuosos de las plantas en estudio. Control (+) y Control (-).

Otros estudios indican que los compuestos derivados de las plantas tienen actividad protectora contra la actividad de H_2O_2 , que es citotóxica y sin embargo se considera que algunos extractos vegetales también tienen dicha actividad (Söhretoğlu et al. 2012).

También se han realizado estudios con compuestos fenólicos para conocer la capacidad de evitar hemólisis en eritrocitos humanos aprovechando la propiedad antioxidante de estos componentes fitoquímicos (Sundaram et al. 2011). Otras investigaciones han evaluado los compuestos fenólicos en concentración ($5\mu M$) para observar su efecto de protección de hemólisis en glóbulos rojos expuestos a H_2O_2 y se encontró que entre $40-80\mu M$, resultó ser efectivo, sin embargo cuando se utilizó una concentración de los componentes fenólicos de 10 a $20\mu M$ no confirmó tal efecto aun cuando los componentes se utilizaron de forma individual (Paiva-Martins et al. 2010), sin embargo aunque en el presente estudio no se realizó de forma individual para cada componente del extracto se logró comprobar la acción de ambos extractos (acuoso y metanólico) en la medición de la molécula de H_2O_2 en los eritrocitos. Además esta molécula es un radical libre, derivada del oxígeno que genera un sistema utilizado por los compuestos fitoquímicos de tipo fenólicos y que define la actividad antioxidante de los productos naturales que depende de dos sistemas, uno de ellos la capacidad de prevenir la peroxidación lipídica de la membrana de los hematíes y otro sería que ningún compuesto puede prevenir la oxidación de la hemoglobina (Pan et al. 1991), lo anterior favorece a los resultados obtenidos en el presente estudio donde se ha tratado de identificar el efecto citotóxico en la membrana del eritrocito.

8.9 Actividad biológica y toxicidad de los extractos en *Artemia salina*

En la Tabla 12 se muestran los resultados de toxicidad sobre *A. salina* de los extractos de las plantas en estudio. Los criterios de toxicidad utilizados fueron: $DL_{50} > 1000\mu g mL^{-1}$ considerado como no tóxico, $\geq 500 \leq 1000\mu g mL^{-1}$ considerado con toxicidad débil y $< 500\mu g mL^{-1}$ considerado tóxico (Déciga-Campos et al.

2007). Los extractos que mostraron toxicidad fueron *T. recurvata*, *S. angustifolia* y *G. oxyphyllum* siendo este último el que mostró mayor toxicidad (DL₅₀ de 200.6 µg mL⁻¹).

Tabla 12. Actividad biológica sobre *A. salina* de los extractos de las plantas en estudio.

Planta	DL ₅₀ (µg mL ⁻¹)
<i>G. oxyphyllum</i>	200.6
<i>T. recurvata</i>	278.8
<i>L. mexicana</i>	678.2
<i>P. glandulosa</i>	513.5
<i>S. angustifolia</i>	293.0
<i>T. stans</i>	937.9
<i>C. equisetifolia</i>	722.5
<i>C. ternifolia</i>	777.4
<i>E. heterophyllum</i>	370.9

Meragelman et al. (2003) aislaron de *Gnaphalium gaudichaudianum* dos compuestos (escualeno y estigmasterol) que mostraron toxicidad moderada en larvas de *A. salina*, esto concuerda con lo observado en este estudio, pero con *G. oxyphyllum* con toxicidad frente a este mismo organismo; en otro estudio por Déciga-Campos et al. (2007) se encontró que causaba mutaciones en *S. typhimurium* TA98, pero sin actividad significativa en la letalidad en larvas del crustáceo. Para *T. recurvata* no se encontraron estudios previos. A *S. angustifolia* se le ha atribuido la presencia de tomentina (una cumarina) y el ácido sphaerálcico con propiedades antiinflamatorias (García-Rodríguez et al. 2012), para *L. mexicana*, *T. stans*, *C. equisetifolia*, *C. ternifolia* y *E. heterophyllum* con toxicidad leve, no se encontraron estudios previos con reporte de DL₅₀ en *A. salina*, en *P. glandulosa* se han realizado estudios previos con hallazgos de $\Delta^{1,2}$ -juliprosepina e indolizidinas (Rahman et al. 2011), en este estudio también se le consideró con toxicidad leve.

8.10 Actividad biológica y evaluación citotóxica de los extractos sobre la línea celular normal VERO

Los datos fueron analizados en GraphPad Prism 6-Demo, en la Figura 26 se muestra la curva de ensayo y en la Tabla 13 la citotoxicidad de los extractos de las plantas en estudio en células normales VERO, *L. mexicana* y *T. recurvata* fueron las de mayor citotoxicidad.

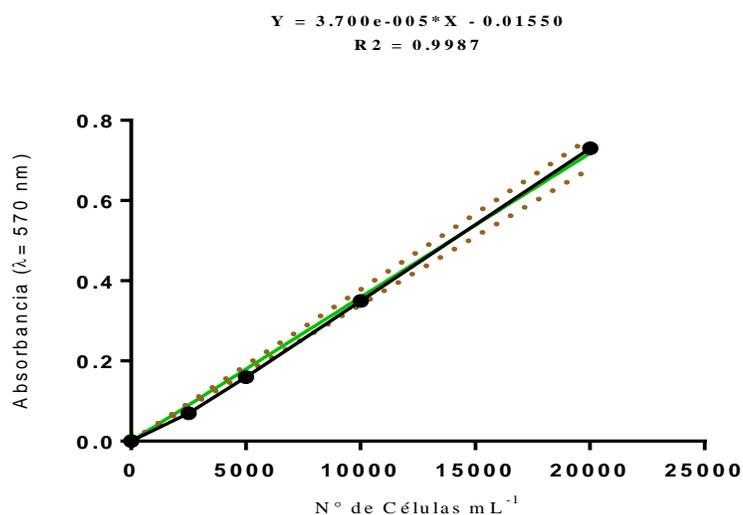


Figura 26. Curva de ensayo para la citotoxicidad de los extractos de las plantas en estudio. Ensayo realizado por triplicado. Ecuación $Y = 3.700 e - 0.005 * X - 0.01550$; $R2 = 0.9987$.

Tabla 13. Citotoxicidad de los extractos acuosos de las plantas en estudio sobre la línea celular VERO.

Planta	IC ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
<i>G. oxyphyllum</i>	>1000
<i>T. recurvata</i>	30.79
<i>L. mexicana</i>	25.07
<i>P. glandulosa</i>	>1000
<i>S. angustifolia</i>	>1000
<i>T. stans</i>	>1000
<i>C. equisetifolia</i>	217.0
<i>C. ternifolia</i>	>1000
<i>E. heterophyllum</i>	>1000

En este trabajo se consideró la actividad citotóxica de los extractos de la siguiente manera, de acuerdo a lo establecido por el Instituto Nacional de Cáncer de US (por sus siglas en Inglés NCI), que define la propiedad de una sustancia contra células cancerosas: IC₅₀ < 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ alta; de 30-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ media; y >100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ baja (Suffness y Pezzuto 1990; Moo-Puc et al. 2011), por lo que *T. recurvatay L. mexicana* presentan citotoxicidad alta con IC₅₀ de 30.79 y 25.07 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente. No se encontraron reportes previos de la citotoxicidad de *L. mexicana*, sin embargo, existen estudios etnobotánicos, fitoquímicos y farmacológicos recientes que muestran a las plantas de la familia Polemoniácea como las más utilizadas por la medicina complementaria y alternativa basada en evidencias por sus propiedades medicinales, sin embargo, sus propiedades mutagénicas agudas y la toxicidad subcrónica también han sido reportadas (Huq et al. 2014). En el caso de *T. recurvata*, se ha reportado que el extracto metanólico crudo posee actividad antiproliferativa contra cinco líneas celulares de cáncer, entre ellas sarcoma de Kaposi, melanoma y linfoma, observando IC₅₀ de 2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Lowe et al. 2013) y no existe reporte sobre células normales.

8.11 Daño histopatológico en hígado y riñón de ratas macho Wistar

Existen investigaciones realizadas sobre los efectos que ejercen los componentes fenólicos. Las agliconas libres como la quercetina, genisteína y compuestos simples como el ferúlico, cafeico, *p*-cumárico, que son absorbidos a través de la mucosa del intestino delgado, determinado mediante ensayos experimentales en ratas (Petko Alov et al. 2015). La transformación de los flavonoides tiene lugar en dos localizaciones: en primer lugar en el hígado, por medio de reacciones de biotransformación de la fase I en las que se introducen o exponen grupos polares; en segundo lugar en el colon mediante reacciones de biotransformación de la fase II, en las que los microorganismos degradan los flavonoides no absorbidos. La conjugación con el ácido glucorónico, sulfatos o glicina, parecen tener lugar tanto para los flavonoides como para sus metabolitos procedentes del colon y los conjugados solubles en agua pueden excretarse por la orina (Pietta PG 2000). En el presente estudio realizado se encontró dentro de los componentes fenólicos a quercetina, componente que se le ha asociado con toxicidad oral (Bolton 2014) y en el experimento realizado utilizando tratamiento en dosis oral en ratas macho Wistar se utilizaron los extractos de *Prosopis glandulosa* y *Calea ternifolia*, ya que en ambas plantas se identificó por HPLC, el componente quercetina, sin embargo solo en la dosis 1700 $\mu\text{g mL}^{-1}$, se evidenciaron cambios espongiiformes en túbulo proximales (Figura 27). Y en tejido hepático con presencia de infiltrado linfocítico en Figura 28, después de la exposición a extractos en un ensayo realizado por triplicado en el modelo animal.

En las Figuras 27 y 28 se observan los cortes histológicos de tejido renal y hepático del modelo animal tras la exposición a los extractos de *Prosopis glandulosa* y *Calea ternifolia* a $1700 \mu\text{g mL}^{-1}$. Utilizado como control (+) rifampicina a $1700 \mu\text{g mL}^{-1}$.

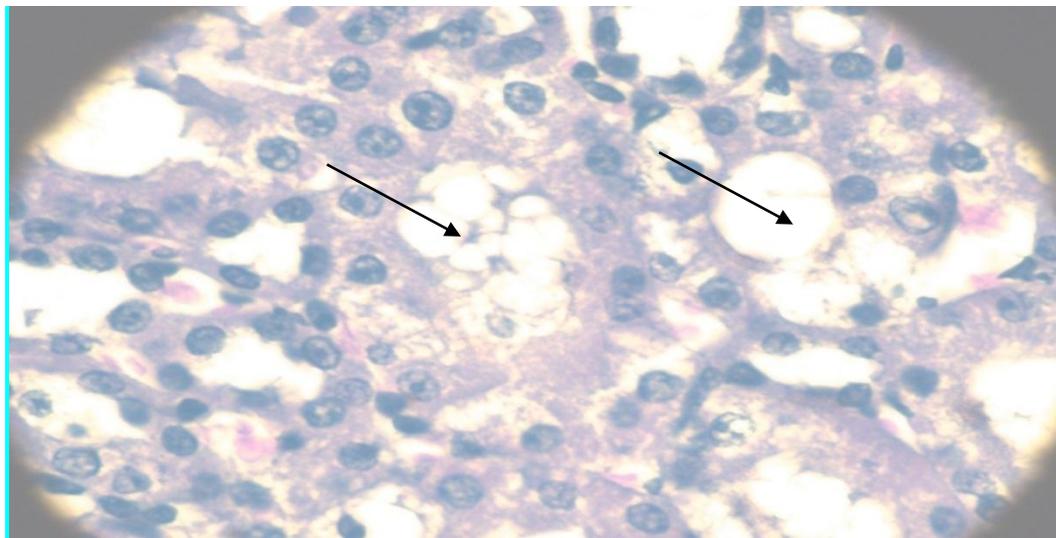


Figura 27. Corte histológico de tejido renal en una tinción con hematoxilina y eosina a la exposición del extracto de *Calea ternifolia*. Se observan cambios espongiformes en túbulo proximal.

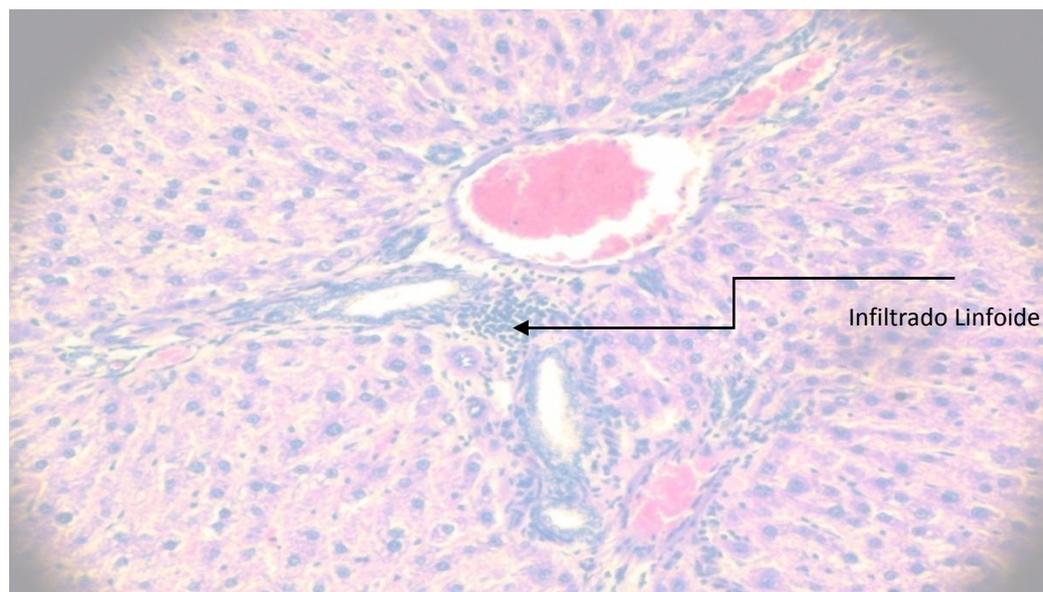


Figura 28. Corte histológico de tejido hepático en una tinción con hematoxilina y eosina mostrando infiltrado linfoide a la exposición a los extractos de *Prosopis glandulosa* y *Calea ternifolia*, mostrando un daño similar al del control (+) con rifampicina.

8.12 Análisis de parámetros bioquímicos en ratas macho Wistar en la exposición a extractos de las plantas en estudio

Además de los cortes histológicos se analizaron los parámetros hemáticos; plaquetas (Figura 29) y leucocitos (Figura 30).

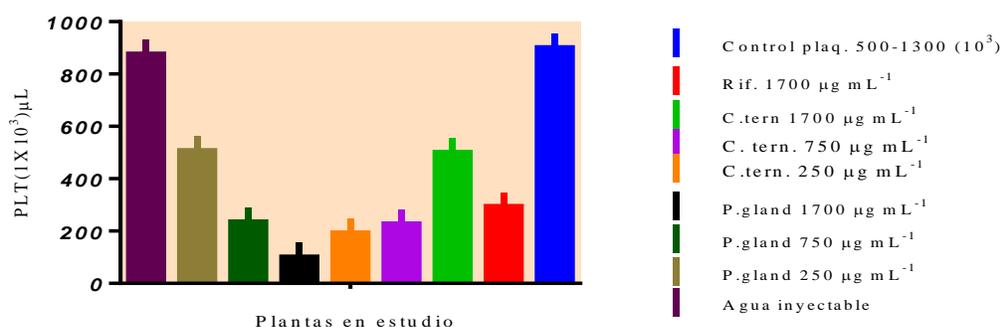


Figura 29. Comportamiento de los parámetros hemáticos. Cuantificación de plaquetas (PLT) en ratas macho Wistar después de la exposición a diferentes concentraciones de los extractos acuosos de *P. glandulosa* y *C. ternifolia*. Control (-) recuento de un control normal de plaquetas para la especie animal utilizada. Control (+) rifampicina como agente productor de trombocitopenia.

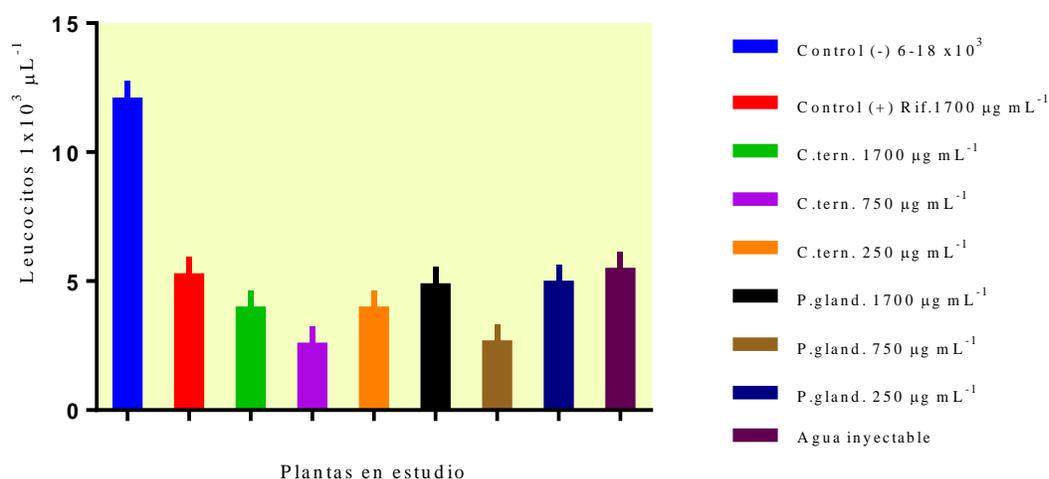


Figura 30. Comportamiento de los parámetros hemáticos. Cuantificación de leucocitos en ratas macho Wistar después de la exposición a diferentes concentraciones de los extractos acuosos de *P. glandulosa* y *C. ternifolia*. Control (-) recuento de un control normal de leucocitos para la especie animal estudiada. Control (+) rifampicina como agente productor de leucopenia.

En la Figura 31 los parámetros bioquímicos mostraron alteraciones bioquímicas en los distintos grupos de estudio del presente trabajo y de forma similar a lo estimado por Henschler et al.(2011).

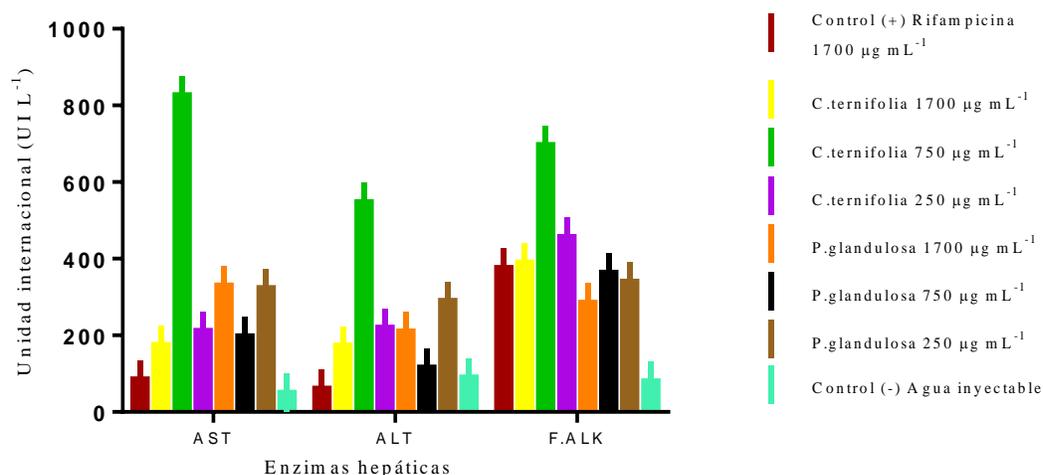


Figura 31. Comportamiento de los parámetros bioquímicos. Cuantificación de enzimas hepáticas y valor normal en Unidades Internacionales por Litro (UI L⁻¹), (VN): alanina aminotransferasa (ALT, VN de 35-80 UI L⁻¹), aspartato aminotransferasa (AST, VN de 14-59 UI L⁻¹) fosfatasa alcalina (F.ALK, VN de 16-50 UI L⁻¹) en el modelo animal, mostrando un incremento en comparación con la administración de agua inyectable C(-) y rifampicina C(+).

8.13 Actividad biológica de los extractos en la Inducción de CYP450

La determinación de la inhibición humana de la familia de enzimas P450, involucrada en el metabolismo de fármacos como (CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP2J2, CYP3A4, y CYP3A5) es posible con ayuda de microsomas preparados a partir de células de insecto que expresan una enzima humana citocromo P450 reductasa (Marks 2002, 2003) y aunque en los microsomas hepáticos es el único sitio dónde se expresan las enzimas CYP450, también se puede estudiar a diferentes enzimas de la misma familia (Marks 2004; Cohen 2003; Trubetskoy 2005). En estudios recientes se ha encontrado que los ligandos de CYP450 interactúan con moléculas orgánicas

(Danielson 2002) y en el estudio realizado se observó respuesta a la exposición de los extractos de las plantas estudiadas debido a que funcionan como sustratos de CYP450.

Los componentes fitoquímicos que contienen las plantas son sustancias orgánicas que se metabolizan en el hígado con la posibilidad de inhibir o inducir la expresión de CYP3A4 en los mamíferos, esta enzima tiene la característica de que el sustrato que ocupa el sitio activo conduce a una disminución en agua de manera no adecuada y una disminución en el desplazamiento del oxígeno activado en el agua por lo que se considera que la hidratación es altamente dependiente del ligando de unión en algunas isoformas de CYP, además los CYP que metabolizan fármacos se caracterizan por un bajo grado de selectividad de sustrato (Hlavica 2001). En el presente estudio CYP3A4, está involucrada en la oxidación de sustratos y es la responsable del metabolismo de fármacos y de los componentes fitoquímicos, como la quercetina encontrada en las plantas utilizadas en medicina tradicional, que está considerada entre los inhibidores de esta enzima y en la cual es necesario evaluar el riesgo/beneficio del uso de este producto natural (Bolton2014), también lo es el Ketoconazol que se utilizó como inhibidor de la enzima CYP3A4. La función de los inhibidores conlleva al incremento de los posibles efectos que se derivaran del consumo de componentes fitoquímicos al no ser metabolizados en el hígado u en otro posible sitio dónde esta enzima sea sintetizada. También se encontraron otros componentes fenólicos en las plantas en estudio como ácido gálico, ácido siríngico, rutina, epicatequina y ácido clorogénico. En estudios de ensayos de elaboración se comprobó que el ácido gálico no es tóxico debido a que su DL_{50} (dosis letal 50) en ratas es de 5 g kg^{-1} (Alnicolsa 2015).

En estudios previos realizados en vertebrados acuáticos se ha encontrado que el ácido gálico es prácticamente no tóxico después de que se comprobó la administración durante 96 hrs (DL_{50}) > a 100 mg L^{-1} . En cuanto a la quercetina, epicatequina y rutina, se ha demostrado que tiene un potencial atenuante contra la radiación y daño citogénico (Patilet *al.* 2015). En el presente estudio solo se llevó a cabo el ensayo para determinar la inducción de CYP3A4, se observa la actividad(%

de inhibición) de los extractos a diferentes concentraciones sobre *baculosomas humanosen* la Tabla 14.

Tabla 14. Actividad de los extractos acuosos de las plantas en estudio a diferentes concentraciones sobre baculosomas humanos y la inhibición en % de CYP3A4.

Planta	% inhibición de CYP3A4		
	1500($\mu\text{g/mL}$)	750 ($\mu\text{g/mL}$)	375 ($\mu\text{g/mL}$)
<i>G.oxiphyllum</i>	50	43	71
<i>T.recurvata</i>	99	27	43
<i>L. mexicana</i>	50	89	51
<i>P.glandulosa</i>	59	49	77
<i>S.angustifolia</i>	50	14	73
<i>T.stans</i>	99	23	23
<i>C.equisetifolia</i>	75	64	64
<i>C. ternifolia</i>	59	88	99
<i>E. heterophyllum</i>	64	64	9
<i>Rifampicina 10μM</i>	56	56	56
<i>Ketoconazol 10μM</i>	95	95	95

Por lo que se puede considerar que los compuestos fenólicos actúan como antioxidantes, pero también pueden llevar a cabo reacciones pro-oxidantes, ejerciendo efectos citotóxicos sobre las células y los tejidos, así como la inducción o inhibición de CYP450 (Kondo et al. 1999; Bolton 2014), en el presente estudio es posible considerar que hay inhibición de la enzima CYP3A4 ante la exposición de los extractos de las plantas en estudio.

9. CONCLUSIONES

- ✓ De las nueve plantas en estudio utilizadas en medicina tradicional en la Comarca Lagunera, *C. ternifolia* y *P. glandulosa* produjeron mayor rendimiento en la obtención de extracto acuoso y metanólico respectivamente.

- ✓ *L. mexicana*, *E. heterophyllum* y *G. oxyphyllum* utilizadas en medicina tradicional poseen gran diversidad de metabolitos secundarios. *L. mexicana*; flavonoides, carbohidratos, grupo carbonilo, esteroides, triterpenos, cumarinas, alcaloides y saponinas. *E. heterophyllum*; flavonoides, carbohidratos, doble enlace, grupo carbonilo, cumarinas, saponinas y sesquiterpenlactonas y *G. oxyphyllum*; taninos, flavonoides, carbohidratos, triterpenos, cumarinas, saponinas, y sesquiterpenlactonas.

- ✓ En las plantas en estudio se identificaron por HPLC los siguientes compuestos:
 - Rutina: *G. oxyphyllum*, *L. mexicana*, *P. glandulosa*, *C. ternifolia*.
 - Ácido gálico: *G. oxyphyllum*, *L. mexicana*, *C. equisetifolia*, *T. recurvata*, *S. angustifolia*.
 - Ácido siríngico: *T. recurvata*.
 - Quercetina: *C. ternifolia*, *P. glandulosa*, *C. equisetifolia*, *T. stans*.
 - Epicatequina: *C. ternifolia*.
 - Catequina: *S. angustifolia*.

- ✓ Los extractos acuosos de las plantas en estudio analizadas producen eriptosis similar a la que produce el fármaco de rifampicina; modificaron el Volumen Corpuscular Medio (VCM) de los eritrocitos; produjeron peroxidación lipídica (TBARS/MDA) mayor a los valores normales, sin embargo la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en la exposición de los eritrocitos a los extractos metanólicos se observó un valor cercano al del control negativo. En cambio para la exposición de los eritrocitos a los extractos acuosos la producción de (H_2O_2) se mostró superior y muy cercana al valor de citotoxicidad.

- ✓ Los extractos que presentaron toxicidad sobre *Artemia salina* fueron: *G. oxyphyllum*, *T. recurvata*, *S. angustifolia* y *E. heterophyllum* y citotoxicidad sobre la línea celular VERO fueron: *T. recurvata* y *L. mexicana*.

- ✓ Los parámetros bioquímicos en el modelo animal después de la administración de los extractos de *P. glandulosa* y *C. ternifolia* fueron: plaquetas debajo de los valores normales y las enzimas hepáticas (ALT, AST y F. ALK) se incrementaron, siendo la F. ALK la de mayor valor. En los cortes histológicos del modelo animal expuesto al extracto de *C. Ternifolia* hubo cambios espongiiformes en los túbulos proximales del tejido renal. En los cortes histológicos del modelo animal expuestos a *C. ternifolia* y *P. glandulosa* se observó infiltrado linfoide en tejido hepático. Y en su mayoría las plantas estudiadas inhiben a CYP3A4 en *baculosomas humanos*.

10. PERSPECTIVAS

Continuar en otra etapa de planificación de proyecto empresarial y científico con producción sostenible de plantas aromáticas y medicinales para mejora la competencia personal al cualificar fitocomponentes en cultivos autónomos y ambientales con aplicación en medicina tradicional, identificando principios activos y su posible actividad terapéutica además de comprobar el uso seguro.

Seguir con la evaluación de CYP3A4 que son las isoenzimas que se puede inducir su expresión y evaluar por la presencia de genes, o bien identificar la inducción o inhibición mediante inmunohistoquímica a nivel de membrana celular e intracelular como son las mitocondrias para conocer el efecto de componentes fitoquímicos y xenobióticos.

Otro aspecto será formar a jóvenes investigadores que impulsen el progreso del País y de nuestro planeta habitable hasta ahora tratando de inculcar el saber como parte integral de la Humanidad que equilibre los sentimientos, la conducta y el proceder de las acciones de cada entidad biológica consiente de la realidad. Pertenecer a un grupo consolidado de Investigadores. Realizar publicaciones de manera semestral. Formar parte de un Honorable Consejo Universitario. Consolidar Comités de Ética en Investigación así como un bioterio. Y estar laborando de manera continua en un Laboratorio de Investigación para asignar un lugar a cada estudiante que de manera muy frecuente solicitan de mis servicios.

11. BIBLIOGRAFÍA

Alnicolsa del Perú. 2015. [online]. <http://taninos.tripod.com/acidogalico.htm> [Consulta 05 Diciembre 2015].

Abed M, Towhid ST, Shaik N, Lang F. 2012. Stimulation of suicidal death of erythrocytes by rifampicina. *Toxicology*.302(2-3):123-8. doi: 10.1016/j.tox.2012.10.006.

Adem S, Comakli V, Kuzu M, Demirdag R. 2014. Investigation of the effects of some phenolic compounds on the activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase from human erythrocytes. *J Biochem Mol Toxicol*. 28(11):510-4. doi: 10.1002/jbt.21592.

Aguilar Pérez LA., Lara Viveros FM, Nieto AD. 2010. Antracnosis en mango: Método de obtención y evaluación del efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento invitro de *Colleto trichum gloeosporioides*. *Agro* pp 1-2.

Alvarado Ch B. 2007. Review. Plantas medicinales de la cordillera negra. *Acad Perú Salud* 14(2).

Alzadora L, Colona E, Acero de Mesa N, Galán de Mera A, Muñoz-Mingarro D, Linares F, Domínguez MT, Alvarez E. 2007. Cytotoxic effect of the methanolic extract of three ecotype of *Lepidium peruvianum*, Chacón on cellular lines HeLa and HT-29. *Biol* 13(3): 219 – 221.

Amundson DM, Zhou M. 1999. Fluorometric method for the enzymatic determination of cholesterol. *J Biochem Biophys Methods*. 38(1):43-52.

Argueta VA, Zolla CC. 1994-2000. Biblioteca digital de la medicina Tradicional Mexicana. INI. México. Capítulos 17 y 26.

Argueta, VA. Cano L, Gallardo VCM, Jiménez AR, Ballesteros MM, Torres MG, González HA, Rodarte ME. 1994. Atlas de las plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Ed, del Instituto Nacional Indígena (INI). México, vol 5.

Armstrong D, Browne R. 1994. The analysis of free radicals, lipid peroxides, antioxidant enzymes and compounds related to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. *Adv Exp Med Biol.* 366:43-58.

Bafna AR, Mirshra SH. 2005. Inmunomodulatory activity of methanol extract of roots of *Cissampelos pareira* Linn. *Ars Pharm* 46(3): 253-262.

Bilto YY y Abdalla SS. 1998. Effects of selected flavonoids on deformability, osmotic fragility and aggregation of human erythrocytes. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 18: 165-173.

Bisset NG. 1994. Herbal drug and phytopharmaceuticals 1994. A handbook for practice on a scientist basis. Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, U.K. pp. 302.

Boeris MA. 2007. Purificación del extracto hidroalcohólico de *Salpichroa organifolia*. *Ciencia Veterinaria* 9: 1.

Bolton JL. 2014. Quinone Methide Bioactivation Pathway: Contribution to Toxicity and/or Cytoprotection? *Curr Org Chem.* 18: 61-69.

Bruneton J. 2001. Farmacognosia, Fitoquímica. Plantas medicinales. Acribia Editorial 2º Ed, Zaragoza, pp 100-180.

Buch K, Peters T, Nawroth T, Sanger M, Schmidberger H, Langguth P. 2012. Determination of Cell Survival after Irradiation via Clonogenic Assay versus Multiple MTT Assay - A Comparative Study. *RadiatOncol* 3;7:1

Bussmann RW, Malca G, Glenn A, Sharon D, Nilsen B, Parris B, Dubose D, Ruiz D, Saleda J, Martinez M, Carillo L, Walker K, Kuhlman A, Townesmith A. 2011. Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern Peru.. *J Ethnopharmacol.* 1; 137(1):121-40.

Cabrera S, Hirán R. 2012. Composición fitoquímica de partes aéreas frescas de *Phania matricarioides*. *Rev Cubana Plant Med [online].* 17:3, pp. 268-278. ISSN 1028-4796.

Cañigual S, Dellacassa E, Bandoni AL. 2003. Conferencia de la Cátedra de Farmacognosia y Productos Naturales. Preparación de extractos. *Lat. Am. J. Pharm* 22(3): 265-343.

Capasso R, Izzo A, Pinto L, Bifulco T, Vitobello C, Mascolo N. 2000. Phytotherapy and quality of herbal medicines. *Fitoterapia*, 71: S58-S65.

Carballo JL, Hernández-Inda ZL, Pérez P, García-Grávalos MD. 2002. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnol.* Sep 23;2:17.

Choge S.K, NM Pasiecznik, M Harvery, J Wright, SZ Awan, PJC Harris. 2007. Prosopis pods as human food, with special reference to Kenya#. *Water SA.* (on-line) Special Edition. 33: 3

CIOMS 2009. International Ethical Guidelines for Epidemiological Studies by the Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS). WHO Press, Geneva Switzerland, pp 1-2.

Cohen L. 2003. In vitro drug interactions of cytochrome P450: an evaluation of fluorogenic to conventional substrates. *Drug Metab. Dispos.* 31. 1005-15.

COPRISEM. 2012. Comisión para la Protección contra Riesgos Sanitarios del Estado de Morelos. Periódico Oficial. 9 Mayo, pp 53-60.

Danielson PB. 2002. The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Curr Drug Metab.* 3(6):561-97.

Das S, Paul A, Mumbrekar KD, Rao SB. 2017. Harmonization of Mangiferin on methylmercury engendered mitochondrial dysfunction. *Environ Toxicol.* 32(2):630-644. doi: 10.1002/tox.22265.

Dawn-Linsley M, Ekinci FJ, Ortiz D, Rogers E, Shea TB. 2005. Monitoring thiobarbituric acid-reactive substances (TBARs) as an assay for oxidative damage in neuronal cultures and central nervous system. *J Neurosci Methods.* 141(2):219-22.

de Castro Pardo C. 2006. Determination of the cytotoxic effects of extracts, fractions, or substances, by means of MTT Test. *Medicinal Chemistry, B Colombia*, pp. 1-9.

De Jesús-Gabino AF, Mendoza-de Gives P, Salinas-Sánchez DO, López-Arellano ME, Liébano-Hernández E, Hernández-Velázquez VM, Valladares-Cisneros G 2010. Anthelmintic effects of *Prosopis laevigata* n-

hexanic extract against *Haemonchus contortus* in artificially infected gerbils (*Meriones unguiculatus*). *J. Helminthol* 84(1):71-5.

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

Del Caro, A; A. Piga. 2008. Polyphenol composition of peel and pulp of two Italian fresh fig fruits cultivars (*Ficus carica* L.). *Eur Food Res Technol*, 226 (4): 715-719.

Denizot F. Lang R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods*. 22:89(2): 271-7.

Deskur E, Przywarska I, Dylewicz P, Szcześniak L, Rychlewski T, Wilk M, Wysocki H. 1998. Exercise-induced increase in hydrogen peroxide plasma levels is diminished by endurance training after myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 67(3):219-24.

Deuticke B. Heller KB, Haest CW. 1986. Leak formation in human erythrocytes by the radical-forming oxidant t-butylhydroperoxidase. *Biochem Biophys Acta*. 29; 854(2): 169-83.

Dinis TC, Almeida LM, Madeira VM. 1993. *Arch Biochem Biophys*. 301(2):256-64.

Domínguez X.A. 1988. *Métodos de Investigación Fitoquímica*. Limusa. México, pp. 50-73.

Domínguez XA. 1973. Métodos de investigación fitoquímica. Editorial Limusa. México D.F, pp.1-16 y 30-32.

Espinoza Salazar IM. 2003. Análisis fitoquímico y actividad antimicrobiana de *Tillandsia recurvata*. UAM Ciencias Biológicas y de la Salud. TESIAMI Colección de tesis electrónicas. México, pp. 1-31.

Frei B, Yamamoto Y, Niclas D, Ames BN. 1988. Evaluation of an isoluminol chemiluminescence assay for the detection of hydroperoxides in human blood plasma. *Anal Biochem.* 175(1):120-30.

Gang Bao & S. Suresh. 2003, Cell and molecular mechanics of biological materials. *Nature Materials* 2: 715 – 725. doi:10.1038/nmat1001.

Gangwar M, Gautam MK, Sharma AK, Tripathi YB, Goel RK, Nath G. 2014. Antioxidant capacity and radical scavenging effect of polyphenol rich *Mallotus philippensis* fruit extract on human erythrocytes: an in vitro study. *Scientific World Journal.* 2014:279451, pp.12. doi: 10.1155/2014/279451.

García Ramírez HJ. 2009. Incluyen plantas de Oaxaca en cuadro básico de remedios herbolarios. Comunicado herbolaria y salud natural en México. Periodismo de Paz Ciudadanía Express. Publicado por @Shinji_Harper, agosto, p. 2.

García-Rodríguez RV, Chamorro-Cevallos G, Siordia G, Jiménez-Arellanes MA, Chávez-Soto MA, Meckes-Fischer M. 2012. *Sphaeralcea angustifolia* (Cav.) G. Don extract, a potential phytomedicine to treat chronic inflammation. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.* 11(5): 468-477.

George C, Lochner A, Huisamen B. 2011. The efficacy of *Prosopis glandulosa* as antidiabetic treatment in rat models of diabetes and insulin resistance. *J Ethnopharmacol.* 1;137(1):298-304. doi: 10.1016/j.jep.2011.05.023.

George V. 1892. Contributions from the U. S. National Herbarium. *Botanist, Department of Agriculture.* Washington. 3(1): pp. 50-311.

Ginebra. 2000. Guías operacionales para Comités de ética que evalúan investigación Biomédica. Ginebra 2000 (PNUD/BM/OMS) y su Guía Complementaria sobre supervisión y evaluación de Prácticas de Revisión Ética. Ginebra, pp. 1-3.

Ginebra 2002. Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos. Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas en colaboración con la Organización Mundial de la Salud. CIOMS. Edición en Lengua Española Santiago de Chile. Geneva 27 Switzerland, pp. 7-22.

Gonthier MP, Verny MA, Besson C, Remesy C, Scalbert A. 2003. La disponibilidad biológica del ácido clorogénico depende altamente en su metabolismo por la microflora del intestino en las ratas. *J. Nutr.* 133: 1853-1859.

González R, Tarazona R, Galiano MD, Bugella G, Peña J. 2011. Métodos basados en la unión Ag-Ac. *Inmunol*, pp 1-8.

González A. 1989. Plantas tóxicas para el ganado. Editorial Limusa S.A. México, pp 273.

González EM, López EL, González ES, Tena FJ. 2002. Plantas medicinales del Estado de Durango y Zonas Aledañas, CIDIR Durango México. IPN, 1-144.

Halliwell, B. 1992. Especies reactivas de oxígeno en los sistemas vivos: procedencia bioquímica y papel patógeno en el hombre. En: GSH System. Gutation Eje de la defensa antioxidante (Crystal, R.J.y R., J.R. eds.). Excerpta Médica. Amsterdam, pp 42-47.

Harborne J. 1980. Phytochemical Methods. Sciences Paper backs. 40(1): 35-42.

Henschler R, Seifried E, Mufti N. 2011 Development of the S-303 Pathogen Inactivation Technology for Red Blood Cell Concentrates. Transfus Med Hemother. 38 (1):33-42.

Hersch MP. 2007. Programa "Actores Sociales de la Flora Medicinal en México" Instituto Nacional de Antropología e Historia. Bol. Soc. Quím. Méx. 1(2): 107-114.

Hlavica P, Lewis DF. 2001. Allosteric phenomena in cytochrome P450-catalyzed monooxygenations. Eur J Biochem. 268(18):4817-32.

Huq AK., Jamal JA., Stanslas J. 2014. Ethnobotanical, Phytochemical, Pharmacological, and Toxicological Aspects of *Persicaria hydropiper* (L.) Delarbre. Evid Based Complement Alternat Med. 2014:1-24. doi: 10.1155/2014/782830.

Ibarra MJ, Cantú PC, Verde MJ, Oranday A. 2009. Caracterización fitoquímica y efecto hipoglucemiante de *Tecoma stans* y su relación con la

presencia del cromo como factor de tolerancia a la glucosa. *Información Tecnológica*. 20(5): 55-65.

James JC, Sobol M, Dongping MH, Tetsuo Uyeda, Meisenheimer P. 2009. CYPs Assays. *Promega Biosciences* 23:17-19.

Jilani K, Lang F. 2013. Carmustine-induced phosphatidylserine translocation in the erythrocyte membrane. *Toxins (Basel)*. 19;5(4):703-16. doi: 10.3390/toxins5040703.

Jiménez EM., K. Velázquez, A. Lira-Rocha, A. Ortega, E. Diaz. 1989. Structure of a pentacyclic triterpenyl angelate from *Loeselia mexicana*. ^1H 2D-NMR data and stereochemistry. *Canadian Journal of Chemistry*. 67: 2071–2077.

Keshava, C, McCanlies EC, Weston A. 2004. CYP3A4 polymorphisms- potential risk factors for breast and prostate cancer: Review. *Am. J. Epidemiol* 160(9): 825 -866.

Kingsbury JM. 1964. *Poisonous Plants of the United States and Canada*. Prentice –Hall Inc, Englewood Cliffs, N.J. USA, pp. 626.

Kiruthiga PV, Karutha Pandian S, Pandima Devi K. 2011. Silymarin prevents the toxicity induced by benzo(a)pyrene in human erythrocytes by preserving its membrane integrity: An in vitro study. *Environ Toxicol*. 27:4. Doi:10.1002/tox.20783

Kitty de Jong , Danielle Geldwerth , and Frans A. Kuypers. 1997. Oxidative Damage Does Not Alter Membrane Phospholipid Asymmetry in Human Erythrocytes *Biochemistry*, 1997, 36 (22), pp 6768–6776. DOI: 10.1021/bi962973a.

Kondo K, Kurihara M, Miyata N., Suzuki T & Toyoda M. 1999. Scavenging mechanisms of (-)-epigallocatechin gallate and (-)-epicatechin gallate on peroxy radicals and formation of superoxide during the inhibition action. *Free Radical Biology and Medicine*. 27:855-863.doi:10.1016/S0891-5849(99)00133-1

Lau C, Thibodeaux JR, Hanson RG, Narotsky MG, Rogers JM. Lindstrom AB, Strynar MJ. 2006. Effects of perfluorooctanoic acid exposure during pregnancy in mouse. *ToxicolSci* 90(2) : 510-8.

Lee IY, Fronczek FR, Malcolm A, Fischer NH, Urbatsch LE. 1982. New germacrolide From *Calea ternifolia* and the Molecular Structure of 9 α -Hydroxy-11,13-Dihydro-11 α ,13-Epoxyatripliciolide-8 β -O-[2-Methylacrylate]. *J NatProd*. 45 (3): 311-316.

Lock O. 1994. Método de Estudio de Productos Naturales. Fondo Ed. PUCP: Lima, pp. 114-130.

Lomenick B, Richard WO, Huang J. 2010. Identification of direct protein targets of small molecules. *ACS Chemical Biology* 6: 1: 34-36.

López-Aroche U, Salinas-Sánchez DO, Mendoza de Gives, López-Arellano ME, Liébano-Hernández E, Valladares-CisnerosG, Arias-Ataide DM, Hernández Velazquez V. 2008. In vitro nematicidal effects of medicinal plants from the Sierra de Huautla, Biosphere Reserve, Morelos, México against *Haemonchus contortus* infective larvae. *J. Helminthol*. 82(1):25-31.

López Revueltas A, Sánchez –Gallegos JI, Hernández-Hernández A. Sánchez –Yagúe J, Marcial Llanillo. 2005. Increase in vulnerability to

oxidative damage in cholesterol- modified erythrocytes exposed to t-BuOOH. DBBM, pp.74-85.

Lou G, Lin J, Fiske WD, Dai R, Yang TJ, Kim S, Sinz M, LeCluyse E, Brennan JM, Benedek IH, Jolley S, Gilbert D, Wang L, Lee FW, Gan LS. 2003. Concurrent Induction and mechanism-based inactivation of CYP3A4 by an L-Valinamide Derivative. *Drug Metab Dispos.* 31(9): 1170-1175.

Lowe H. 2008. Anti-tumor and anti-inflammatory extracts of plant biomass and their uses. United States Patent application, pp 1-14.

Lowe S, Browne M, Boudjelas S, De Poorter M. 2000. 100 de las Especies Exóticas Invasoras más dañinas del mundo. Una selección del Global Invasive Species Database. Grupo Especialista de Especies Invasoras (GEEI), Grupo especialista de la Comisión de Supervivencia de Especies (CSE), Unión Mundial para la Naturaleza (UICN), rev Aliens, p 12.

Lowe HI, Toyang NJ, Bryant J. 2013. In vitro and in vivo anti-cancer effects of *Tillandsia recurvate* (ball moss) from Jamaica. *West Indian Med J.* 62(3):177-80

Lundell, C.L. et al. 1967. *Flora of Texas*. 3 vol. 1942-1969 (F TexLund) 1:334.

Lupescu A, Jilani K, Zbidah M, Lang E, Lang FJ. 2012. Enhanced Ca²⁺ entry, ceramide formation, and apoptotic death of erythrocytes triggered by plumbagin. *Nat Prod.* 26;75(11):1956-61. doi: 10.1021/np300611r.

Mahfouz MM, y Kummerow F.A. 2000 cholesterol-rich diet shave different effects on lipid peroxidation, cholesterol oxides, and antioxidant enzymes in rats and rabbits. *J. Nutr. Biochem.* 11: 293-302.

Marinoff MA, Martínez JL, Urbina MA. 2009. Precauciones en el empleo de plantas medicinales. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, May. 8 (3), pp 184-187.

Marks B. 2002. A high throughput screening assay to screen for CYP2E1 metabolism and inhibition using a fluorogenic VividR P450 substrate. Assay Drug Dev. Technol. 1:3-81.

Marks B. 2004. High-throughput screening assays for the assessment of CYP2C9*1, CYP2C9*2, and CYP2C9*3 metabolism using fluorogenic VividR substrates. J. Biomol. Screen. 9: 439-49.

Marks BD, Goossens TA, Braun HA, Ozers MS, Smith RW, Lebakken C, Trubetskoy OV . 2003. High-throughput screening assays for CYP2B6 metabolism and inhibition using fluorogenic vivid substrates. APS PharmSci.5(2):E18.

Márquez ACF, Lara O, Esquivel RB, Mata ER. 1999. Plantas medicinales de México II. Composición, usos y actividad biológica. Universidad Nacional Autónoma de México. México, p 107.

Marroquín-Segura R, Flores-Cabrera Y, Carreón-Sánchez R, Valadez-Sánchez CS, Mora-Guevara, JLA, Hernández-Abad VJ; Flores-Pimentel M. 2013. "Estudio del extracto etanólico de *Eryngium heterophyllum* (hierba del sapo); para comprobar su actividad hipoglucemiante y anti-inflamatoria". Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, num. Abril-Junio, pp. 41-45.

Martínez MV, Sánchez FA., Joseph-Nathan P. 1987. Thymol derivatives from *Calea nelsonii*. Phytochemistry. 26(9): 2577-2579.

Doi:10.1016/S0031-9422(00)83881-9

Mawatari S, Murakami K. 2001. Effects of ascorbate on membrane phospholipids and tocopherols of intact erythrocytes during peroxidation by t-butylhydroperoxide: comparison with effects of dithiothreitol. *Lipids* 36: 57-65.

Meckes M, David-Rivera AD, Nava-Aguilar V, Jimenez A. 2004. Activity of some Mexican medicinal plant extract on carrageenan-induced rat paw edema. *Phytomedicine* 11:446-497.

Meragelman TL, Silva GL, Mongelli E, Gil RR. 2003. ent-Pimarane type diterpenes from *Gnaphalium gaudichaudianum*. *Phytochemistry*. 62(4): 569-572.

Meyer BN, Ferrigni NR. 1982. "Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents." *Plant Medical* 1982. 45: 31-34.

Michael AS, Thompson CG, Abramovitz M. 1956. *Artemia salina* as a test organism for a bioassay. *Science*. 123:464.

Moon YJ, Wang X, Morris ME. 2006. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicol In Vitro*. 2:187-210.

Moo-Puc R, Robledo D, Freile-Pelegri Y. 2011. Enhanced Antitumoral Activity of Extracts Derived from Cultured *Udotea flabellum* (Chlorophyta). *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2011: 1-7. doi: 10.1155/2011/969275

Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and Cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods*. 65: 55-63.

Muenscher WC. 1951 Poisonous plants of the United States. Macmillian New York, p. 277.

Murakami Y, Kawata A, Ito S, Katayama T, Fujisawa S. 2015. The Radical Scavenging Activity and Cytotoxicity of Resveratrol, Orcinol and 4-Allylphenol and their Inhibitory Effects on Cox-2 Gene Expression and Nf-kb Activation in RAW264.7 Cells Stimulated with *Porphyromonas gingivalis*-fimbriae. *In Vivo*. 29(3):341-9.

Nabavi SF, Habtemariam S, Sureda A, Hajizadeh Moghaddam A, Daglia M, Nabavi SM. 2013. In vivo protective effects of gallic acid isolated from *Peltiphyllum peltatum* against sodium fluoride-induced oxidative stress in rat erythrocytes. *Hig Rada Toksikol*. 64(4):553-9. doi: 10.2478/10004-1254-64-2013-2353.

Navarro AA, 2009. Contaminantes emergentes de los alimentos. Evaluación del riesgo toxicológico. *Revista de Toxicología*, Pamplona España. 26(1), pp. 21-22. id=91917289019

Navarro-Garcia, V, M. Herrera-Ruiz, G. Rojas, G. Zepeda. 2007. Coumarin derivatives from *Loeselia mexicana*. Determination of the anxiolytic effect of daphnoretin on elevated plus maze. *Journal of Mexican Chemical Society*. 51: 193–197.

Nelson D. 2005. Cytochrome P450s in humans. Retrieved 1: 187-202.

Nguyen DB, Wagner-Britz L, Maia S, Steffen P, Wagner C, Kaestner L, Bernhardt I. 2011 Regulation of phosphatidylserine exposure in red blood cells. *Cell PhysiolBiochem*. 28(5): 847-56.

Norma Oficial Mexicana NOM-220-SSA1-2012. Instalación y Operación de la Farmacovigilancia. México D.F., a 11 de diciembre de 2012.

Organización Mundial de la Salud. (OMS). 2000. Guías operacionales para Comités de Ética que evalúan Investigación Biomédica. TRD/PRD/ETHICS/2000.1 Ginebra, pp 29-31.

Paiva-Martins F, Fernandes J, Santos V, Silva L, Borges F, Rocha S, Belo L, Santos-Silva A. 2010. Powerful protective role of 3,4-dihydroxyphenylethanol-elenolic acid dialdehyde against erythrocyte oxidative-induced hemolysis. *J Agric Food Chem.*58(1):135-40. doi: 10.1021/jf9031052.

Palá-Paúl J, Pérez Alonso MJ, Velasco-Negueruela A, Vadaré J, Villa AM, Sanz J, Brophy JJ. 2005. Essential oil composition of the different parts of *Eryngium bourgatii* Gouan from Spain. *J Chromatography A.* 1074 (1-2):235-239. doi: 10.1016/j.chroma.2005.03.036.

Palomino O. 2001. Métodos analíticos para la identificación de plantas medicinales. Madrid: Apuntes del curso de la Asociación Española de Farmacéutica de la Industria (AEFI).

Pan H, Lin F, Qiu J, Huang F, Chiu T, Zhang Z. 1991. Antioxidant action of certain simple phenolic compounds derived from Chinese herbs. *Chin Med Sci J.* 6(1):52-5.

Parrotta JA. 1993, *Casuarina equisetifolia* L. ex J.R. & G. Forst, Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station, pp. 107-117.

Patil S, Rao N, Somashekarappa H, Raiashekhar K. 2015. Antigenotoxic potential of rutin and quercetin in Swiss mice exposed to gamma radiation. *Biomed J.* 37: 305-13

Peppercom, MA. Goldman P. 1972. Caffeic acid metabolism by gnotobiotic rat and their intestinal bacteria. *Prod Nat AcadSci USA*, 69 (6): 1413-1415.

Perez Trueba G. 2003. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Rev Cubana Invest Biomed* 22(1): 48-57.

Pérez-Hernández J, González-Cortazar M, Marquina S, Herrera-Ruiz M, Meckes-Fischer M, Tortoriello J, Cruz-Sosa F, Nicasio-Torres Mdel P. 2014. Sphaeralcin acid and tomentin, anti-inflammatory compounds produced in cell suspension cultures of *Sphaeralcea angustifolia*. *Planta Med.*; 80(2-3):209-14. doi: 10.1055/s-0033-1360302

Petko Alov, Ivanka Tsakovska, Ilza Pajeva. 2015. Computational Studies of Free Radical-Scavenging Properties of Phenolic Compounds. *Curr Top Med Chem.* 15(2): 85–104. doi: 10.2174/1568026615666141209143702

Pietta PG. 2000. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod.* 2000 63(7):1035-42.

Qnais EY, Abdulla FA, Kaddumi EG, Abdalla SS. 2012. Antidiarrheal activity of *Laurus nobilis* L. leaf extract in rats. *J. Med Food.* 15(1): 51-7.

Rafinesque Constantine S, George E S. 1985. The beginning of Maya hieroglyphic study. *National Geography. The Atlantic J*, pp 1-18.

Rahman AA, Samoylenko V, Jacob MR, Sahu R, Jain SK, Khan SI, Tekwani BL, Muhammad I. 2011. Antiparasitic and antimicrobial

indolizidines from the leaves of *Prosopis glandulosa* var. *glandulosa*.
Planta Med. 77(14):1639-43. doi: 10.1055/s-0030-1270906.

Raju S, Kavimani S, Maheshwara Rao VU, Reddy KS, Kumar GV. 2011.
Floral extract of *Tecomastans*: a potent inhibitor of gentamicin-induced. *J Trop Med.* 4(9): 680-685.

Ritcher C. 1987. Biophysical consequences of lipid peroxidation in
membranes. *Chem. Phys .Lipids*, 44: 175-189.

Roger JM. 2006. Of Mice ,Men, Monkeys and Metabolism: An Up date on
the Developmental Toxicity of Methanol. *Birth Defects Res A. Clin Mol.Teratol .* 76(5):348.

Rojo Domínguez D, Bell Heredia L, Cancio Martínez E, Iglesias Lares R.
2002. Efecto del extracto hipoglicemiante de *Petiveria alliacea* L, sobre el
consumo de glucosa en los eritrocitos. *Rev Cub Invest Biomed* 21(3):161-6.

Romer I, Sada H, Gómez G, Marquez S. *Membrana plasmática.* 2002 p 1-
26.

Romero G, Martínez L, García Fernández AJ, Hernández García LA. 2011.
Cultivos en suspensión (I). Preparación de cultivo de eritrocitos para
estudio de citotoxicidad por espectrofotometría. *Toxicol*, pp 1-9.

Ruiz C J, Ventanas CS, Martín GD, Pérez PT. 2005. Análisis de
hidrocarburos policíclicos aromáticos y nitrosaminas en sistemas modelo
de gelatina mediante SPME-DED. *Toxicol.* 22:110-118.

Ruiz NA. 2012. Toxinas vegetales con acción sobre el sistema nervioso.
Aminas biógenas. Tóxicas vegetales con acción Antinutrientes. Lección 9.

Diplomado en Nutrición Humana y dietética (2º curso) Univ. A. Madrid, pp. 1-34.

Salvati AM, Tenti L. 1981. Determination of aberrant hemoglobin derivatives in human blood, *Methods Enzymol.* 76: 715-731.

Sánchez Gallegos JI. 2009. Efecto de la quercitina y la rutina frente al daño oxidativo inducido en eritrocitos con distintos contenidos de colesterol. *DBBM*, pp. 18-100.

Sánchez-Yagüe J. Cabezas JA. Llanillo M. 1987. Rearrangement of aminophospholipids and bilayers from sheep platelet plasma membranes and platelet liposomes by increasing their cholesterol levels. *Biochemical and Biophys Res Commun* 145 (3): 1362-1367.

Sanguanpong U, Hummel HE. 2008. Toxicity of *Stemona* root against onion cutworm by using different contacting methods and solvents. *Commun Agric Appl BiolSci* 73(3):459.

Santillan S, Freddy J. Ramírez E, Varela A, Gloria M G, J. D'Artagnan, Velázquez C. 2011. *Sphaeralcea angustifolia* Especie medicinal de Hidalgo con efecto antidiarreico. Congreso Internacional QFB 2011. Monterrey N.L., (México), Agosto 23-24.

Sasidharan S, Chen Y, Saravanan D, Sundram KM, Yega Latha L. 2011. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *Afr J Traditional Altern Med.* 8(1): 1-10.

Shaik N, Zbidah M, Lang F. 2012. Inhibition of Ca(2+) entry and suicidal erythrocyte death by naringin. *Cell Physiol Biochem.* 30(3):678-86. doi: 10.1159/000341448.

Slater T. F. 1984. Free-radical mechanisms in tissue injury .*Biochem.J.* 222: 1-15.

Smith DM, CW Glennie, JB Harborne & CA Williams. 1977. Flavonoid diversification in the Polemoniaceae. *Biochem Syst. Ecol.* 5: 107-115.

Söhretoğlu D, Sabuncuoğlu S. 2012. Secondary metabolites, cytotoxic response by neutral red retention and protective effect against H₂O₂ induced cytotoxicity of *Sedum caespitosum*. *Nat Prod Commun.*7(1):39-40.

Solís PN, Wright CW, Anderson MM, Gupta MP, Phillipson JD. 1993. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina*. *Plant Med.* 59:250–252.

Song Y, Driessens N, Costa M, De Deken X, Detours V, Corvilain B, Maenhaut C, Miot F, Van Sande J, Many MC, Dumont JE. 2007. Roles of hydrogen peroxide in thyroid physiology and disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 92(10):3764-73.

Sorza ZLM, Valencia PGA, Mora AC. 2009. Manual de prácticas de Laboratorio de Farmacognosia. Universidad de Antioquía, pp.21-30.

Staroverov SA, Sidorkin VA, Fomin AS, Shchyogolev SY, Dykman LA. 2011 Biodynamic parameters of micellar diminazene in sheep erythrocytes and blood plasma. *Vet Sci.* 12(4):303-309.

Suffness, M, Pezzuto JM. 1990. Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann K (ed). *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity*, Vol. 6, Academic Press, London, pp. 71-133.

Sundaram S, Anjum S, Dwivedi P, Rai GK. 2011. Antioxidant activity and protective effect of banana peel against oxidative hemolysis of human erythrocyte at different stages of ripening. *Appl Biochem Biotechnol.*164(7):1192-206. doi: 10.1007/s12010-011-9205-3.

Thompson M, Williams CR, Elliot GE. 1976. Stability of flavonoid complexes of copper(II) and flavonoid antioxidant activity. *Anal Chim Acta.* 85(2):375-81.

Torrenegra R, Pedrozo J, Robles J, Waibel R, Achenbach H. 1992. Diterpenes from *Gnaphalium pellitum* and *Gnaphalium graveolens*. *Phytochemistry.*31: 2415–2418.

Torrenegra RD, Escarria RS, Dominguez XA. 1978. Flavonoids of *Gnaphalium pellitum*. *Revista Latinoamericana de Quimica.* 9: 101.

Trevor A, Katzung B, Masters S. 2004. (2004). *Katzung and Trevor's Pharmacology.* McGraw-Hill. New York, pp. 5-44.

Trubetskoy O. 2005. Highly miniaturized formats for in vitro drug metabolism assays using VividR fluorescent substrates and recombinant human cytochrome P450 enzymes. *J. Biomol. Screen.* 10:56-66

USP Pharmacists' Pharmacopeia. 2008-2009. 3 Supplement. Second Edition Copyright © 2009 The United States Pharmacopeial Convention, 7: 55-67.

Upkebor EE, Upkebor JE, Aigbokhan E, Goji I, Onojeghuo AO, Okonkwo AC. 2010. *Delonix regia* and *Casuarina equisetifolia* as passive biomonitors as bioaccumulators of atmospheric trace metals. *Environ Sci (China)*, 22(7):1073-9.

Varma SD, Devamanoharan PS. 1991. Hydrogen peroxide in human blood. *Free Radic Res Commun*.14(2):125-31.

Veciana Galindo C, Cortés Castell E, Torro Montell L, Sirvent Segura E, Rizo Baeza MM, Gil Guillén V. 2014. [Assessment of cytotoxicity and biosafety of polyphenolic extracts from olive pits]. *Nutr Hosp* 1:29 (6): 1388-93. doi: 10.3305/nh.2014.29.6.7141

Villagómez-Ibarra JR, Sánchez M, Espejo O, Armida Zúñiga-Estrada A, Torres-Valencia JM, Joseph-Nathan P. 2001. "Antimicrobial activity of three Mexican *Gnaphalium* species. *Fitoterapia*. 72: 692-694. doi:10.1016/S0367-326X(01)00303-3

Vito LA, Petenatti EM. 2009. Asteráceas de importancia económica y ambiental. Primera parte. Sinopsis morfológica y taxonómica, importancia ecológica y plantas de interés industrial. *Latin American Journal of Natural Resources* 18:87-115.

Wagner H, Blatt S. & Gainski J. 1984. "Plant Drug Analysis". Editorial Springer Verlag. Alemania, pp. 30, 36-38, 163-193.

Webert Kathryn E., James W. Smith, Donald M. Arnold, Howard H.W. Chan, Nancy M. Heddle, John G. Kelton. 2009. *Wintrobe's Clinical Hematology* 12 edition Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, USA. 22:632.

Wei-Min Zhang, Wu-Yang Huang, Wen-Xue Chen, Lin Han and Hai-De Zhang. 2014. Optimization of Extraction Conditions of Areca Seed Polyphenols and Evaluation of Their Antioxidant Activities. *Molecules*, 1: 16416-16427. doi:10.3390/molecules191016416.

Williams Lippincott & Wilkins. 2009. Wintrobe's Clinical Hematology 12 th Edition, Philadelphia, USA, pp. 156-166.

WHO 1998. Quality control methods for medicinal plants materials. Geneva, World Health Organization, pp. 13-65.

Wussow JR, Urbatsch LE, Sullivan GA 1985. *Calea* (Asteraceae) in Mexico, Central America, and Jamaica. - Syst. Bot. 10: 241 – 267.

Yagi K. 1998. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. Methods Mol Biol. 108:101-6. DOI:10.1385/0-89603-4772-0:101

Zamora – NF, Garcia LP, Ruíz LM, Ruíz MJ, Pedroza M, Muzquiz M. 2008. Composition of alkaloids in seeds of *Lupinus mexicanus* (Fabacea) and antifungal evaluation of the alkaloid extract. Proceedings 12th International Lupin Conference, pp 216-219.

Zandi K, Teoh BT, Sam SS, Wong PF, Mustafa MR, Abubakar S. 2011. Antiviral activity of four types of bioflavonoid against dengue virus type-2. Virol J 28; 8(1):560.

Zbidah M, Lupescu A, Herrmann T, Yang W, Foller M, Jilani K, Lang F. 2013. Effect of honokiol on erythrocytes. Toxicol In Vitro. 27(6):1737-45. doi: 10.1016/j.tiv.2013.05.003.

Zbikowska HM, Antosik A, Szejka M, Bijak M, Olejnik AK, Saluk J, Nowak P. 2014. Does quercetin protect human red blood cell membranes against γ -irradiation? Redox Rep. 19(2):65-71. doi: 10.1179/1351000213Y.0000000074.

Zhou M, Diwu Z, Panchuk-Voloshina N, Haugland RP. 1997. A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Anal Biochem.* 15;253(2):162-8.

12. RESUMEN BIOGRÁFICO

Ma. Guadalupe Ernestina González Yáñez

Candidata para el grado de

Doctor en Ciencias con acentuación en Química de Productos Naturales

Tesis: EFECTO TÓXICO IN VIVO E IN VITRO DE LOS EXTRACTOS POLARES DE NUEVE PLANTAS UTILIZADAS EN MEDICINA TRADICIONAL

Campo de estudio: Química de Productos Naturales

Datos personales: Nacida en Miguel Auza, Zacatecas el 26 de Febrero de 1962, hija de Ventura Yáñez Martínez y Alejandro González Macías.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Zacatecas, grado obtenido Químico Farmacéutico Biólogo en 1985 con un promedio de 9.22 Universidad Juárez del Estado de Durango, grado obtenido Maestro en Bioquímica Clínica en 2008 con un promedio de 10.0

Experiencia profesional: Maestra de hora semana/mes de la Universidad Juárez del Estado de Durango. Estudiante de Idioma Inglés en; UAZ, UA de C, CUAAL-UJED. Cátedras impartidas en el Instituto Mexicano de Estudios Superiores: Nutrición; Problemas Biológicos, Físico Química, Química de los Alimentos, Seminario de Salud Pública, Seminario de Fisiología y Patología; U A de C: Métodos de Inducción para sustentantes de la carrera de Medicina; Universidad Juárez del Estado de Durango-FCQ: Hematología clínica, Inmunología, Histología, Microbiología, Diseño de anteproyectos de Investigación, Análisis y recolección de

datos, Análisis bioquímico Clínico, Química Legal y Forense. ISSSTE: Cursos impartidos y talleres de enseñanza continua, Hematología Médica Clínica, Enfermedades Crónico Degenerativas, Microbiología médica, Enfermedades de Transmisión sexual, Métodos Clínicos, Inmunología. Expositora Oral y cartel en Congresos Locales y Nacionales e internacional. Asistente en diplomados/cursos local, Nacional e Internacional. Autora de Manual de Prácticas en Inmunología, Microbiología, Hematología, Histología. Autora de Memorias en Inmunología. Autoría de Artículos Científicos. Consejero Suplente ante El Honorable Consejo Consultivo de UJED-FCQ. Presidenta de Academia de Investigación, Presidenta del Comité de Ética e Investigación en UJED-FCQ. Jurado Científico en presentaciones de cartel/oral-ISSSTE-México. Integrante Nacional del Comité de ética e Investigación –ISSSTE-México. Integrante de Comité Editorial de la Revista Especialidades Médico Quirúrgicas-ISSSTE-México. Miembro activo de CONAQUIC, Comité de Infecciones Nosocomiales (CODECIN), Unidad de Vigilancia epidemiológica Hospitalaria (UVEH). Directora de tesis, revisora/sinodal y Tutora.