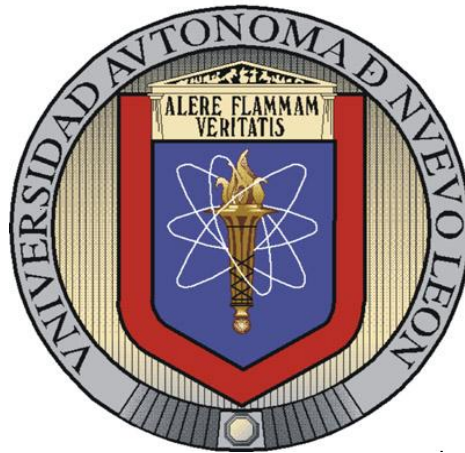


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



**ACTIVIDAD HIPOCOLESTEROLÉMICA DE PLANTAS DE
USO ETNOBOTÁNICO EN MÉXICO.**

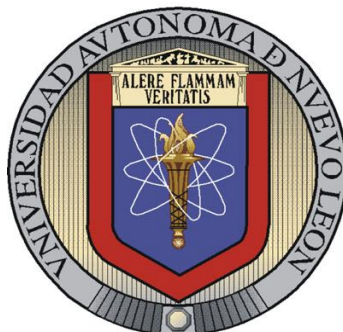
Por

LYLIA GRACIELA MIRANDA VELÁSQUEZ

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS, con acentuación
en Química de Productos Naturales**

Diciembre, 2010

**ACTIVIDAD HIPOCOLESTEROLÉMICA DE PLANTAS DE USO
ETNOBOTÁNICO EN MÉXICO.**



Comité de Tesis:

Presidente: Dra. Azucena Oranday Cárdenas

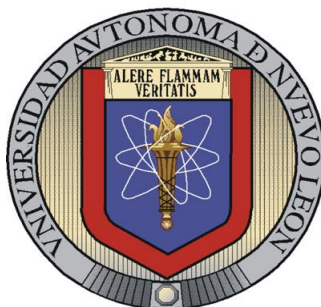
Secretario: Dr. Abelardo Chávez Montes

Vocal: Dra. Delia Elva Cruz Vega

Vocal: Dra. Catalina Rivas Morales

Vocal: Dra. María Julia Verde Star

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



ACTIVIDAD HIPOCOLESTEROLÉMICA DE PLANTAS DE USO ETNOBOTÁNICO EN MÉXICO.

Por

LYLIA GRACIELA MIRANDA VELÁSQUEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS
Con acentuación en Química de Productos Naturales

Este trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Química de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L. y en la División de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS, Monterrey N.L. bajo la dirección de:

Dra. Azucena Oranday Cárdenas
Director Interno

Dra. Delia Elva Cruz Vega
Director Externo

Para la realización de este trabajo de investigación se obtuvo apoyo del
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología: No. Becario 187994

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Delia Elva Cruz Vega por sus conocimientos, dedicación, paciencia, tolerancia y amistad demostrados hacia mi persona en todo este tiempo.

A la Dra. Azucena Oranday Cárdenas y Dra. Catalina Rivas Morales porque fueron quienes me animaron a continuar por el camino de la superación académica, por sus atinados comentarios y por el ejemplo de trabajo que siempre han mostrado.

A la Dra. María Julia Verde Star por sus comentarios en la revisión de la tesis y por su amistad y agradable convivencia en el departamento de Química.

Al Dr. Abelardo Chávez Montes por su amistad, sus atinados comentarios en la revisión del escrito, por el montaje de la técnica en ratones y su compañerismo.

Al M.C. Héctor Gerardo Lozano Garza por todas las horas dedicadas a ayudarme en el manejo y cuidado de los animales de laboratorio, porque sin su ayuda el avance del trabajo hubiera sido lento, por su plática tan amena y sobre todo por sacrificar horas en fines de semana para lograr los objetivos de esta tesis.

A la QBP Mireya Villanueva Cuéllar por su buena disposición para la realización de la lectura de las muestras

A mis queridos amigos y compañeros de trabajo que de una u otra forma hemos estado unidos a través de los años, por ser parte de mi historia en esta Facultad.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado para la realización de la presente investigación, número de becario: 187994

Cualesquiera que hayan sido nuestros logros, alguien nos ayudó siempre a alcanzarlos. **Althea Gibson**

DEDICATORIA

A mi esposo: Luis Mario Sánchez Gutiérrez por su amor, apoyo, comprensión, ayuda, por ser una persona tan luchona e inteligente y sobre todo por estar a mi lado en todo momento.

A mis hijos: Luis Mario, Lilia Alejandra y Víctor Raúl quienes son el motor de mi vida y a los cuales agradezco se hayan acostumbrado al ir y venir de su madre para alcanzar una meta más, que les sirva de ejemplo de que nunca es tarde cuando se quiere lograr algo.

A mis padres, Raúl Miranda L. y Victoria Velásquez S. †, por su ejemplo de superación, estudio, inteligencia y amor a la vida.

A mis hermanos: Carmen, Martha, Patricia, Velia, Leticia y Raúl, porque sigamos unidos fraternalmente aunque la distancia sea grande.

La familia es la única comunidad en la que todo hombre es amado por sí mismo, por lo que es y no por lo que tiene.
Juan Pablo II

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
LISTA DE TABLAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
NOMENCLATURA	iv
1. RESUMEN	1
1.1 ABSTRACT	2
2. INTRODUCCIÓN	3
3. HIPÓTESIS	5
4. OBJETIVOS	6
4.1 Objetivo general	6
4.2 Objetivos particulares	6
5. ANTECEDENTES	7
5.1 Colesterol	7
5.1.1 Síntesis del colesterol	9
5.1.2 Transporte del colesterol	12
5.2 Aterosclerosis	14
5.2.1 Causas de la aterosclerosis	17
5.3 Tratamiento para la hipercolesterolemia	17
5.3.1 Fármacos de patente	17
5.3.1.1 Inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A Reductasa	19
5.3.1.2 Efectos adversos e interacciones farmacológicas	20
5.4 Plantas con actividad hipocolesterolémica	21
5.4.1. Plantas que actúan sobre la biosíntesis del colesterol	25
5.4.2 Descripción de las plantas utilizadas en el estudio	26
6. MÉTODOS	34
6.1 Material biológico	34
6.2 Estrategia de trabajo realizada	35
6.3 Colecta de plantas	36
6.4 Obtención de los extractos	36
6.5 Determinación de la actividad tóxica de los extractos con el Ensayo BSLA	36
6.5.1 Eclosión de huevecillos de <i>Artemia. salina</i>	36
6.5.2 Ensayo de Letalidad de <i>A. salina</i>	37
6.6 Ensayo <i>in vivo</i> de la actividad hipocolesterolémica de los	38

extractos	
6.7 Ensayo <i>in vitro</i> de la actividad hipocolesterolémica de los extractos	38
6.7.1 Descongelación de la línea celular Vero	38
6.7.2 Mantenimiento de las líneas celulares	39
6.7.3 Resiembra de células	39
6.7.4 Determinación de la viabilidad celular con WST-1	39
6.7.5 Determinación de la inhibición de la HMG-CoA reductasa	40
6.8 Pruebas coloridas para identificación de metabolitos	40
7. RESULTADOS	43
7.1 Obtención de extractos	43
7.2 Evaluación de la toxicidad en <i>A. salina</i> (BSLA)	44
7.3 Ensayo <i>in vivo</i> de la actividad hipocolesterolémica de los extractos	44
7.3.1 Extractos disueltos en agua	44
7.3.2 Extractos disueltos en Tween 80/ sol salina	46
7.4 Ensayo <i>in vitro</i> de la actividad hipocolesterolémica de los extractos	47
7.4.1 Determinación de inhibición de HMG-CoA reductasa	50
7.5 Determinación de grupos funcionales	51
8. DISCUSIÓN	53
9. CONCLUSIONES	59
10. LITERATURA CITADA	60

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Propiedades de las principales clases de lipoproteínas plasmáticas humanas.....	13
II	Contenido de apolipoproteínas asociado a las lipoproteínas...	14
III	Principales causas de mortalidad en México.....	16
IV	Rendimiento de los doce extractos obtenidos.....	43
V	Toxicidad de los extractos sobre <i>Artemia salina</i>	44
VI	Actividad hipocolesterolémica de extractos metanólicos y etanólicos.....	47
VII	Grupos funcionales presentes en los extractos obtenidos.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Colesterol.....	7
2	Reacción limitante en la síntesis del colesterol.....	9
3	Aterosclerosis.....	15
4	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A.....	19
5	Inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa.....	20
6	Fotografía de <i>T. officinale</i>	27
7	Fotografía de <i>E. heterophyllum</i>	29
8	Fotografía de <i>C. chayamansa</i>	30
9	Fotografía de <i>O. europaea</i>	32
10	Concentración de colesterol en grupos control (vehículo H ₂ O)....	45
11	Actividad hipocolesterolémica de extractos disueltos en agua.....	45
12	Concentración de colesterol en grupos control (vehículo tween 80/ solución salina.....	46
13	Efecto del extracto acuoso de <i>C. chayamansa</i> sobre el crecimiento de células Vero.....	48
14	Efecto citotóxico del extracto acuoso de <i>C. chayamansa</i> sobre células Vero.....	48
15	Efecto del extracto acuoso de <i>E. heterophyllum</i> sobre el crecimiento de células Vero.....	49
16	Efecto citotóxico del Extracto acuoso de <i>E. heterophyllum</i> sobre células Vero.....	49

17	Efecto de la pravastatina y del mevalonato sobre el crecimiento de células Vero.....	50
18	Efecto citotóxico de la Pravastatina 100 μ M sobre el crecimiento células Vero así como la reversión del mismo al adicionar mevalonato.....	50
19	Efecto de la combinación de <i>E. heterophyllum</i> más mevalonato sobre crecimiento de células Vero.....	51

NOMENCLATURAS

BSLA	Brine Shrimp Lethal Assay
°C	grados centígrados
C. ch.	<i>Cnidoscopus chayamansa</i>
CCl₄	tetracloruro de carbono
cm	centímetros
DL₅₀	dosis letal media
dL	decilitros
DMSO	dimetil sulfóxido
E.h.	<i>Eryngium heterophyllum</i>
g	gramos
h	horas
HDL	lipoproteínas de alta densidad
HMG-Co A	Hidroximetil-glutaril-coenzima A
INI	Instituto Nacional Indigenista
IDL	lipoproteínas de densidad intermedia
kg	kilogramos
L	litros
LDL	lipoproteínas de baja densidad
mg	miligramos
mL	mililitros
mM	milimolar
nm	nanómetros
O.e.	<i>Olea europaea</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	buffer de fosfatos salino
ppm	partes por millón
Prav.	pravastatina

rpm	revoluciones por minuto
T.o.	<i>Taraxacum officinale</i>
U	unidades internacionales
VLDL	lipoproteínas de muy baja densidad
µg	microgramos
µL	microlitros
µM	micromolar

1. RESUMEN

El número de personas cuyo nivel de colesterol en sangre excede de los niveles normales se ha incrementado considerablemente en los últimos años. Las enfermedades cardiovasculares se consideran como la primera causa de muerte, la Organización Mundial de la Salud reporta que 3.8 millones de hombres y 3.4 millones de mujeres mueren cada año en todo el mundo debido a enfermedades cardiovasculares. A pesar de los tratamientos existentes es una problemática que ha ido en aumento, por eso nos propusimos con este estudio evaluar el efecto hipocolesterolémico de plantas reportadas en la herbolaria tradicional, para que sean utilizadas en combinación con una dieta adecuada como una alternativa en el tratamiento de ésta enfermedad. Las plantas utilizadas fueron *Eryngium heterophyllum* y las hojas de *Olea europaea*, *Taraxacum officinale* y *Cnidioscolus chayamansa*. Se obtuvieron extractos etanólico y metanólico por agitación durante 4 días a temperatura ambiente y acuoso mediante la técnica de infusión, después de evaporados los solventes orgánicos y liofilizado el extracto acuoso, se pesaron para determinar el rendimiento. En total se obtuvieron 12 extractos los cuales fueron evaluados mediante el Ensayo de Letalidad en *Artemia salina* (BSLA) resultando solamente tóxico el extracto metanólico de *O. europaea* con una $DL_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$. En el ensayo de la actividad hipocolesterolémica *in vivo* se administraron los extractos crudos disueltos en agua o en una solución tween 80/solución salina a dos dosis 50 y 100 mg/Kg de peso a ratones hipercolesterolémicos, esto se hizo durante 5 días, al término de este período se mantuvieron en ayuno de 12 horas; posteriormente se obtuvieron muestras de sangre para determinar colesterol en suero. De los resultados obtenidos solamente los extractos acuosos de *E. heterophyllum* a 100 mg/kg y de *C. chayamansa* a 50 y 100 mg/kg mostraron una reducción del colesterol de 20.7, 27.9 y 31.1 % respectivamente cuando se les comparó con el control hipercolesterolémico. Por consiguiente estos dos extractos se evaluaron en un modelo *in vitro* utilizando células Vero para determinar si la disminución del colesterol se realiza de la misma manera que los fármacos estatinas, es decir inhibiendo a la enzima HMG-CoA reductasa; encontrando que en el extracto acuoso de *C. chayamansa* la disminución del colesterol no es por este mecanismo y con el extracto acuoso de *E. heterophyllum* podemos concluir que el mecanismo es similar al de los fármacos mencionados. Los resultados de las reacciones químicas para la detección de metabolitos secundarios sugieren la presencia de los siguientes tipos de compuestos en los extractos: alcaloides en los tres extractos de *T. officinale*, en el acuoso de *E. heterophyllum*, en el acuoso y etanólico de *C. chayamansa* y en el acuoso de *Olea europaea*, cumarinas solamente en el extracto acuoso y metanólico de *E. heterophyllum*, esteroides en el extracto etanólico y metanólico de *T. officinale* y en el metanólico de *O. europaea*, oxhidrilos fenólicos en todos los extractos excepto el etanólico y metanólico de *E. heterophyllum* y acuoso de *C. chayamansa*, cabe mencionar que todos estos metabolitos han sido reportados con esta actividad para otras plantas.

1.1 Abstract

The number of people whose blood cholesterol level exceeds normal levels has increased considerably in recent years. Cardiovascular diseases are considered the leading cause of death; the World Health Organization reports that 3.8 million men and 3.4 million women die each year worldwide due to cardiovascular disease. Although existing treatments is a problem that has been growing, so we proposed this study to evaluate the hypocholesterolemic effect of plants reported in traditional herbal medicine, to be used in combination with a proper diet as an alternative in the treatment of the disease. The plants used were *Eryngium heterophyllum* and leaves of *Olea europaea*, *Taraxacum officinale* and *Cnidioscolus chayamansa*. Extracts were obtained from ethanol and methanol by stirring for 4 days at room temperature and aqueous using the technique of infusion, after the organic solvents evaporated and freeze-dried aqueous extract, were weighed to determine performance. In total, got 12 extracts were evaluated by lethal tests in *Artemia salina* (BSLA) resulting toxic only the methanol extract of *O. europaea* with an $LD_{50} < 100 \mu\text{g} / \text{mL}$. In testing the *in vivo* hypocholesterolemic activity of crude extracts were administered dissolved in water or tween 80/saline solution, two doses, 50 and 100 mg / kg were tested in hypercholesterolemic mice, this was done for 5 days, after of this period were kept fasting for 12 hours thereafter blood samples were obtained to determine serum cholesterol. From the results obtained only the aqueous extracts of *E. heterophyllum* to 100 mg / kg and *C. chayamansa* at 50 and 100 mg / kg showed a cholesterol reduction of 20.7, 27.9 and 31.1% respectively when compared with the hypercholesterolemic control. Therefore these two extracts were evaluated in an *in vitro* model using Vero cells to determine if the decrease of cholesterol performed in the same way that statin drugs, that is inhibiting the enzyme HMG-CoA reductase; finding that in the aqueous extract of *C. chayamansa* lowering cholesterol is by this mechanism and with the aqueous extract of *E. heterophyllum* we conclude that the mechanism is similar to the aforementioned drugs. The results of chemical reactions for the detection of secondary metabolites suggest the presence of the following types of compounds in the extracts: alkaloids in all three extracts of *T. officinale*, in the aqueous *E. heterophyllum* in the aqueous and ethanolic *C. chayamansa* and the aqueous *Olea europaea*, coumarins only in the aqueous and methanol extract of *E. heterophyllum*, sterols in ethanol and methanol extract of *T. officinale* and methanolic of *O. europaea*, phenolic hydroxyl in all extracts except ethanolic and methanolic extracts from *E. heterophyllum* and aqueous from *C. chayamansa* worth mentioning that all these metabolites have been reported with this activity to other plants.

2. INTRODUCCIÓN

La fitoterapia es la utilización de plantas o partes de ellas con fines terapéuticos y ha sido utilizada por los animales y el propio hombre desde la prehistoria. De hecho la mayor parte de los fármacos actuales están basados en los principios activos de las plantas.

Se denomina principio activo a toda sustancia dotada de actividad farmacológica, estos suelen ser metabolitos secundarios de la planta, es decir, que no son fundamentales para ella (suele tratarse de sustancias de reserva, productos para repeler o atraer a los insectos para la polinización).

Todo vegetal provisto de principios activos con una actividad farmacológica que puede ser aprovechada desde el punto de vista terapéutico, es considerado como una planta medicinal (DSalud, 2006).

Desde tiempos remotos es conocido que las plantas presentan propiedades curativas para una infinidad de padecimientos, y aunque pareciera que la curación a base de plantas ha pasado a la historia, ésta sigue siendo una importante fuente de salud en zonas rurales, especialmente en países en desarrollo como México.

Por otro lado, el aumento de hierberías y comercios que expenden este tipo de productos en las zonas urbanas nos hace preguntarnos si en realidad esta forma tradicional de curación está pasando a la historia. Más del 60 % de la población mundial sigue en nuestros días dependiendo de esta forma de recuperación de la salud (González, 1998).

De los fármacos oficiales de patente que se expenden actualmente, cerca del 50 % proviene de productos vegetales, el resto lo constituyen productos sintéticos (González, 1998). Sin embargo, de muchas de las plantas solo se tiene un conocimiento empírico por lo que su estudio contribuye grandemente al conocimiento de su mecanismo de acción así como también a especificar si el beneficio atribuido es real.

La enfermedad coronaria continúa siendo la principal causa de muerte en los países desarrollados, la reducción de la concentración de LDL-colesterol es la estrategia primaria para disminuir el riesgo de enfermedad coronaria.

Las estatinas son fármacos que proporcionan una terapia efectiva para disminuir el colesterol y son ampliamente utilizadas, pero son caras y causan efectos secundarios, por esto se busca una estrategia en las cuales se recomiende la ingesta de algunos componentes específicos de las plantas que son agentes efectivos en la disminución del colesterol (Carr *et al.*, 2005).

La organización mundial de la salud reporta que 3.8 millones de hombres y 3.4 millones de mujeres mueren cada año en todo el mundo debido a enfermedades coronarias (Bose *et al.*, 2007).

Dado que ésta es una problemática que ha ido en aumento a pesar de los tratamientos oficiales ya establecidos, propusimos con este estudio evaluar la actividad hipocolesterolémica de plantas reportadas en la herbolaria tradicional, para que sean utilizadas en combinación con una dieta adecuada como una alternativa en el tratamiento de ésta enfermedad.

3. HIPÓTESIS

Los extractos de *Taraxacum officinale*, *Eryngium heterophyllum*, *Cnidioscolus chayamansa* y *Olea europaea*, presentan actividad hipocolesterolémica.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Determinar *in vivo* e *in vitro* la actividad hipocolesterolémica de extractos obtenidos de *Taraxacum officinale*, *Eryngium heterophyllum*, *Cnidioscolus chayamansa* y *Olea europaea*, reportadas en la literatura etnobotánica con esta actividad.

4.2 Objetivos particulares

- Obtener extractos acuosos, etanólicos y metanólicos de las plantas en estudio.
- Determinar la toxicidad de los extractos sobre *Artemia salina*.
- Evaluar la efectividad de los extractos para disminuir el colesterol en ratones BALB/c machos (*in vivo*).
- Determinar la efectividad de los extractos para inhibir la HMG-CoA reductasa en células Vero (*in vitro*).
- Identificar parcialmente los grupos funcionales y metabolitos secundarios por medio de reacciones químicas específicas de los extractos.

5. ANTECEDENTES

5.1 Colesterol

Es el lípido natural más conocido, su notoriedad es debida a la fuerte correlación entre sus niveles elevados en sangre y la incidencia de enfermedades cardiovasculares en el ser humano. Es una molécula esencial en muchos animales, incluido el hombre, pero no es necesario en la dieta de los mamíferos porque todas las células pueden sintetizarlo a partir de precursores sencillos (DSalud, 2006; Nelson *et al.*, 2005).

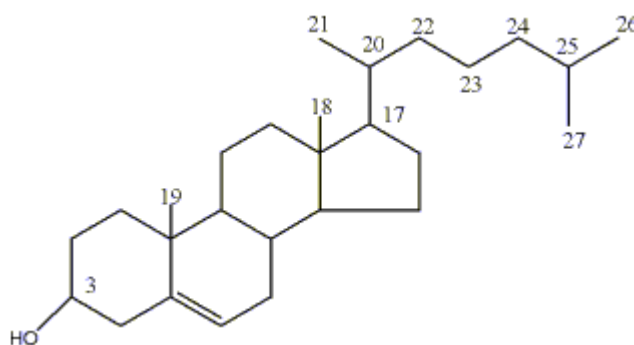


Fig. 1 Colesterol

El colesterol es un compuesto alicíclico cuya estructura comprende:

- El núcleo del ciclopentanoperhidrofenantreno, con sus 4 anillos fusionados
- Un solo grupo hidroxilo en la posición C-3
- Un centro insaturado entre los átomos de carbono 5 y 6

- Una cadena hidrocarbonada ramificada de ocho carbonos y unida al anillo D en la posición 17
- Un grupo metilo (designado C-19) unido a la posición 10 y otro grupo metilo (designado C-18) unido la posición 13.

El colesterol es un lípido, muy poco soluble en agua: a 25 °C, el límite de solubilidad es de aproximadamente 0.2 mg/100 mL. Su concentración en el plasma de los individuos sanos es normalmente de 150 a 200 mg/100 mL. La elevada solubilidad del colesterol en la sangre se debe a la presencia de las lipoproteínas plasmáticas, que tienen la capacidad de fijar y por lo tanto solubilizar, grandes cantidades de colesterol. De hecho, solo aproximadamente un 30 % del colesterol plasmático total se encuentra libre, aproximadamente un 70 % del colesterol de las lipoproteínas plasmáticas se encuentra en forma de ésteres del colesterol, en los que algún ácido graso de cadena larga, normalmente linoléico, se halla unido mediante un enlace éster al grupo OH del carbono-3 del anillo A. La presencia del residuo de ácido graso de cadena larga incrementa la hidrofobicidad del colesterol (Campbell *et al.*, 2004).

Además, es un esteroide representativo y un componente de la estructura de las membranas de todas las células de mamíferos así como la sustancia principal del cerebro y de las células nerviosas (Sang-Woo *et al.*, 2003). También se encuentra en altas concentraciones en las glándulas suprarrenales y en el hígado; es necesario para el crecimiento y la viabilidad de los organismos superiores. El colesterol es un intermediario clave en la biosíntesis de un número importante de esteroides, incluyendo los ácidos biliares, hormonas adrenocorticales y hormonas sexuales (estrógenos, testosterona y progesterona); su participación en la fertilidad humana está en estudio (Mahan *et al.*, 1998; Phil-Sun *et al.*, 2006).

5.1.1 Síntesis del colesterol

El primer paso es la formación de isopentenilpirofosfato a partir de acetil-CoA. Este conjunto de reacciones se inician con la formación de 3-hidroxi-3-metilglutaril-Co-A a partir de Acetil-CoA y acetoacetyl-CoA. Uno de los destinos del 3-hidroxi-3-metilglutaril-Co-A (HMG-CoA) es la reducción a mevalonato, la síntesis de éste último es *la etapa limitante en la formación de colesterol*, (Fig. 2).

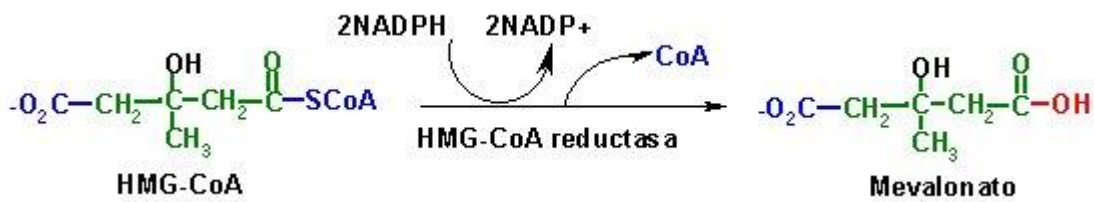
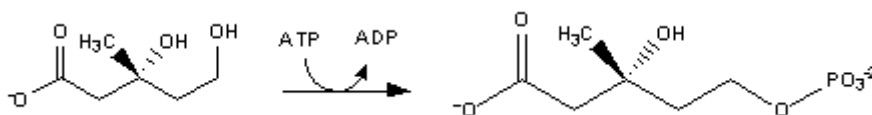


Fig. 2 Reacción limitante en la síntesis del colesterol

La enzima que cataliza este paso irreversible, la 3-hidroxi-3-metilglutaril-Co-A reductasa, es un importante punto de control en la biosíntesis de colesterol.

El mevalonato posteriormente se convierte en isopentenilpirofosfato y éste a su vez en escualeno y por último en colesterol. La cascada de reacciones se muestra a continuación (Bioquímico, 2002; Nelson *et al.*, 2005).

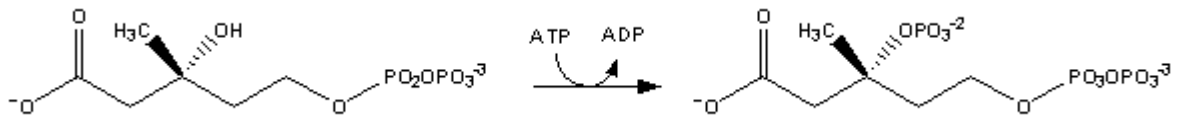
➤ Fosforilación del mevalonato



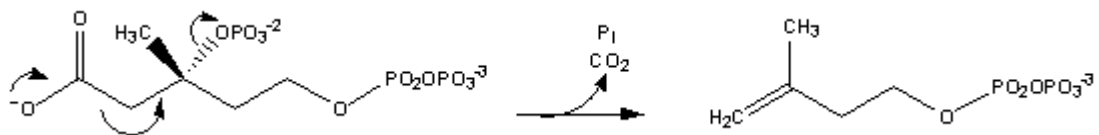
➤ Fosforilación del mevalonato 5-fosfato



➤ Fosforilación del 5-pirofosfomevalonato



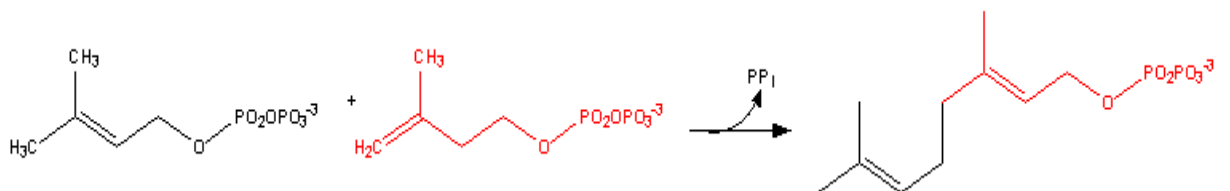
➤ Descarboxilación del 3-fosfomevalonato 5-pirofosfato



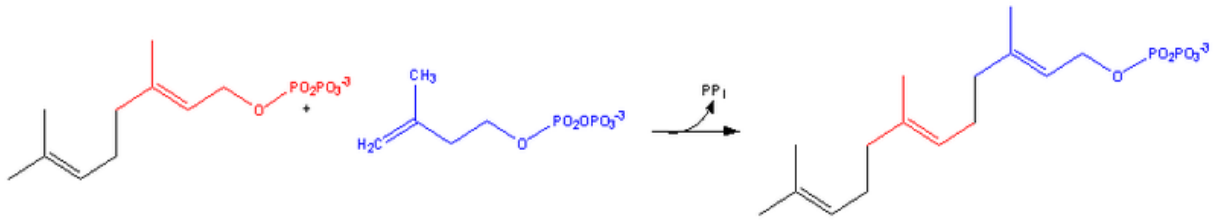
➤ Isomerización del isopentil pirofosfato



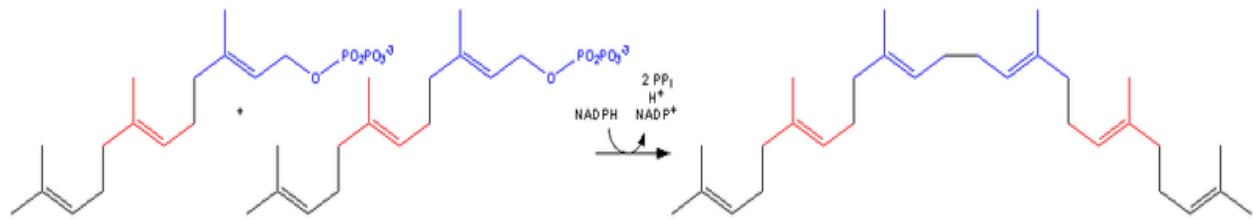
➤ Condensación de 3,3-dimetilalil pirofosfato (5C) e isopentil pirofosfato (5C)



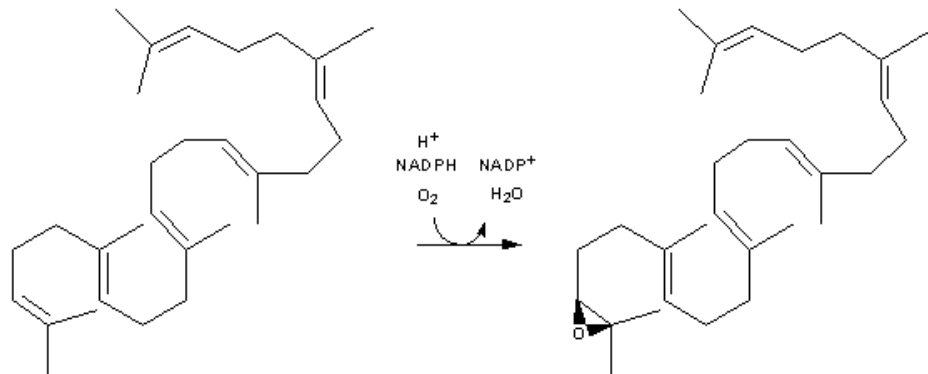
- Condensación de geranyl pirofosfato (10C) e isopentil pirofosfato (5C)



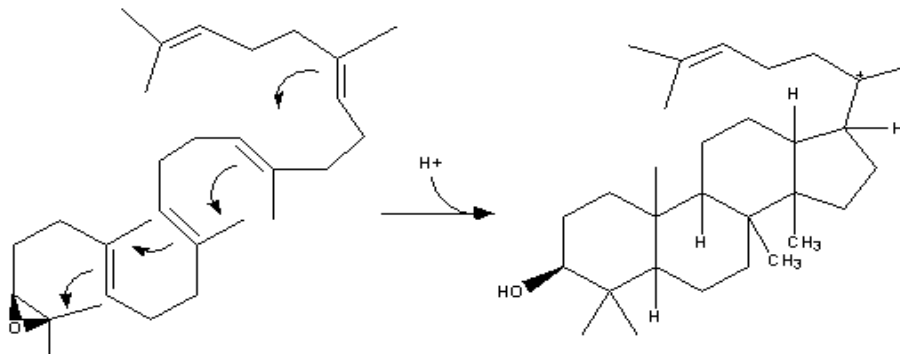
- Condensación de dos moléculas de farnesil pirofosfato (15C)



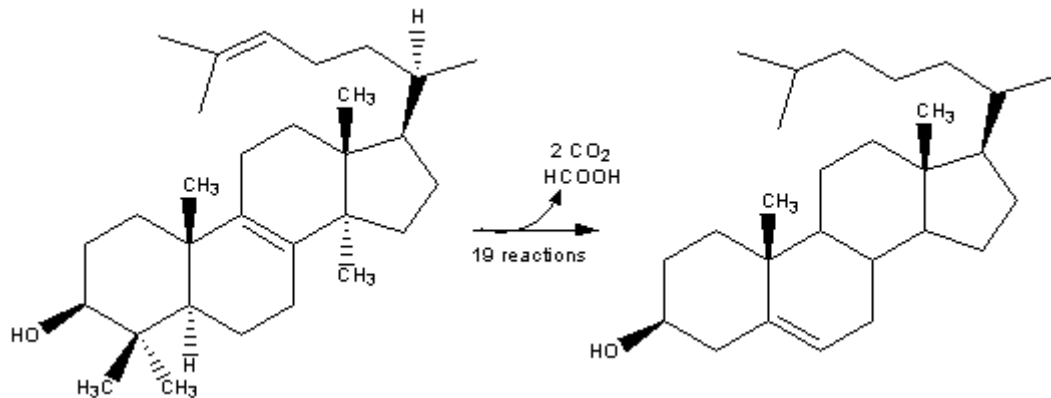
- Reducción del escualeno por el NADPH, que gana un oxígeno que proviene del oxígeno molecular (O₂)



- Ciclación del escualeno 2,3-epóxido



- Transformación del lanosterol en **colesterol**, a través de diversos intermediarios, entre los que destacan el zimosterol y el 7-deshidrocolesterol



Cerca del 70 % del colesterol total en los individuos es de origen endógeno, de manera que una forma efectiva de disminuir los niveles de colesterol plasmático es inhibiendo la síntesis del mismo por un bloqueo selectivo de esta ruta biosintética, (Menéndez *et al.*, 2001). Los inhibidores de la HMG-CoA reductasa tales como lovastatina, simvastatina, pravastatina, fluvastatina y atorvastatina han sido introducidos como una nueva clase de medicamentos y han tenido una profunda influencia sobre los lípidos plasmáticos (Chang *et al.*, 2001).

5.1.2 Transporte del colesterol (lipoproteínas)

Las lipoproteínas son partículas esféricas con los lípidos menos polares, como triglicéridos y ésteres del colesterol contenidos en el centro hidrófobo; los lípidos más polares, como los fosfolípidos y el colesterol libre, forman una monocapa superficial junto con las apolipoproteínas anfipáticas. Cada lipoproteína contiene una o más apolipoproteínas, que proporcionan estabilidad estructural, sirven como ligandos para receptores celulares que determinan el destino metabólico de partículas individuales, o actúan como cofactores para enzimas comprendidas en el metabolismo de las lipoproteínas. En la tabla I se enlistan las diferentes clases de

lipoproteínas, que difieren entre sí en cuanto a la densidad y composición de lípidos (Nelson *et al.*, 2005). El contenido de apolipoproteínas se enlista en la tabla II (Gotto *et al.*, 2000).

Cada lipoproteína puede considerarse que posee una participación en el transporte de lípidos sintetizados de manera endógena o en el transporte de lípidos exógenos. Las lipoproteínas que contienen apoB-100 (de muy baja densidad, de densidad intermedia, de baja densidad) transportan lípidos endógenos desde el hígado hacia los tejidos no hepáticos, en tanto que los quilomicrones transportan lípidos de la dieta desde el intestino hacia el tejido periférico y hepático. Las lipoproteínas que contienen apoA (de alta densidad) ayudan a la transferencia de lípidos entre lipoproteínas y ayudan a transportar el colesterol de regreso al hígado desde los tejidos periféricos (Hardman *et al.*, 1996).

Tabla I Propiedades de las principales clases de lipoproteínas plasmáticas humanas

	Quilomicrones	VLDL	LDL	HDL
Densidad (g/ml)	<0.95	0.950-1.006	1.019-1.063	1.063-1.210
Proteínas	2	8	22	40-55
Triacilgliceroles	86	55	6	4
Colesterol libre	2	7	8	4
Esteres del colesterol	3	12	42	12-20
Fosfolípidos	7	18	22	25-30

Tabla II Contenido de apolipoproteínas asociado a las lipoproteínas

<i>APO</i>	<i>Lipoproteína asociada</i>	<i>Sitio de síntesis</i>	<i>Función principal</i>
A-I	HDL	Hígado, intestino	Activador de LCAT, transporte en reversa del colesterol
B-48	Quilomicrones	Intestino	Secreción de quilomicrones, ligando de receptores
E-2,4	Quilomicrones HDL, VLDL	Hígado	Ligando de receptores
B-100	VLDL, IDL, LDL	Hígado	Ligando de receptores, secreción de VLDL
C-I, CII	Quilomicrones HDL, VLDL	Hígado	Cofactor de LCAT

5.2 Aterosclerosis

La arteriosclerosis (Fig. 3), término creado por Lobstein en 1829, comprende cualquier lesión que afecte a las arterias, como son la aterosclerosis, el ateroma y la arteriosclerosis.

La aterosclerosis fue definida por la OMS en el año de 1957 como una afección caracterizada por la asociación variable de formaciones en la íntima de las arterias grandes y medianas, que consisten en una acumulación focal de lípidos, glúcidos complejos, sangre y productos sanguíneos, tejido fibroso y depósitos calcáreos, todo ello acompañado de modificaciones de la media (Cervera *et al.*, 1999).

Refiriéndose a estos términos (arteriosclerosis y aterosclerosis) Balaguer Vintró dice: actualmente se aceptan como sinónimos para la enfermedad arterial, y el nombre de ateroma para cada lesión concreta. La principal complicación de la arteriosclerosis es esencialmente la insuficiencia circulatoria, debida a un

estrechamiento de la luz arterial o también a que la circulación se hace más lenta, lo que es debido a menudo a fenómenos como la trombosis, que obstaculiza la luz arterial; en la aorta pueden producirse aneurismas y hemorragias (Mahan *et al.*, 1998).

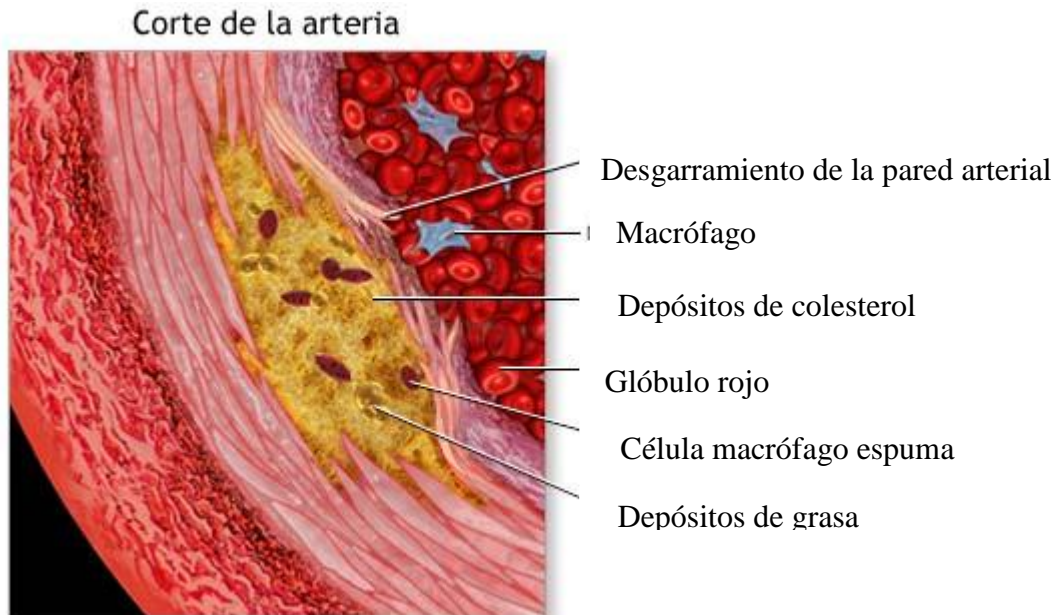


Fig. 3 Aterosclerosis

Las enfermedades aterosclerosas son desde hace muchos años el principal flagelo epidémico que enfrentan los países desarrollados y de crecimiento medio como México, los cambios patológicos son de muy lenta evolución, pues comienzan en la niñez y pubertad, no dan lugar a síntomas durante largos años y en general se manifiestan después de los 40 años. Las complicaciones finales de la enfermedad dan lugar a catástrofes clínicas como el infarto del miocardio, el evento cerebro-vascular; condiciones mortales o incapacitantes que afectan a muchos individuos en las etapas más productivas de la vida.

Conforme aumenta la prevalencia de los factores etiopatogénicos en una comunidad, no sólo se observa un mayor número de personas con estos

padecimientos sino también una mayor proporción de pacientes jóvenes. En los países industrializados y a medida que el nivel de vida ha ido aumentando, se ha podido comprobar un incremento considerable en la mortalidad por padecimientos cardiovasculares debida principalmente a la lesión de las arterias coronarias.

Asimismo, se ha visto que la mortalidad es mucho más elevada en algunos países, como el Reino Unido y Estados Unidos, de ahí que la excesiva cantidad de colesterol de la dieta necesita ser reducida, ya que la mínima cantidad que el cuerpo necesita es elaborada por el mismo (Sang-Woo *et al.*, 2003 ; Carr *et al.*, 2005).

En la tabla III se muestran las principales causas de mortalidad, en México las enfermedades cardiovasculares se han consolidado como la primera causa de muerte (INEGI, 2006) y es una problemática que ha incrementado a pesar de los tratamientos oficiales establecidos.

Tabla III Principales causas de mortalidad en México.

Orden de Importancia	Causas	Clave Lista Mexicana	Defunciones
	TOTAL	[01-E59]	18,655 a/
1	ENFERMEDADES DEL CORAZÓN b/	[26-29]	3,831
	Enfermedades isquémicas del corazón	[28]	2,821
2	TUMORES MALIGNOS	[08-15]	2,831
	De la tráquea, de los bronquios y del pulmón	[10B]	424
	De la mama	[11D]	238
	Del hígado y de las vías biliares intrahepáticas	[09F]	198
3	DIABETES MELLITUS	[20D]	2,375
4	ENFERMEDADES CEREBROVASCULARES	[30]	1,207
5	ACCIDENTES	[E49-E53, E57-E58]	1,207

5.2.1 Causas de la aterosclerosis

La enfermedad cardiovascular es una enfermedad compleja y multifactorial, los estudios epidemiológicos han demostrado que existen varias causas, entre las que destacan:

- Causas genéticas, como son las enfermedades del metabolismo lipídico y la capacidad de defensa de la pared de la arteria entre otras
- Patologías en las que la aterosclerosis es frecuente, como la diabetes, hipertensión, obesidad y otras.
- Factores ligados al medio y al *modus vivendi* , como el sedentarismo y el estrés.
- El tabaquismo tiene un especial relieve como factor de riesgo
- Concentraciones elevadas de colesterol y (quizá) triglicéridos en sangre
- Factores dietéticos; existen dos factores causantes del desarrollo de la aterosclerosis
 - a).- El aumento de colesterol, que es un factor aterogénico provocado por el aumento de ácidos grasos saturados
 - b).- La disminución de los factores protectores: ácidos grasos poliinsaturados, de la serie n-6 (linoléico), y los ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3 (linoléico), los ácidos grasos monoinsaturados, la fibra dietética y los antioxidantes (Cervera *et al.*,1999 ; Rahman *et al.*, 2006; Lau ,2006).

5.3 Tratamiento para hipercolesterolemia

5.3.1 Fármacos de patente

Una vez que se ha determinado que la hipercolesterolemia se debe a incrementos de lipoproteínas de baja densidad-colesterol, se intenta disminuir las cifras de éstas últimas mediante la modificación del régimen nutricional con dieta baja en grasas y ácidos grasos saturados y rica en fibra (Saravanan *et al.*, 2007). Si las concentraciones de lipoproteínas de baja densidad-colesterol permanecen arriba de 130 mg/dL después de tres meses de dietoterapia, se instituye farmacoterapia.

Dado que la actividad de los receptores hepáticos de lipoproteínas de baja densidad por lo general, es el principal factor que controla las concentraciones plasmáticas de éstas últimas, el objetivo del tratamiento es alcanzar la expresión máxima de actividad de dichos receptores. Tanto el colesterol como las grasas saturadas en la dieta suprimen la actividad de receptores hepáticos de lipoproteínas de baja densidad. El principio de la dietoterapia es reducir el consumo de alimentos que contengan colesterol y grasas.

En la mayoría de los pacientes, ha de considerarse farmacoterapia después de un intento de tres meses con dieta o quizá luego de seis meses cuando se nota progreso de la disminución de lipoproteína de baja densidad-colesterol si no hay otros factores de riesgo. Un adulto joven o de edad media que ha consumido una dieta con reducción de colesterol durante tres meses y aún tiene cifras de lipoproteínas de baja densidad-colesterol de más de 190 mg/dL, es idóneo para recibir farmacoterapia (Hardman *et al.*, 1996).

Los individuos con ateropatía coronaria o aquellos con otros factores de riesgo y concentraciones de lipoproteína de baja densidad-colesterol de más de 160 mg/dL son idóneos para farmacoterapia.

En la actualidad se dispone de varias opciones para tratar la hipercolesterolemia. Los fármacos que suelen usarse con objeto de disminuir las cifras de lipoproteínas de baja densidad comprenden secuestradores de ácidos biliares, ácido nicotínico (niacina), fibratos e inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima-A reductasa. Estos últimos inhibidores se han denominado estatinas o vastatinas y son los fármacos más eficaces disponibles (Liu *et al.*, 2002).

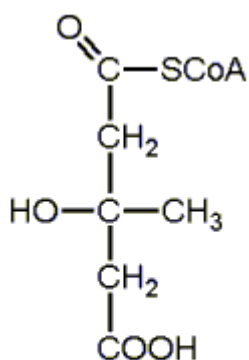


Fig. 4. 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa

5.3.1.1. Inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa

La creación de inhibidores competitivos específicos de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa, que cataliza el paso limitador de la tasa en biosíntesis del colesterol, marcó un avance sensacional en la habilidad para disminuir con eficacia las cifras de lipoproteína de baja densidad-colesterol. En la actualidad, se dispone de cuatro inhibidores de este tipo: la mevastatina la cual fue aislada de cultivos de *Penicillium*, más tarde se aisló la lovastatina un análogo, en cultivos de *Aspergillus*, que solo difería por la presencia de un grupo metilo, además se cuenta con la sinvastatina, pravastatina y fluvastatina.

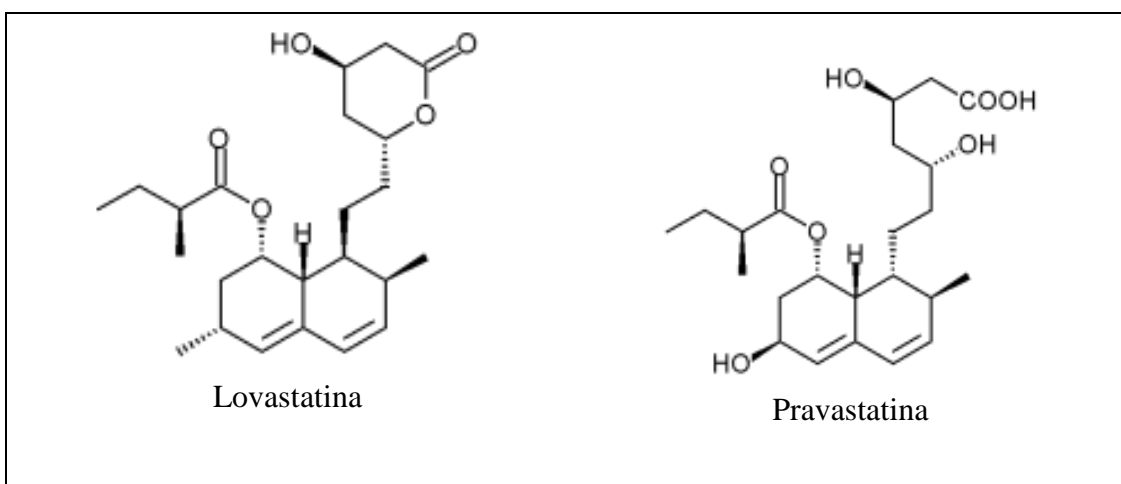


Fig. 5 Inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa

Estos fármacos bloquean la síntesis de colesterol en hígado al inhibir de manera competitiva la actividad de dicha enzima, además todas las estatinas son bastante eficaces para reducir las cifras de lipoproteínas de baja densidad un 25-45 % de una manera dependiente de la dosis.

5.3.1.2 Efectos adversos e interacciones farmacológicas

Como grupo, las estatinas parecen tener un registro sobresaliente de aceptación por parte de los enfermos, hasta la fecha, no parece haber diferencias importantes en cuanto a efectos adversos entre distintas estatinas. Los efectos adversos de mayor importancia comprenden miopatías e incrementos de las transaminasas hepáticas, en sujetos que además ingieren ácido nicotínico y fibratos puede haber insuficiencia renal y su uso está restringido durante el embarazo (Hardman *et al.*, 1996).

Sin embargo, algunos pacientes no pueden tolerar los efectos adversos de esos fármacos y por lo tanto se requiere de investigación continua para la búsqueda de nuevos productos, para eso es necesario el estudio de las plantas las cuales pueden ser una buena opción como sustituto de los fármacos (Xie *et al.*, 2007; Kouri *et al.*, 2007).

5.4 Plantas con actividad hipocolesterolémica

En 1995, Pakdee y colaboradores estudiaron las galactomananas extraídas de la semilla de *Leucaena leucocephala* encontrando una disminución significativa sobre el colesterol sérico y la concentración de colesterol total del hígado en ratas.

En otros estudios se ha probado el extracto de cáscara de la nuez, *S. anacardium*, en conejos alimentados con dietas ricas en colesterol y se ha visto que este extracto

fue eficiente en la reducción de colesterol sérico (-73.3 %) y en el LDL-colesterol (-80 %), indicando que su uso puede prevenir los ateromas (Sharma *et al.*, 1995).

Saraswathi y colaboradores en 1997, probaron plantas nativas de la India para medir el efecto de ellas sobre la cristalización del colesterol, ya que una de las calcificaciones menos deseables en el humano es el depósito mineral en las placas de colesterol, siendo éste depósito, cristales de colesterol monhidratado. Ellos encontraron que los extractos tuvieron un efecto inhibitorio sobre la cristalización en el orden siguiente: *Commiphora mughul* > *Aegle marmelecos* > *Cynoden dactylon* > *Musa paradisiaca* > *Polygala javana* > *Alpina officinarum* > *Solanum trilobatum* > *Enicostemma lyssopifolium*.

Entre las propiedades que se le atribuyen al ajo (*Alium sativum*) está la de disminuir el colesterol siempre y cuando se utilice con una dieta baja en grasas y colesterol, como lo demuestran los estudios realizados por Spigelski y colaboradores en el año 2001 en Canadá.

Los estudios realizados en Egipto por Ismail y colaboradores en 1997, han demostrado que el ajo y el ginseng son útiles para incrementar significativamente el HDL-colesterol, mientras que las pectinas carecen de ésta actividad.

Kojuri y colaboradores en el 2007, estudiaron que cuando administraron tabletas de ajo conteniendo 400 mg de ajo y 1 mg de alicina dos veces al día en pacientes se logró la disminución del colesterol total y de LDL-colesterol y aumentó la concentración de lipoproteínas de alta densidad

Se ha asociado el consumo de leguminosas con la disminución del colesterol, el estudio de las leguminosas se ha realizado en ratas alimentadas con una dieta alta en colesterol y se han obtenido resultados favorables en los cuales se logró una

disminución del 50 % del colesterol total y una reducción del 70 % en los triglicéridos (Zulet *et al.*, 1995).

En humanos, mediante estudios se ha determinado si las leguminosas son realmente útiles para éste propósito y se ha observado que en efecto, el colesterol sérico es reducido significativamente así como también la excreción del mismo (Duane *et al.*, 1997).

En América Latina, especialmente en Brasil, Rosa y colaboradores en 1998 probaron el uso de *Phaseolus vulgaris* en ratas hipercolesterolémicas notando que la reducción no fue significativa en relación con el control.

Otros estudios realizados por Wang en 1999 y su grupo de trabajo, han demostrado que entre los derivados de plantas con actividad hipocolesterolémica están el β -caroteno, licopeno, cicloartenol, β -sitosterol, sitostanol, saponinas, proteína de soya, indoles, mevinolina (un inhibidor de la β -hidroxi- β -metilglutaril Co-A reductasa) y polisacáridos.

En 1999 en Italia Galati y colaboradores probaron el efecto hipolipidémico del tallo de *Salvadora pérsica* en ratas hipercolesterolémicas encontrando una disminución de los niveles de colesterol y LDL plasmáticos cuando administraron el tratamiento por 30 días.

Piyachaturawat y Charoenpiboonsin en 1999, observaron que los extractos de *Curcuma comosa* Roxb. en hámsteres hipercolesterolémicos bajaban el colesterol plasmático e incrementaban el colesterol hepático sugiriendo que los extractos de esta planta ejercen acción hipolipidémica acelerando la movilización de los lípidos hacia el hígado el cual subsecuentemente incrementa la excreción de colesterol vía bilis.

En el 2000 Dwivedi y colaboradores estudiaron el efecto de 4 plantas medicinales sobre la modificación de factores de riesgo coronario, encontrando que las plantas bajo estudio, *Terminalia arjuna*, *Emblica officinalis*, *Ocimum sanctum* y *Withania somnifera* (todas ellas de la India) mostraron una reducción importante en los niveles de colesterol sanguíneo entre otros factores que adicionalmente se midieron, cabe mencionar que éste estudio se hizo en humanos.

Abe *et. al.* en el año 2000, mediante estudios concluyeron que los ésteres gallolil obtenidos de *Rhei rizoma*, tienen un potente efecto inhibitorio de la enzima escualeno epoxidasa, la cual es limitante en la biogénesis del colesterol.

Asimismo en Alemania en el mismo año, Berrada y colaboradores aportaron la evidencia experimental de que el aceite de *Argania sideroxylon* administrado a ratas indujo hipocolesterolemia y restauró la presión sanguínea.

En la India en el año 2002, Subbiah y colaboradores probaron el efecto de la planta conocida como “Justicia” la cual crece en la región de Karnataka, encontrando que el extracto de la misma disminuyó el colesterol celular y la concentración de ésteres colesteril.

Los estudios realizados por Timothy y colaboradores han evidenciado la utilidad del sorgo para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, ellos usaron el extracto hexánico obtenido de granos de sorgo el cual es rico en compuestos fenólicos, esteroides y policosanoles. Cuando alimentaron hámsteres con una dieta suplementada con el extracto durante 3 semanas, los resultados demostraron una disminución de las lipoproteínas de baja densidad así como también del colesterol hepático (Carr *et.al.*, 2005).

La fibra soluble presente en los cereales como la avena ha sido objeto de estudio por parte de investigadores, los estudios de Naumann ha demostrado que el β -

glucano obtenido de la fibra de la avena e incorporado a bebidas de frutas es efectivo para disminuir las concentraciones de colesterol sérico reduciendo la absorción del mismo y favoreciendo su excreción (Naumann *et al.*, 2006).

Se ha asociado el consumo de alimentos que contienen antioxidantes con la disminución en los niveles de colesterol, tal es el caso del Kiwi, (Jung *et al.*, 2005) Tomate (Hsu *et al.*, 2008; Bose *et al.*, 2007) y pistache (Tohoku *et al.*, 2007) los cuales son de interés ya que evitan la oxidación de las lipoproteínas y con ello el depósito de las mismas en las arterias evitando así la ateropatía coronaria, además en el caso del pistache se obtiene una elevación de las lipoproteínas de alta densidad consideradas como colesterol bueno.

5.4.1 Plantas que actúan sobre enzimas de la biosíntesis del colesterol

Algunos de los estudios mencionados se han realizado *in vivo* utilizando ratas, conejos, hámsteres o incluso el mismo hombre. Otros se han efectuado *in vitro* midiendo la actividad de enzimas como la escualeno epoxidasa, la cual está involucrada en la biogénesis del colesterol (Abe *et al.*, 2000).

Choi y colaboradores estudiaron el efecto de un compuesto fenólico (ácido clorogénico) obtenido de *Prunus mume* sobre la inhibición de la enzima escualeno sintasa, una enzima involucrada en la biosíntesis del colesterol, encontrando que el ácido clorogénico en efecto inhibe la actividad de la enzima y que puede ser un potencial agente terapéutico para la hipercolesterolemia (Sun-Wong *et al.*, 2007).

La formación de mevalonato a partir de 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A (HMG-CoA) es una reacción catalizada por la enzima HMG-CoA reductasa, debido a que el mevalonato constituye el metabolito clave en la biosíntesis del colesterol, la inhibición de la HMG-CoA reductasa es el principal paso regulatorio de esta ruta

metabólica, la inhibición de los pasos posteriores causa la acumulación de esteroides y esto origina efectos adversos (Wächtershäuser *et al.*, 2001; Menéndez *et al.*, 2001). Menéndez y colaboradores estudiaron el efecto de policosanoles sobre la actividad de ésta enzima encontrando que a dosis de 50 µg/mL se observó un marcado efecto sobre la inhibición de la HMG-CoA reductasa en cultivo de fibroblastos (Menéndez *et al.*, 2001).

El extracto etanólico de las hojas de *Anana comosus*, una planta nativa de china, ha demostrado ser un efectivo agente natural hipolipemiente ya que ejerce acción sobre la actividad de la HMG-Co-A reductasa disminuyendo de un 20-49 % su actividad (Wiedong *et al.*, 2007).

En el 2001, Chang y colaboradores midieron *in vitro* el efecto inhibitorio de derivados de taninos sobre la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA), una enzima limitante de la biosíntesis del colesterol, utilizando para su estudio células Vero las cuales provienen de riñón de mono verde africano. Los extractos crudos de *Curcuma zedoaria* y *Poncirus trifoliata* dos plantas utilizadas en la medicina tradicional China han mostrado ser efectivas en la disminución del colesterol mediante la inhibición de la enzima HMG-CoA reductasa cuando se probaron en un cultivo de células Vero (Ju-Chiu-Lu *et al.*, 2002).

De las flores de *Pueraria thunbergiana* se han aislado dos compuestos los cuales demostraron ser potentes inhibidores de la HMG-CoA cuando se administraron en forma oral a ratones hiperlipidémicos (Sung-Won *et al.*, 2007).

De *Guatteria gaumeri*, una planta nativa de Yucatán México se ha aislado un compuesto conocido como α -asarona el cual ha demostrado tener gran influencia sobre el LDL-colesterol sin afectar las HDL, de tal manera que la relación LDL/HDL fue disminuido en un 74 % cuando se administró a ratas hipercolesterolémicas y

además se determinó que el efecto hipolipemiente se debió a la inhibición de la enzima 3-hidroximetil-glutaril-Co-A reductasa (Rodríguez-Paéz *et al.*, 2003).

5.4.2 Descripción de las plantas utilizadas en este estudio

De la gran diversidad de plantas reportadas para el tratamiento del colesterol, en nuestro País existen muchas que aún no tienen un soporte científico (INI, 1994), de ahí que en la presente investigación se pretenda estudiar algunas de las plantas reportadas con actividad hipocolesterolémica y para ello se han elegido las siguientes:

Diente de León

Nombre científico: *Taraxacum officinale* Weber

Familia: Compositae

Nombres comunes: diente de león, achicoria amarga, almirón, amargón, pelosilla, taraxacón, corona de fraile, achicoria amarilla, achicoria silvestre, bufas de lobo, chinita de campo, flor de macho, frango, lechiriega, taraxaco, tatusia



Fig. 6. Fotografía de *T. officinale*

Es una planta herbácea pequeña que mide no más de 35 cm de altura caracterizada por presentar un rizoma cónico, corto, ramificado y de sabor agridulce, con las hojas de sabor amargo, profundamente dentadas, colocadas en la base del tallo en círculo. Las flores se encuentran en la parte terminal de la planta semejando una cabeza amarilla, los frutos secos están formando un globito blanco que se desprende con el viento (INI, 1994; Alonso, 2007).

Originaria de regiones templadas, presente en climas cálido, semicálido, semiseco, el diente de león, es una maleza nativa de Europa, pero actualmente distribuida en todo el mundo, crece en suelos ricos en nitrógeno, muy común en los jardines, sobre el césped, praderas, terrenos baldíos y a orillas de caminos (González, 1998; Alonso, 2007).

Es una planta utilizada dentro de la medicina tradicional como colagogo, colerético, diurético, se usa además como en padecimientos como colesterol alto, salpullido, algodoncillo, ojos irritados, fuegos, dispepsia, estreñimiento, afecciones de garganta, antirreumático, etc. (INI, 1994; Alonso, 2007).

Se ha visto que el extracto hidroalcohólico obtenido de las ramas presenta actividad hipoglicémica en rata por vía oral a la dosis de 250 mg/kg, ésta misma actividad se demostró en conejos a otras dosis. El extracto acuoso y metanólico de hoja y flores ejerce un débil efecto antiespasmódico en el intestino de conejos; la tintura obtenida de las hojas presenta actividad antibiótica sobre *Bacillus subtilis*

Ha sido estudiada desde el punto de vista fitoquímico y se ha detectado la presencia de terpenos, sesquiterpenos glucósidos de taraxacólico y de los ácidos 11-13-dihidro-taraxinoico y 4-alfa-11-beta-13-15-tetrahidro-ridentín; los triterpenos beta-amirina, taraxasterol, pseudotaraxasterol y su acetato, taraxerol y taraxol; los esteroides daucosterol y beta-sitosterol; el politerpeno hule; los azúcares raros inulín y levulín y los componentes taraxacín y taraxacósido de estructura desconocida.

De las flores se han aislado los sesquiterpenos ácido jasmónico y el glucopiranosido del ácido taraxínico; los triterpenos beta-amirina y taraxasterol; el beta-sitosterol; los carotenoides beta-caroteno, cis y trans-taraxantín, taraxien.

Es una fuente importante de vitaminas C, D, complejo B, colina y de minerales como hierro, magnesio, sodio, potasio, zinc, manganeso, cobre y fósforo (Alonso, 2007).

El diente de león es una planta de uso muy antiguo y continuo, algunas de sus aplicaciones se han validado experimentalmente, sin embargo no se ha realizado investigación experimental que corrobore científicamente las variadas acciones biológicas (INI, 1994).

Yerba del sapo

Nombre científico: *Eryngium heterophyllum* Engelm

Familia: Umbelliferae

Nombres comunes: hierba del sapo, huatátci, merengari (purépecha), sawíwari (tarahumara), xukurhi kokiri (purépecha), yerba del sapo.



Fig. 7. Fotografía de *E. heterophyllum*

Es una hierba de 40 cm a 1 m de altura, las hojas son ásperas, rígidas, espinosas y con los bordes y nervios de color blanco, las flores son en forma de esferillas verdes. Originaria de México, presente en climas seco, semiseco y templado, crece en terrenos de cultivo abandonados, de riego o de temporal. Se le ha utilizado con frecuencia contra el “mal de orín” ingiriendo la infusión con toda la planta, o cocida con hojas de manzanita, se toma como agua de uso o mezclada con gobernadora, se le agrega jugo de limón y se bebe cuando hay problemas en riñones y afecciones en hígado, para contrarrestar la bilis, diarrea, dolor de estómago, fiebres, golpes, tosferina, padecimientos pulmonares, padecimientos de vejiga y los cálculos biliares, también se ha utilizado contra la bronquitis y la bronconeumonía.

Es una planta originaria de México, carece de estudios experimentales que validen sus atribuidas propiedades terapéuticas (INI, 1994).

Chaya

Nombre científico: *Cnidoscolus chayamansa* Mc. Vaugh

Familia: Euphorbiaceae

Nombres comunes: chaya, espinacas, kikilchay, chaykeken



Fig. 8. Fotografía de *C. chayamansa*

Es un arbusto de rápido crecimiento de hasta 3 m de altura, con los tallos numerosos con látex abundante. Las hojas tienen 5 picos y pelillos irritantes al tacto, las flores son blancas y en racimos. Se desarrolla en climas cálido y semicálido, asociada a vegetación de bosques tropicales caducifolio y perennifolio.

Existen dos especies de chaya, *Cnidoscolus chayamansa* la cual se encuentra distribuida desde la península de Yucatán hasta Honduras y Cuba; *Cnidoscolus aconitifolius* que se encuentra en el sur de México y Costa Rica (Kuti *et. al.*, 1999).

Es un vegetal de hojas verdes el cual ha sido utilizado por su valor nutricional y por sus propiedades etnomedicinales especialmente en el tratamiento de la diabetes no dependiente de insulina, se recomienda hervir la planta antes de su uso para eliminar algunos compuestos antinutricionales presentes (Kuti *et. al.*, 2004).

La chaya ha sido cultivada desde la época prehispánica, se usaba como hasta hoy como planta comestible, medicinal y ornamental por más que 10 grupos Mayas y también otros grupos Mexicanos y Mesoamericanos. Normalmente se encuentra cultivada en huertos familiares o jardines y a menudo está sembrada junto a otros cultivos en una milpa o campo de cultivos. La hoja y a veces el peciolo y los brotes,

son cosechadas y cocidas para varios tipos de guisado o para uso medicinal (Ross-Ibarra, 2003).

En Morelos y Tabasco el principal uso medicinal que se le da a esta planta es para el dolor de riñones, como tratamiento se preparan las hojas en cocción y se administran en forma oral, también se ha utilizado de manera externa para granos enterrados. Asimismo, se utiliza para tratar el colesterol en la sangre y como medio para combatir el alcoholismo, también se le atribuyen propiedades laxantes y diuréticas. Se ha reportado también su uso en la disolución de cálculos renales y como tratamiento para la anemia (INI, 1994).

Olivo

Nombre científico: *Olea europaea*

Familia: Oleacea

Nombres comunes: Aceituno, olivera, acebuche, oleastro, zambullo.



Fig. 9. Fotografía de *O. europaea*

Es un árbol perennifolio de 8 metros de altura, con abundantes ramas, de corteza grisácea, las hojas opuestas, enteras, lanceoladas u oblongas y parecen de cuero; en el anverso son verde oscuro y en el reverso blanquecinas, las flores son pequeñas, fragantes, blanquecinas, numerosas, con cuatro pétalos, reunidas en pequeños racimos axilares escondidas entre las hojas y los frutos globosos de color verde olivo o negruzco (INI, 1994; Alonso, 2007).

El olivo es originario de la región mediterránea, siendo posteriormente introducido en otras latitudes. Este árbol por lo general es cultivado, existiendo variedades silvestres. Se encuentra aclimatado en la región de California, Perú, Chile y sur de Australia.

La parte utilizada son las hojas y el aceite, en el caso del aceite se extrae por presión en frío para preservar activamente todos sus ingredientes, especialmente los antioxidantes, el producto obtenido presenta una coloración amarilla y verdosa, con olor y sabor frutado o picante (Alonso, 2007).

Se ha utilizado para padecimientos digestivos, especialmente hepáticos, de la vesícula y problemas de estreñimiento. Se encuentra bien documentada la actividad hipotensora de los extractos acuosos, acetónicos, metanólicos, etanólicos e

hidroalcohólicos; asimismo en los extractos acuosos de las hojas secas su actividad hipertensora.

Su actividad diurética ha sido probada en humanos utilizando una decocción administrada por vía oral, se demostró también que posee actividad citotóxica en células tumorales (Sarcoma y carcinoma).

Se ha realizado numerosa investigación química sobre el olivo, encontrando en las hojas alcaloides como la colina, cinconidina y dihidrocinconidina; flavonoides como apigenín, luteolín y su glucósido, monoterpenos (elenólido, ligostrósido, etc.), triterpenos (beta-amirina, uvaol). Del fruto se extrae aceite rico en triterpenos, monoterpenos, esteroides, flavonoides, lignanos y alcaloides. El tallo contiene cumarinas, flavonoides, monoterpenos y lignanos (INI, 1994).

6. MÉTODOS

6.1 Material biológico

Taraxacum officinale (hojas)

Eryngium heterophyllum (parte aérea)

Cnidocolus chayamansa (hojas)

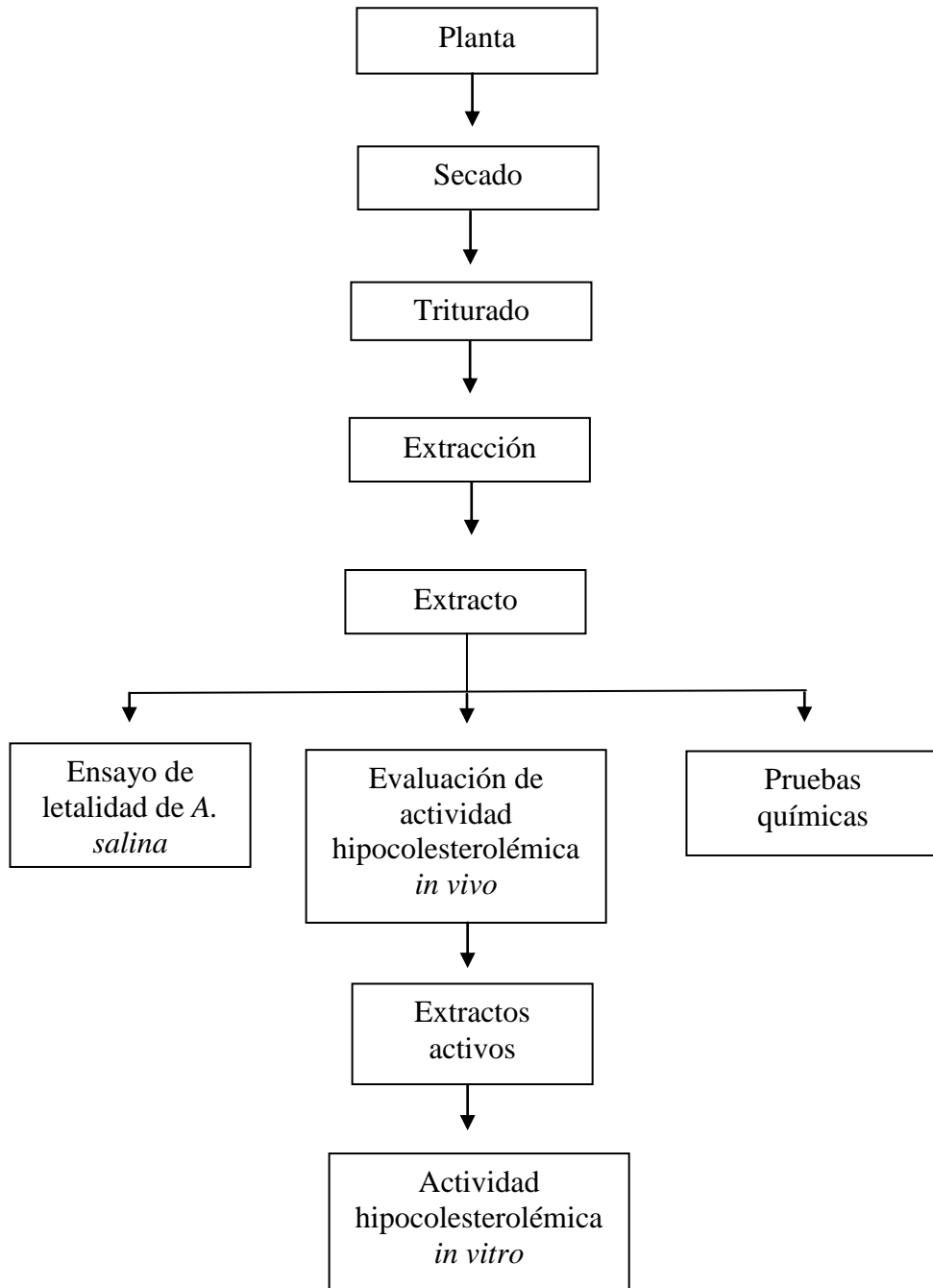
Olea europaea (hojas)

Artemia salina

Línea celular Vero ATCC CCL-81 (riñón de mono verde africano)

Ratones machos Balb/c de 25-28 gramos de peso

6.2 Estrategia de trabajo realizada



6.3 Colecta de plantas

- *T. officinale*: se colectó en la zona urbana de la Cd. de San Nicolás de los Garza Nuevo León, se clasificó y asignó el voucher No. F024188
- *E. heterophyllum*: se compró en el mercado de Sonora en la Ciudad de México, se clasificó y se le asignó el voucher No. 15238
- *C. chayamansa* y *O. europaea*: se colectaron en Ciénega de Flores Nuevo León, se clasificaron y se les asignaron los vouchers F.024187 y F.025129 respectivamente.

6.4 Obtención de los extractos

Extracto metanólico y etanólico: 30 g del material vegetal seco y triturado se colocaron en respectivos matraces de 500 mL con 250 mL de cada uno de los solventes se sellaron con tapón de caucho y se sometieron a agitación durante 4 días en un agitador Dual Actino Shaker Lab-Line a temperatura ambiente, posteriormente se filtraron en papel Whatman #1 y el filtrado obtenido se evaporó en una estufa a 38-40 °C. Se pesaron los extractos obtenidos para calcular el rendimiento y se guardaron en refrigeración (Domínguez, 1973, 1982).

- **Extracto acuoso:** 30 gramos de la planta se colocaron en un litro de agua hirviendo, se retiró de la flama y se tapó el recipiente, se dejaron reposar 20 minutos y posteriormente se filtraron utilizando papel Whatman #1, el filtrado obtenido se liofilizó. Los extractos se pesaron para calcular el rendimiento y se guardaron en congelación.

➤

6.5 Determinación de la actividad toxica de los extractos con el ensayo BSLA

6.5.1. Eclosión de huevecillos de *A. salina*

Se prepararon 100 mL del medio (agua de mar) para *A. salina* con 40 g de una mezcla de sal comercial (Instant Ocean, Aquarium Systems) y 6 mg/L de suplemento alimenticio de levadura de cerveza (Mead Johnson). Se colocaron en un recipiente de incubación dividido en dos compartimentos (manteniendo siempre el volumen). Se utilizó una bomba de aire y lámpara de 60 Watts. Se colocaron 100 mg de huevecillos de *A. salina* (PETMART, Brine Shrimp eggs, San Francisco Bay Brand. Inc.) en uno de los compartimentos cubierto de la luz y el otro se dejó expuesto a la luz, se incubaron por 24 h entre 22 y 29 °C; posteriormente se aspiraron los nauplios del lado iluminado del recipiente de incubación y se pasaron a otro recipiente de cultivo con medio nuevo. Se incubaron 24 h más a la misma temperatura en presencia de luz y mismas condiciones de aereación, antes de realizar el ensayo se cambió el medio.

6.5.2 Ensayo de Letalidad de *A. salina*

Se realizó siguiendo la metodología propuesta por Meyer, 1982. Se utilizó una microplaca de 96 pozos y se adicionaron 100 µL del medio con nauplios (5-12) en cada pozo. Se agregaron 100 µL de cada una de las diluciones del extracto a evaluar (10, 100 y 1000 µg/mL) por triplicado. Se utilizó como control positivo $K_2Cr_2O_7$ (400 ppm) y la dilución del solvente utilizado con las muestras (DMSO, agua de mar). Se cubrió la microplaca y se incubó a temperatura ambiente en presencia de luz por 24 h. Después de la incubación se contaron los nauplios muertos en un microscopio estereoscópico (8-10X). Se adicionaron 100 µL de etanol 70 % por 30 minutos para ocasionar la muerte de la totalidad de los nauplios y determinar el número de nauplios vivos por pozo.

6.6 Ensayo *in vivo* de la actividad hipocolesterolémica de los extractos

Este ensayo se realizó siguiendo la metodología propuesta por Cruz *et al.*, 2001. Se utilizaron 3 grupos de 6 ratones machos BALB/c de un peso aproximado de 25-28 g, los cuales se alimentaron con una dieta de rica en colesterol (Rodent Laboratory Chow más 1 % de colesterol) durante 5 días más el extracto a probar a 2 dosis distintas, 50 y 100 mg/kg de peso, otro grupo se alimentó con la misma dieta más un vehículo (agua o tween 80/solución salina) que es el mismo solvente en el que se disolvieron los extractos (grupo control positivo o grupo hipercolesterolémico) y un tercer grupo se alimentó con la dieta basal no enriquecida en lípidos más el vehículo (grupo control negativo).

Al final de los 5 días los animales se dejaron en ayuno por 12 a 15 horas. Se colectaron muestras de sangre de cada ratón y se analizó el colesterol total en un analizador automatizado Beckman Coulter Synchron C x 7 Clinical System. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante ANOVA utilizando el programa SPSS.

6.7 Ensayo *in vitro* de la actividad hipocolesterolémica de los extractos.

6.7.1 Descongelación de la línea celular Vero

Se descongelaron las células transfiriendo todo el contenido de células a un tubo cónico con 5 mL de medio M-199. Se centrifugaron a 1000 rpm, a una temperatura de 25 °C por 5 min. Se retiró el sobrenadante y se adicionaron 2 mL de medio, homogenizando suavemente, de aquí se tomaron 1 mL para cada una de las botellas de cultivo previamente preparadas con 3 mL del medio anterior. Se incubaron las células a una temperatura de 37 °C en una atmósfera húmeda y CO₂ al 5 %.

6.7.2 Mantenimiento de las líneas celulares

Los cultivos se mantuvieron en frascos de 25 cm³ con 3 mL de medio M-199 suplementado con suero fetal bovino al 4 %, se le adicionó una mezcla de antibióticos: penicilina (100 U/mL) y estreptomina 100 mg/ml; se incubaron a 37 °C en atmósfera húmeda y CO₂ al 5 %. Los cultivos se resembraron aproximadamente cada 4-5 días.

6.7.3 Resiembra de células

Las células se resembraron cuando la monocapa se observó al 85-95 % de confluencia. En condiciones asépticas y con utilización de vacío, se eliminó el medio de la botella de cultivo. Se lavó el cultivo suavemente, dos veces con buffer de fosatos salino (PBS) y se agregó tripsina al 0.25 % incubando aproximadamente 10-15 min a las condiciones antes mencionadas, esperando que se despegaran las células. Se neutralizó el efecto de la tripsina con 10 mL de medio, homogenizando suavemente. Se pasaron 0.5 mL a botellas nuevas con 3.5 mL de medio, para ser incubadas nuevamente y utilizarlas en los ensayos.

6.7.4 Determinación de viabilidad celular

Este ensayo se realizó para determinar la toxicidad de los extractos, asumiendo que aquellos que tuvieron un efecto citotóxico marcado se debían posiblemente al bloqueo en la síntesis del colesterol el cual es necesario para la formación de la membrana celular. Para ello los cultivos se lavaron 2 veces con PBS, para despegar la monocapa celular se utilizó una solución de tripsina al 0.25 %. Después la suspensión de células se transfirió a tubos cónicos graduados con tapón de rosca se centrifugaron a 1000 rpm a una temperatura de 25 °C por 5 min. Se eliminó el

sobrenadante hasta dejar 2 mL. Se contaron las células en un hemocitómetro utilizando un microscopio invertido (Iroscope/Mod. S1-PH). Se observó la viabilidad con azul tripano. Se sembraron 3×10^5 cel/100 μ L por cada pozo en una microplaca grado cultivo celular de 96 pozos, fondo plano y se incubaron a 36 °C, en atmósfera húmeda con CO₂ al 5 % por 24 h. Se adicionaron 100 μ L de cada una de las diferentes diluciones de extractos por triplicado (125, 250, 500, 700 y 1000 μ g/mL), se incluyó el medio M-199 (p/v) como control que fue el solvente utilizado en la dilución de los extractos, se incubaron por 48 horas a las mismas condiciones. Posteriormente se adicionaron 10 μ l del reactivo WST-1 y se incubaron por una hora y treinta minutos, se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector para microplacas (Sigma Diagnostics). Los resultados obtenidos se sometieron a análisis estadístico utilizando ANOVA.

6.7.5 Determinación de la inhibición de la HMG-CoA reductasa

Los extractos que tuvieron efecto citotóxico sobre la línea celular se evaluaron nuevamente con el ensayo de viabilidad utilizando el reactivo WST-1 pero ahora con la adición de pravastatina como control positivo de inhibición de la HMG-CoA reductasa y mevalonato para observar la reversión del daño celular causado por el extracto, por lo que fue necesario primeramente determinar la concentración de pravastatina y mevalonato siguiendo el protocolo de viabilidad celular.

6.8 Pruebas químicas coloridas para identificación de metabolitos

6.8.1 Prueba del Br₂/ CCl₄ (insaturaciones)

Se disolvieron 1-2 mg de la muestra en 1 mL de CCl₄ y se agregó gota a gota una solución al 2 % de bromo en CCl₄, si se observa decoloración de la solución, la prueba es positiva para dobles enlaces.

6.8.2 Prueba del KMnO_4 (insaturaciones)

Se disolvieron 1-2 mg de la muestra en 1 mL de agua, acetona o metanol; posteriormente se añadió gota a gota una solución de KMnO_4 al 2 % en agua; la prueba es positiva si se observa formación de un precipitado café, resultado de la formación de bióxido de manganeso.

6.8.3 Prueba del FeCl_3 (oxhidrilos fenólicos)

Se disolvieron 1-2 mg de la muestra en 1 mL de agua o etanol después se le añadieron unas gotas de cloruro férrico al 12.5 % en agua; la aparición de un precipitado rojo, azul violeta o verde se considera positivo. En algunas ocasiones, para hacer más sensible la determinación, es necesario utilizar una solución no acuosa de cloruro férrico a la que se le añade una base débil, como por ejemplo una combinación de piridina - cloroformo.

6.8.4 Prueba de Liebermann-Burchard (esteroles y triterpenos)

Se disolvió una pequeña muestra en cloroformo a la cual se le añade el reactivo que se preparó agregando una gota de ácido sulfúrico en una mezcla de anhídrido acético con 1 mL de cloroformo; la aparición de cualquier color en el lapso de 1 hora determina que la prueba es positiva.

6.8.5 Prueba para determinación de coumarinas

Se disolvieron 1-2 mg de la muestra en una solución de NaOH al 10 %; si aparece una coloración amarilla que desaparece al acidular, la prueba es positiva.

6.8.6 Prueba de Baljet (sesquiterpenlactonas)

Se utilizaron dos soluciones que se mezclan en iguales volúmenes antes de usarse. Solución A: 1g de ácido pícrico en 100 mL de etanol; solución B: 10 g de hidróxido de sodio en 100 mL de agua. Para la prueba se colocaron 2-3 mg de compuesto y de 3 a 4 gotas del reactivo, siendo positiva si se forma una coloración naranja o roja oscura.

6.8.7 Prueba de Shinoda (flavonoides)

La muestra disuelta en etanol, se trató con limaduras de magnesio se aplicó calor (60 °C) y después unas gotas de ácido clorhídrico concentrado, se considera positiva la prueba si se presentan colores naranja, rojo, rosa-azul y violeta.

6.8.8 Prueba de Dragendorff (alcaloides)

El reactivo utilizado consta de dos soluciones: Solución A: 5 mL de subnitrato de bismuto al 1.6 % en ácido acético al 20 %. Solución B: 5 mL de yoduro de potasio al 40 % y 20 mL de ácido acético aforando a 100 mL con agua destilada. Se disolvieron 1-2 mg de la muestra en etanol y se colocaron unas gotas en una placa de porcelana, luego se le añadió unas gotas del reactivo de Dragendorff; la prueba se considera positiva si aparece un precipitado naranja marrón.

7.0. RESULTADOS

7.1 Obtención de extractos

Se obtuvieron 12 extractos a partir de cuatro plantas reportadas en la literatura popular con actividad hipocolesterolémica (*T. officinale*, *E. heterophyllum*, *C. chayamansa* y *O. europaea*) como se observa en la Tabla IV, los extractos de mayor rendimiento fueron el acuoso de *C. chayamansa* con 36.2 %, el extracto acuoso, metanólico y etanólico de *O. europaea* con 25.72, 22 y 21 % respectivamente, siendo el de menor rendimiento el extracto acuoso de *T. officinale* con 0.63 %

Tabla IV.- Rendimiento de los doce extractos obtenidos de plantas.

Planta	Parte de la planta	Tipo de extracto	Rendimiento (%)
<i>T. officinale</i>	Hojas	Acuoso	0.63
<i>T. officinale</i>	Hojas	Etanólico	2.76
<i>T. officinale</i>	Hojas	Metanólico	12.06
<i>E. heterophyllum</i>	parte aérea	Acuoso	17.3
<i>E. heterophyllum</i>	parte aérea	Etanólico	6.24
<i>E. heterophyllum</i>	parte aérea	Metanólico	7.13
<i>C. chayamansa</i>	Hojas	Acuoso	36.2
<i>C. chayamansa</i>	Hojas	Etanólico	8.43
<i>C. chayamansa</i>	Hojas	Metanólico	8.33
<i>O. europaea</i>	Hojas	Acuoso	25.72
<i>O. europaea</i>	Hojas	Etanólico	21
<i>O. europaea</i>	Hojas	Metanólico	22

7.2 Evaluación de la toxicidad en *A. salina* (BSLA)

Todos los extractos se disolvieron en agua de mar. Los resultados se muestran en la tabla V, donde podemos apreciar que solamente el extracto metanólico de *O. europaea* mostró actividad sobre *A. salina* siendo esta toxicidad menor a 100 mg/mL, el resto de los extractos se consideran no tóxicos a este organismo.

Tabla V. Toxicidad de los extractos evaluados sobre *A. salina*.

Planta	Extracto	DL₅₀ (mg/mL)
<i>T. officinale</i>	acuoso	> 1000
	etanólico	> 1000
	metanólico	> 1000
<i>E. heterophyllum</i>	acuoso	> 1000
	etanólico	> 1000
	metanólico	> 1000
<i>C. chayamansa</i>	acuoso	> 1000
	etanólico	> 1000
	metanólico	> 1000
<i>O. europaea</i>	acuoso	> 1000
	etanólico	> 1000
	metanólico	<100

7.3 Ensayo *in vivo* de la actividad hipocolesterolemica de los extractos

7.3.1 Extractos disueltos en agua

En la figura 10 se muestra el efecto de la dieta sobre la concentración de colesterol en el suero de ratones normales e hipercolesterolemicos, estos resultados demuestran que la dieta incrementa el colesterol aproximadamente un 53 %.

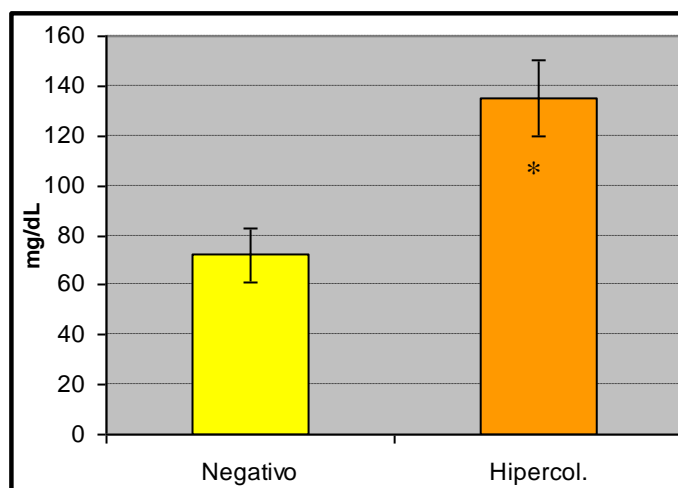


Fig. 10. Concentración de colesterol en grupos control, vehículo utilizado H₂O (* p < 0.01, Tukey).

Los extractos acuosos de *E. heterophyllum* a 100 mg/Kg de peso y de *C. chayamansa* a 50 y 100 mg/kg de peso mostraron actividad en este modelo cuando se les comparó con el control hipercolesterolémico, siendo estadísticamente significativos, el resto de los extractos no presentó dicha actividad. Los resultados se muestran a continuación en la figura 11.

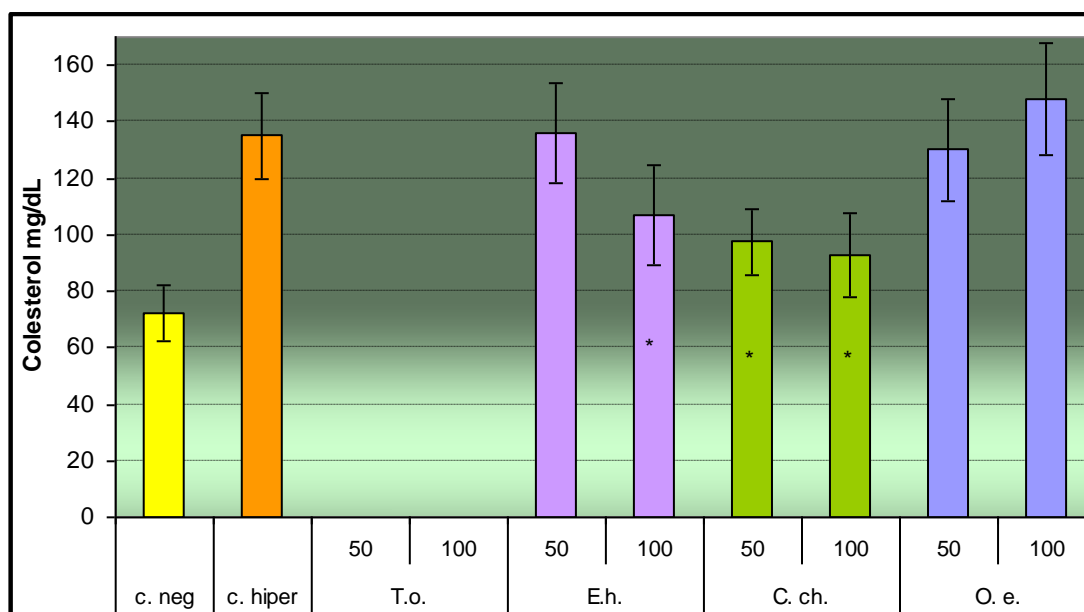


Fig. 11. Actividad hipocolesterolémica de extractos disueltos en agua, en mg/kg de peso (T.o: (*T. officinale*, E.h: *E. heterophyllum*, C.ch: *C. chayamansa*, O.e: *O. europea*) (* p < 0.01 vs control hipercolesterolémico, Tukey).

7.3.2 Extractos disueltos en Tween 80/solución salina (1:9)

En la figura 12 se muestra el efecto de la dieta sobre la concentración de colesterol en el suero de ratones, estos resultados demuestran que la dieta incrementa el colesterol independientemente del vehículo utilizado.

Los resultados obtenidos para los extractos etanólico y metanólico de todas las plantas estudiadas se presentan en la tabla VI, el extracto etanólico de *E. heterophyllum* a 50 mg/kg de peso y el extracto metanólico de *C. chayamansa* a 50 y 100 mg/kg de peso mostraron reducción en los niveles de colesterol al compararlos con el control hipercolesterolémico sin embargo esta diferencia no fue significativa.

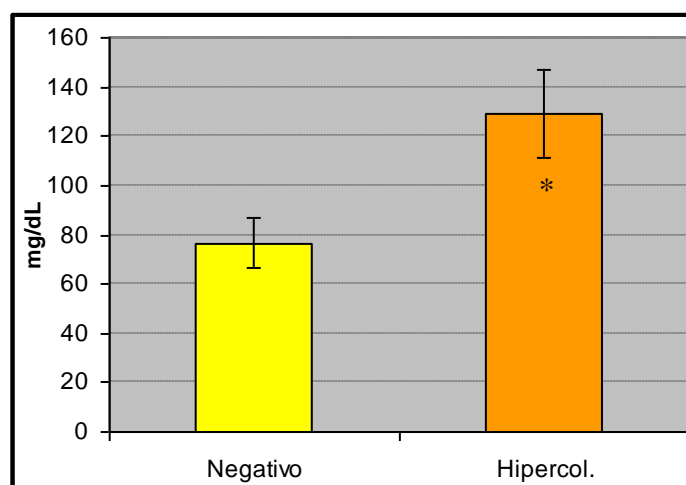


Fig. 12. Concentración de colesterol en grupos control, vehículo utilizado Tween/solución salina (* $p < 0.01$ Tukey).

Tabla VI Actividad hipocolesterolémica de extractos metanólicos y etanólicos, disueltos en Tween 80.

Planta	Extracto (mg/kg)	Colesterol Promedio (mg/dl)	% disminución
<i>Taraxacum officinale</i>	Met-50	NR	-
	Met-100	NR	-
	Eta-50	ND	-
	Eta-100	ND	-
<i>Eryngium heterophyllum</i>	Met-50	121.3	5.9*
	Met-100	132.5	-2.8
	Eta-50	103	20.1*
	Eta-100	122	5.4*
<i>Cnidioscolus chayamansa</i>	Met-50	104	19.3*
	Met-100	94.7	26.5*
	Eta-50	118	8.5*
	Eta-100	130	-0.9
<i>Olea europaea</i>	Met-50	126	2.2*
	Met-100	119	7.7*
	Eta-50	217	-68
	Eta-100	129	-0.1

NR: no realizado por toxicidad del extracto en los ratones, ND: no determinado por muerte de los ratones (* $p > 0.05$, Tukey).

7.4 Ensayo *in vitro* de la actividad hipocolesterolémica de los extractos

Los resultados de los extractos activos en el modelo animal se muestran a continuación en las figuras 13 y 14 se observa que *C. chayamansa* no causó una disminución significativa en el crecimiento de las células Vero cuando se adicionó a 5 dosis diferentes (1000, 700, 500, 250 y 125 $\mu\text{g/mL}$), por lo que se descartó para la siguiente fase del estudio.

Por el contrario en la figura 15 y 16 podemos observar que el extracto acuoso de *E. heterophyllum* cuando se aplicó a las dosis antes mencionadas tuvo un efecto significativo sobre el crecimiento de las células Vero, es decir inhibiendo el crecimiento debido tal vez al bloqueo de la síntesis del colesterol.

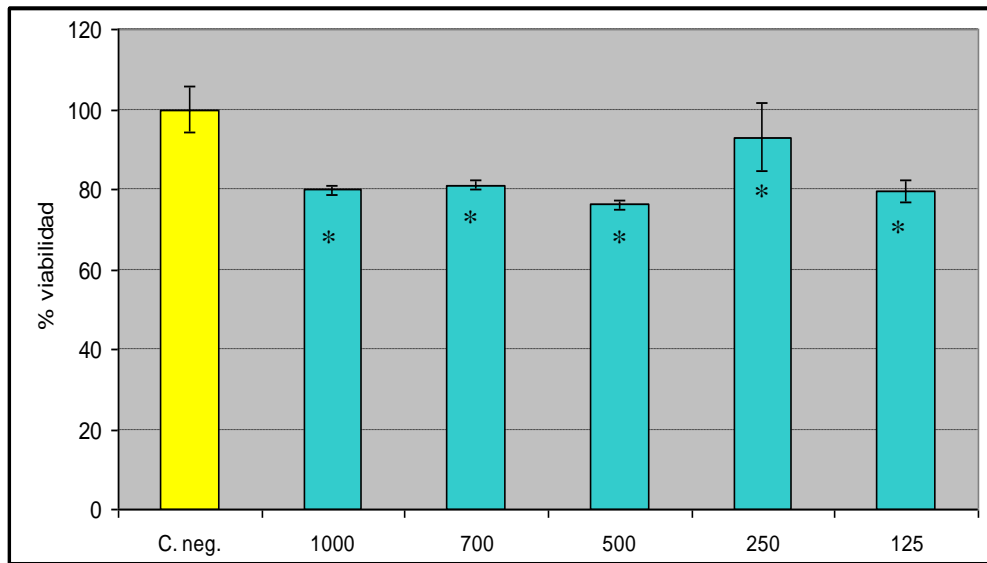


Fig. 13. Efecto del extracto acuoso de *C. chayamansa* sobre el crecimiento de células Vero, 5,000 cels/pozo (* $p > 0.05$ vs control, Tukey).

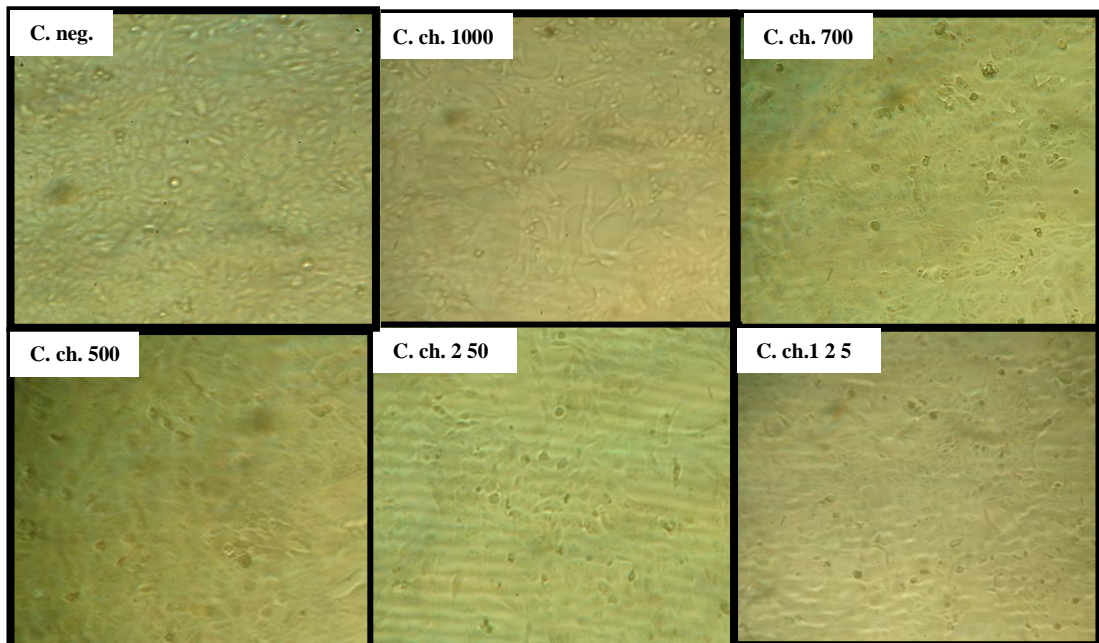


Fig. 14. Efecto del extracto acuoso de *C. chayamansa* sobre células Vero. Se indican las concentraciones ensayadas en $\mu\text{g/mL}$.

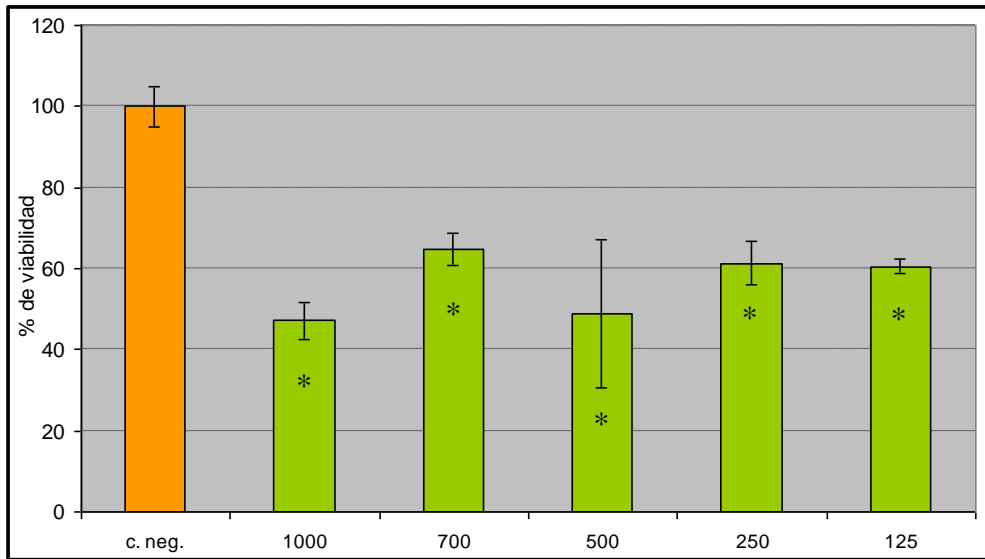


Fig 15. Efecto del extracto acuoso de *E. heterophyllum* sobre el crecimiento de células Vero.5,000 cels/pozo (* $p < 0.01$ vs control, Tukey).

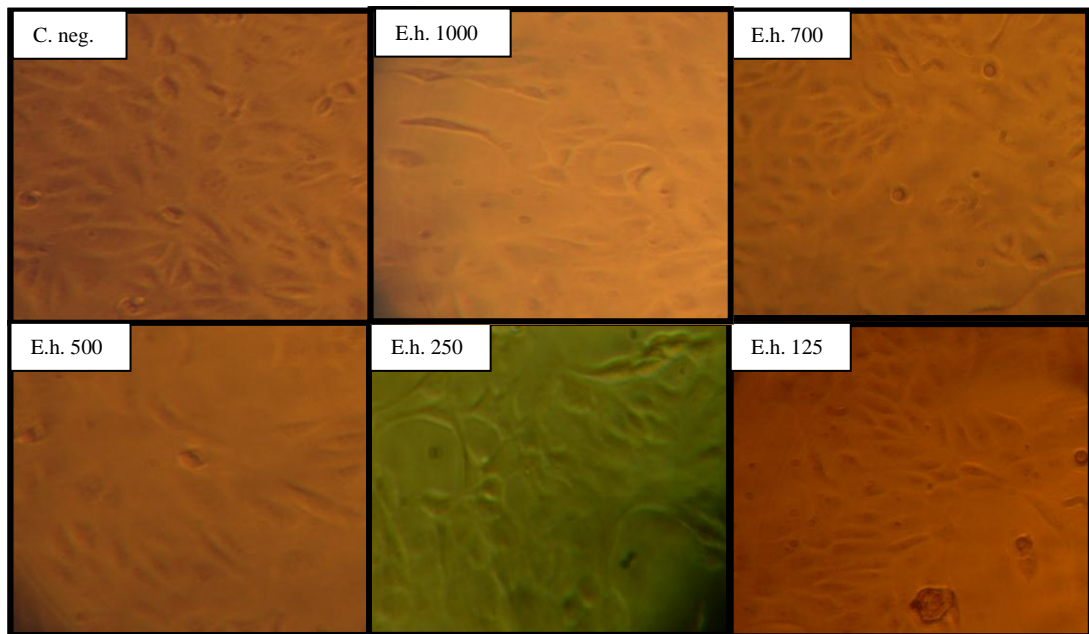


Fig. 16. Efecto del extracto acuoso de *E. heterophyllum* sobre células Vero 5,000 cels/ pozo

7.4.1 Determinación de la inhibición de la HMG-CoA reductasa

En la figura 17 se muestra los resultados obtenidos para la pravastatina 100 μM sobre el crecimiento de las células Vero, podemos observar que causó una disminución en el crecimiento celular de aproximadamente 50 % y que este daño fue revertido al adicionar mevalonato 2.5 mM, un precursor de la síntesis del colesterol

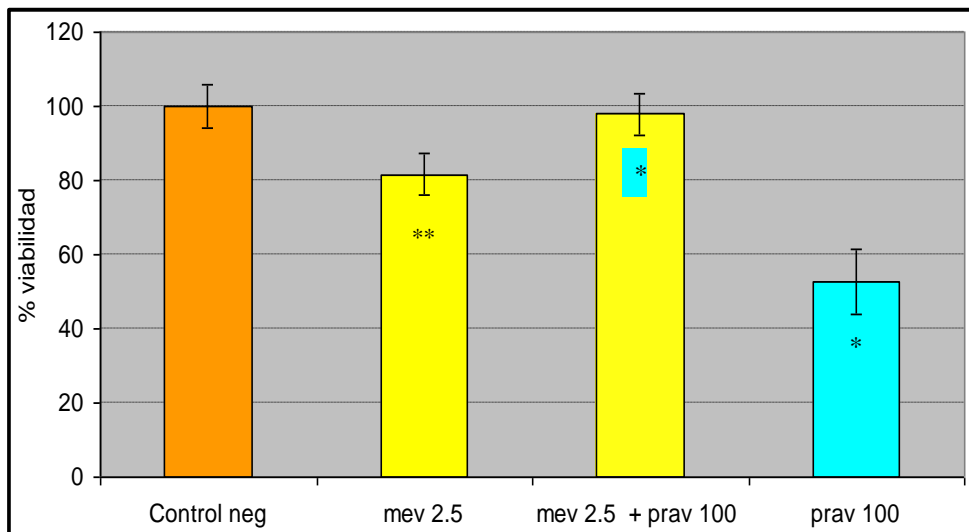


Fig. 17. Efecto de la pravastatina y del mevalonato sobre el crecimiento de células Vero, 5000 cel/100 μL . (* $p < 0.01$ vs control, ** $: p > 0.05$ vs control).

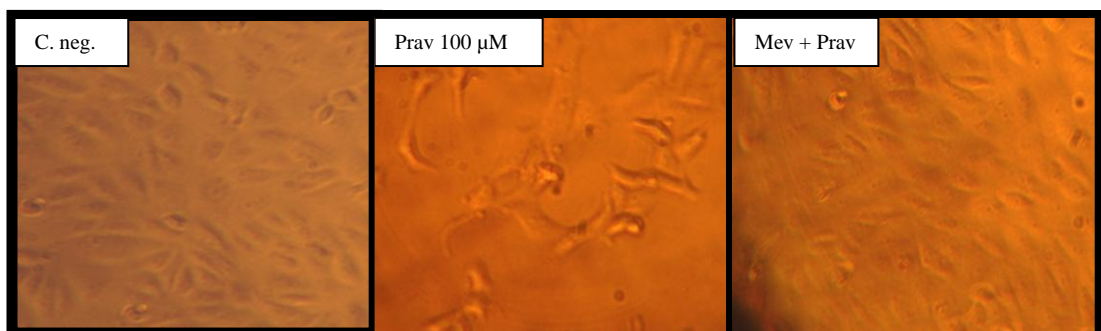


Fig. 18. Efecto citotóxico de la pravastatina 100 μM sobre el crecimiento células Vero así como la reversión del mismo al adicionar mevalonato.

El extracto de *E. heterophyllum* se ensayó adicionando mevalonato para ver si existía reversión del efecto que el extracto por sí solo tenía y se colocó como control positivo de inhibición de la enzima la pravastatina a 100 μ M.

Los resultados se muestran a continuación en la figura 19 y nos indican que la adición de mevalonato revierte los efectos causados por el extracto de *E. heterophyllum* a todas las dosis ensayadas.

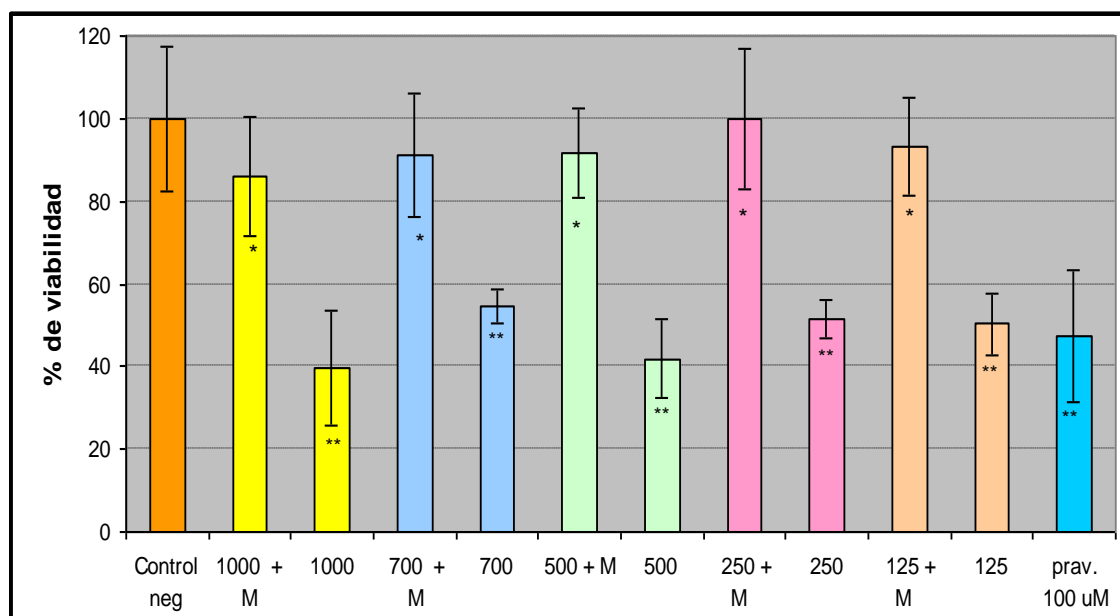


Fig. 19. Efecto de la combinación de *E. heterophyllum* más mevalonato sobre crecimiento de células Vero, 5000 cels/100 μ L, M= mevalonato 2.5 mM (* $p > 0.05$ vs control neg., ** $p < 0.01$ vs control neg., Tukey).

7.5 Determinación de grupos funcionales

Los resultados de las reacciones químicas (Tabla VII) sugieren la presencia de los siguientes tipos de compuestos en los extractos: Los 3 extractos de *T. officinale* (T.o.) mostraron la presencia de alcaloides, oxhidrilos fenólicos e insaturaciones, y la presencia de esteroides solamente en los extractos etanólico y metanólico.

E. heterophyllum (E.h.) evidenció la presencia de alcaloides, cumarinas y oxhidrilos fenólicos en el extracto acuoso y la presencia de cumarinas en el metanólico.

Para *C. chayamansa* (C.ch.) se presentaron solamente alcaloides en el extracto acuoso y etanólico y oxhidrilos fenólicos en el etanólico y metanólico.

O. europaea (O.e.) mostró la presencia de oxhidrilos fenólicos en los tres extractos, alcaloides en el extracto acuoso y esteroides en el extracto metanólico.

Tabla VII.- Grupos funcionales presentes en los doce extractos obtenidos

Planta	Extr.	Alcal.	Cuma.	Flavon.	Sesqui.	Esterol.	Carboh	Ox. Fen.	Insat.
T. o.	Acu	+	-	-	-	-	-	+	+
	Eta	+	-	-	-	+	+	+	+
	Meta	+	-	-	-	+	+	+	+
E. h.	Acu	+	+	-	-	-	-	+	-
	Eta	-	-	-	-	-	+	-	-
	Meta	-	+	-	-	-	+	-	-
C. Ch.	Acu	+	-	-	-	-	-	-	+
	Eta	+	-	-	-	-	+	+	+
	Meta	-	-	-	-	-	+	+	+
O. e.	Acu	+	-	-	-	-	-	+	+
	Eta	-	-	-	-	-	-	+	+
	Meta	-	-	-	-	+	+	+	+

8. DISCUSIÓN

Las enfermedades cardiovasculares en México se han reportado como la primera causa de muerte y es una problemática que ha ido en aumento a pesar de los tratamientos oficiales establecidos (INEGI 2006), por lo que se investigó el efecto hipocolesterolémico de plantas reportadas en la literatura popular con esta actividad seleccionando cuatro de ellas. Se realizaron tres diferentes extractos utilizando la parte de la planta que la literatura propone con tal efecto: a) extracto acuoso en forma de infusión b) extractos metanólico y c) etanólico los cuales se obtuvieron por agitación constante a temperatura ambiente (Domínguez, 1973). En total se obtuvieron 12 extractos con porcentajes de rendimiento muy variables; siendo los de mayor rendimiento el acuoso de *C. chayamansa* con 36.2 %, el extracto acuoso, metanólico y etanólico de *O. europaea* con 25.72, 22 y 21 % respectivamente, y el de menor rendimiento el extracto acuoso de *T. officinale* con 0.63 %.

Para determinar la toxicidad de los extractos se realizó el ensayo de Letalidad en *A. salina*, el cual se ha utilizado ampliamente como un bioensayo simple para la selección de extractos crudos con potencial biológico en muchos laboratorios, debido a que se ha demostrado que este crustáceo (*A. salina*) es sensible a un amplio rango de compuestos con actividad biológica (Couladis *et al.*, 2002; Meyer *et al.*, 1982; González *et al.*, 2007). Además Lagarto Parra y colaboradores en el 2001, realizaron un estudio comparativo del ensayo de Letalidad en *A. salina* contra el ensayo *in vivo* en ratones sobre la toxicidad de extractos crudos, encontrando una buena correlación

entre los dos ensayos, por lo que ellos proponen este ensayo de letalidad como una herramienta útil para predecir la toxicidad oral aguda en ratones. Los resultados obtenidos con las plantas probadas en este trabajo concuerdan con lo reportado por estos autores en todos los extractos ensayados, excepto el de *T. officinale* ya que este no mostró toxicidad en *Artemia salina* pero si presentó toxicidad en los ratones, causando mortalidad, comportamiento anormal y efecto laxante; en consecuencia no podemos asumir que el ensayo de letalidad sobre *A. salina* sea una prueba definitiva para determinar la toxicidad oral aguda en ratones de extractos de plantas.

Con respecto a la evaluación de la efectividad de los extractos para disminuir el colesterol, se han reportado numerosos estudios utilizando distintos modelos como lo demuestran los estudios de Yokozawa *et al.*, (2003), Kuwabara *et al.*, (2007), Aksoy *et al.*, (2007) y Chamorro *et al.*, (1999) en los cuales se utilizaron ratas; Hao Li *et al.*, (2007) utilizaron ratones; Piyachaturawat *et al.*, (1999) y Carr *et al.*, (2005) demostraron el efecto de plantas con actividad hipocolesterolémica en hámsteres. En la presente investigación se utilizó la técnica propuesta por Garduño *et al.*, en 1997 y Cruz *et al.*, en el 2001, para lo cual los extractos crudos obtenidos de las cuatro plantas se administraron a ratones machos Balb/c, a los cuales se les indujo a un cuadro de hipercolesterolemia mediante la ingestión de una dieta basal enriquecida con lípidos y colesterol durante 5 días. En 1990 el Dr. Estrada evaluó el efecto hipocolesterolémico de *E. heterophyllum* en ratas Wistar normocolesterolémicas, el encontró que el extracto acuoso disminuía el colesterol un 20 % y el metanólico un 27 % y que no había diferencia significativa cuando lo administraron a las 24 horas y a los 5 días. En esta investigación se determinó que el extracto acuoso de *E. heterophyllum* mostró disminución en los niveles de colesterol en el suero semejante

a los resultados reportados por Estrada y col. (1990), utilizando una variante en la técnica, ya que en este estudio el extracto se administró a ratones hipercolesterolémicos y la dieta rica en colesterol no fue retirada durante los 5 días que duró el ensayo; sin embargo para el extracto metanólico nuestros resultados difieren de los reportados por Estrada y colaboradores ya que solamente encontramos un 5.9 % de disminución de colesterol debido tal vez a la diferencia en la preparación de los extractos, ya que ellos refieren el extracto metanólico como una infusión, es decir aplicando calor y en nuestro caso se preparó solamente por agitación a temperatura ambiente, además la dosis empleada por el equipo de Estrada fue de 10 mg/kg de peso y en el presente estudio se evaluaron las concentraciones de 50 y 100 mg/kg de peso, es decir una dosis más elevada, pudiendo eso causar la diferencia entre los dos ensayos. Además del extracto acuoso de *E. heterophyllum*, el extracto acuoso de *C. chayamansa* fue efectivo para disminuir el colesterol, ya que se obtuvo una disminución de 27.9 % y 31.1 % en las dos dosis empleadas respectivamente. El resto de los extractos de todas las plantas no presentaron la actividad buscada por lo que se descartaron para la siguiente etapa del estudio.

En la actualidad se dispone de varias opciones para tratar la hipercolesterolemia; los fármacos que suelen usarse con este objetivo comprenden secuestradores de ácidos biliares, ácido nicotínico (niacina), fibratos e inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa. Estos últimos inhibidores se han denominado estatinas o vastatinas y son los fármacos más eficaces disponibles (Liu *et al.*, 2002), ya que la transformación de HMG-CoA a mevalonato representa uno de los pasos claves en la ruta metabólica de la síntesis de colesterol (Saravanan *et al.*, 2007). Basándose en los resultados obtenidos de actividad hipocolesterolémica,

solamente los extractos acuosos de *E. heterophyllum* y *C. chayamansa* se utilizaron en el ensayo para determinar la efectividad de los mismos para inhibir a la enzima HMG-CoA reductasa, a fin de definir el mecanismo de acción de los extractos y compararlo con el de las estatinas.

Para determinar la inhibición de la HMG-CoA reductasa, se han reportado diferentes métodos: 1) utilizando microsomas obtenidos de hígado de ratas alimentadas con dieta normal suplementada con 5 % de colestiramina, aislando la enzima HMG-CoA reductasa para observar la inhibición de la misma previa incubación con el extracto de prueba (Rodríguez Paez *et al.*, (2003); Jung-Ah *et al.*, (2005); Weidong *et al.*, (2007); 2) midiendo la actividad de ésta enzima en cultivo de fibroblastos e incorporando acetato de sodio y ácido mevalónico ambos marcados radiactivamente para finalmente hacer una evaluación de los esteroides radiactivos, lo que la hace ser una técnica costosa y laboriosa (Menéndez *et al.*, 2001); 3) determinando la inhibición de la HMG-CoA en cultivo de células Vero por un método espectrofotométrico utilizando metilosnilina al 0.5 % (Chang *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002).

En el presente estudio se siguió un protocolo similar al propuesto por Chang *et al.*, solo que la determinación de la proliferación celular se realizó con el reactivo WST-1, el cual es también un ensayo colorimétrico, no radiactivo, de cuantificación espectrofotométrica y que se basa en la degradación de las sales de tetrazolium a sales de formazan, mediante la acción de las deshidrogenasas mitocondriales, que se producen de forma natural cuando las células son viables (Roche, 2002). Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en la actualidad con éxito en la evaluación de compuestos con actividad citotóxica, debido a que es más sensible, rápida y sencilla cuando la comparamos con las técnicas antes mencionadas. Con respecto a los

controles utilizados en este ensayo, como control de crecimiento se utilizaron las células solamente con medio de cultivo y como control positivo de inhibición de la enzima HMG-CoA se utilizó la pravastatina. Para seleccionar la concentración de pravastatina a utilizar, se midió la proliferación celular bajo diferentes dosis, determinando DL₅₀ en 100 µM, por lo que se eligió esa concentración para nuestros ensayos. Este método presenta la ventaja de que este tipo de células muestra un buen crecimiento en pocos días y que podemos analizar varios extractos al mismo tiempo. Los resultados obtenidos con esta técnica indicaron que el extracto acuoso de *C. chayamansa* no tuvo efecto sobre el crecimiento celular a ninguna de las dosis ensayadas al no haber diferencia significativa ($p > 0.05$) contra el control negativo de la inhibición de la enzima, por lo que la disminución del colesterol observada en el modelo *in vivo* podría ser por alguno de los otros mecanismos reportados para otros compuestos como son: disminuyendo la absorción del colesterol (Sobolová *et al.*, 2006), inhibiendo otra enzima diferente a la HMG-CoA de la ruta metabólica (Sungwon *et al.*, 2007), incrementando los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Ogawa *et al.*, 2005), evitando la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Kempaiah *et al.*, 2005), entre otras. Por el contrario el extracto acuoso de *E. heterophyllum* mostró una marcada citotoxicidad sobre las células cuando se administró a las mismas dosis, siendo esta altamente significativa ($p < 0.01$) al compararla con el control negativo de la inhibición de la enzima y no habiendo diferencia significativa al compararla con la pravastatina 100 µM (control positivo de la inhibición de la enzima). Por lo tanto este extracto se analizó nuevamente con la misma metodología pero adicionando mevalonato, un precursor de la síntesis del colesterol. Los resultados mostraron que hubo una reversión del daño celular aún cuando el extracto estaba presente, esto significa que el extracto inhibió la actividad

de la enzima HMG-Co-A reductasa ya que al estar presente el mevalonato la síntesis del colesterol se lleva a cabo y la proliferación celular se recupera.

Adicionalmente se analizaron fitoquímicamente los extractos crudos de todas las plantas, para lo cual se utilizaron reacciones coloridas a fin de determinar la presencia de metabolitos de importancia biológica. Los extractos que resultaron activos en el modelo *in vivo*, indican la presencia de compuestos como alcaloides, cumarinas y oxhidrilos fenólicos en *E. heterophyllum*, y de alcaloides en el extracto acuoso de *C. chayamansa*, cabe mencionar que estos metabolitos han sido reportados con efecto hipocolesterolémico para otras plantas (Sobolová *et al.*, 2006; Nagasako *et al.*, 2007; Choi *et al.*, 2007; Hoult *et al.*, 1996; Ogawa *et al.*, 2005; Kempaiah *et al.*, 2005).

La actividad encontrada en el extracto acuoso de *C. chayamansa* y *E. heterophyllum* nos permite considerarlas como plantas medicinales con potencial para disminuir la concentración de colesterol plasmático, es necesario continuar los estudios para identificar el o los compuestos responsables de dicha actividad para posteriormente validar su utilización a nivel clínico en pacientes con problemas de este tipo.

9. CONCLUSIONES

- De los extractos de *Taraxacum officinale*, *Eryngium heterophyllum*, *Cnidioscolus chayamansa* y *Olea europea* probados como hipocolesterolémicos, solo los extractos acuosos de *E. heterophyllum* a 100 mg/kg de peso y *C. chayamansa* a 50 y 100 mg/kg de peso fueron eficientes para bajar significativamente el colesterol en un modelo de ratón Balb/c hipercolesterolémico, con disminución de 20.7, 27.9 y 31.1 % respectivamente.
- El mecanismo mediante el cual *E. heterophyllum* disminuye el colesterol es similar al de los fármacos estatinas, es decir inhibiendo la HMG-Co-A reductasa
- La disminución del colesterol por *C. chayamansa* es por un mecanismo diferente al de las estatinas.
- De las cuatro plantas seleccionadas para el estudio solamente el extracto metanólico de *O. europaea* resultó ser tóxico sobre *Artemia salina*
- Los resultados obtenidos validan el uso de *C. chayamansa* y *E. heterophyllum* en medicina tradicional en el tratamiento de la hipercolesterolemia
- Los extractos activos presentaron alcaloides en el caso de *C. chayamansa* y oxhidrilos fenólicos, alcaloides y cumarinas para *E. heterophyllum*.

9. LITERATURA CITADA

Abe I, Seki T, Noguchi H, Kashiwada Y. 2000. Gallolyl esters from rhubarb are potent inhibitors of squalene epoxidase, a key enzyme in cholesterol biosynthesis. *Planta Medica* 66(8):753-756.

Adams MR, Golden DL, Chen H, Register TC, Gugger ET. 2006. A Diet Rich in Green and Yellow Vegetables Inhibits Atherosclerosis in Mice. *Journal of Nutrition* 136(10):1886-1889.

Adeneye AA, Amole OO, Adeneye AK. 2006. Hypoglycemic and hypocholesterolemic activities of the aqueous leaf and seed extract *Phyllanthus amarus* in mice. *Fitoterapia* 77(7-8):511-514.

Aksoy N, Aksoy M, Bagci C, Gergerlioglu HS, Celik H, Herken E, Yaman A, Tarakcioglu M, Soydinc S, Sari I, Davutoglu V. 2007. Pistachio Intake Increases High Density Lipoprotein Levels and Inhibits Low-Density Lipoprotein Oxidation in Rats. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 212:43-48.

Alonso J. 2007. Tratado de fitofármacos y nutracéuticos. 1º. Reimpresión corregida. Ed. Corpus. pp. 384-388 : 780-783.

Berrada Y, Settaf A, Baddouri K, Cherrah A, Hassar M. 2000. Experimental evidence of an antihypertensive and hypocholesterolemic effect of oil of argan, *Argania sideroxylon*. *Therapie* 55(3):375-378.

Bierhorst D. 1971. Morphology of vascular plants. Editorial Heath and Company. pp. 270-275, 509.

Bioquimic:

<http://www.canal-h.net/webs/sgonzalez002/Bioquimic/SINTCOLE.htmrate>

Bose KSC, Agrawal BK. 2007. Effect of lycopene from cooked tomatoes on serum antioxidant enzymes, lipid peroxidation and lipid profile in coronary heart disease. *Singapore Medical Journal* 48(5):415.

Campbell MK, Farrel SO. 2004. Bioquímica. 4ª. Edición. Editorial Thomson. pp. 601-613.

Carr TP, Weller CL, Schlegel VL, Cuppett SL, Guderian DM, Johnson KR. 2005. Grain Sorghum Lipid extracts Reduces Cholesterol Absorption and Plasma Non-HDL Cholesterol Concentration in Hamsters. *Journal of Nutrition* 135(16):2236-2240.

Cervera P, Clapes J, Rigolfas R. 1999. Alimentación y Dietoterapia. Mc. Graw Hill. 3ª. Edición, España. pp. 221-226.

Couladis M, Badisa RB, Baziou P, Chaudhuri SK, Pilarinou E, Verykokidou E, Harvala C. 2002. Antioxidant and cytotoxic activities of *Hypericum* sp. on brine shrimps and human cancer cell lines. *Phytotherapy Research* 16(8):719-722.

Cruz A, Garduño L, Salazar M, Martínez E, Díaz F, Chamorro G, Tamariz J. 2001. High Hypolipidemic Activity of Saturated Side-Chain α -asarone Medicinal Chemistry Research 10(9):587-595.

Chamorro G, Madrigal E, Ruiz LE, Salazar M. Dominant lethal study of α -asarone in male and female rats after short-term treatment. 1999. *Medical Science Research* 27:337-339.

Chang JJ, Chen T, Chan P, Chen Y. 2001. The in Vitro Inhibitory Effect of Tannin Derivatives on 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Reductase on Vero Cells. *Pharmacology* 62:224-228.

Domínguez X.A. 1973. Métodos de Investigación Fitoquímica. Editorial LIMUSA. pp.33.

Domínguez X.A. 1982. Química Orgánica Experimental. Editorial LIMUSA. pp.76-86.

DSalud. 2006
http://www.dsalud.com/fitoterapia_numero25.htm.

Duane WC. 1997. Effects of legume consumption on serum cholesterol, biliary lipids and sterol metabolism in humans. *Journal of Lipid Research* 38(6):1120-1128.

Dwivedi S, Gupta D, Sharma K. 2000. Modification of coronary risk factors by medicinal plants. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences* 22(1B):616-620.

Estrada E, Navarrete A, Niño D, Reyes B, Sixtos C, Aguirre E. 1990. On The Hypocholesterolemic effect of *Eryngium heterophyllum*. *Fitoterapia* 12(1):182-184.

Galati EM, Montforte MT, Forestieri AM, Miceli N, Bade A, Trovato A. 1999. *Salvadora persica*. Hypolipidemic activity on experimental hypercholesterolemia in rat. *Phytomedicine* 6(3):181-185.

Garduño L, Salazar M, Salazar S, Morelo ME, Labarrios F, Tamariz J, Chamorro GA. 1997. Hypolipidemic activity of α -asarone in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 55:161-163.

González AM, Presa M, Latorre MG, Lurá MC. 2007. Detection of fungal metabolites showing toxic activity through *Artemia salina* bioassay. *Revista Iberoamericana de Micología* 24(1):59-61.

González MM. 1998. Plantas Medicinales del Noreste de México. IMSS. Monterrey México. pp.5-6.

Gotto A.M., Pownall H.J. Havel R.J. 2000. Introduction to the plasma lipoproteins. Londres Academic Press. 3-41.

Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Goodman A. 1996. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica .Mc. Graw Hill Interamericana. pp. 938.

Hao L, Wang Q, Zhu D, Yang Y. 2007. Reinoside C, a Triterpene Saponin of *Polygala aureocauda* Dunn, exerts Hypolipidemic Effect on Hyperlipidemic Mice. Phytoterapy Research. Published online in Wiley Interscience DOI: 10.1002/ptr.2262

Hoult JR, Paya M. 1996. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: products with therapeutic potential. General Pharmacology 27(4):713-722.

Hsu YM, Lai ChH, Chang ChY, Fan ChT, Chen ChT, Wu ChH. 2008. Characterizing the Lipid-Lowering Effects and Antioxidant Mechanisms of Tomato Paste. Bioscience Biotechnology and Biochemistry 72(3):677-685.

Ismail MF, Gad MZ, Hamdy MA. 1999. Study of the hypolipidemic properties of pectin, garlic and ginseng in hypercholesterolemic rabbits. Pharmacological Research 39(2):157-166.

INEGI:

<http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/espanol/rutinas/ept.asp?t=mpob107&c=14742>

INI. 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana. 1ª. Edición. México. pp. 571-572.

Jung KA, Song TCh, Han D, Kim IH, Kim YE, Lee ChH. 2005. Cardiovascular Protective Properties of Kiwifruit Extracts *in Vitro*. Biological and Pharmaceutical Bulletin 28(9):1782-1785.

Kempaiah RK, Manjunatha H, SXrinivasan K. 2005. Protective effect of dietary capsaicin on induced oxidation of low-density lipoprotein in rats. Molecular and Cellular Biochemistry 275(1-2):7-13.

Kojuri J, Vosoughi AR, Akrami M. 2007. Effects of anethum graveolens and garlic on lipid profile in hyperlipidemic patients. Lipids in Health and Disease 6:5.

Kuwabara T, Han KH, Hashimoto N, Yamauchi H, Shimada K, Sekikawa M, Fukushima M. 2007. Tartary Buckwheat Sprout Powder Lowers Plasma Cholesterol Level in Rats. Journal of Nutritional Science and Vitaminology 53:501-507.

Kuti JO, Kuti HO.1999. Proximate composition and mineral content of two edible species of *Cnidioscolus* (tree spinach). Plant Foods for Human Nutrition 53:275-283.

Kuti JO, Konuru HB. 2004. Antioxidant Capacity and Phenolic Content in Leaf Extracts of Tree Spinach (*Cnidocolus* spp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:117-121.

Lagarto Parra A, Yhebra RS, Sardiñas IG, Iglesias L. 2001. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant. *Phytomedicine* 8(5):395-400.

Liu JCh, Chan P, Hsu FL, Chen YJ, Hsich MH, Lo MY, Lin JY. 2002. The *In Vitro* Inhibitory Effects of Crude Extracts of Traditional Chinese Herbs on 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase on Vero Cells. *The American journal of Chinese medicine* 30(4):629-636.

Lau Benjamin. 2006. Suppression of LDL Oxidation by Garlic Compounds Is a Possible Mechanism of Cardiovascular Health Benefit. *The Journal of Nutrition* 765S-768S.

Mahan LK, Escott-Stump S. 1998. *Nutrición y Dietoterapia de Krause*. Mc. Graw Hill. 9ª. Edición, España. pp. 525-533.

McLaughlin JL, Chang Ch, Smith DL. 1988. "Simple bioassays for the detection and isolation of bioactive natural products". Department of Medicinal Chemistry and Pharmacognosy, School of Pharmacy and Pharmacol Sciences. Purdue University, West Lafayette, IN 47907, USA.

Menéndez R, Amor AM, Rodeiro I, González RM, González PC, Alfonso JL, Más R. 2001. Inhibition of Cholesterol Biosynthesis In Cultured Fibroblasts by D003, a Mixture of Very Long, Chain Saturated Fatty Acids. *Pharmacological Research* 44(4):299-304.

Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica* 45(5):31-34.

Nagasako Y, Kanda T, Ohtake Y, Shimasaki H, Kobayashi T. 2007. Apple Polyphenols influence Cholesterol Metabolism in Healthy Subjects with Relatively High Body Mass Index. *Journal of Oleo Science* 56(8):417-428.

Naumann E, van Rees AB, Önning, Öste R, Wydra M, Mensik R. 2006. β -Glucan incorporated into a fruit drink effectively lowers serum LDL-cholesterol concentrations. *The American Journal of Clinical Nutrition* 83:601-605.

Nelson D.L., Cox M.M. 2005. *Lehninger Principios de Bioquímica*. 4ª. Edición. Editorial Omega. pp. 816-829.

Notimex:

<http://mx.news.yahoo.com/031113/7/148ul.html>.

Ogawa H, Nakamura R, Baba K. 2005. Beneficial Effect of Laseripina, a Coumarin Compound from *Angelica keskei*, on Lipid Metabolism in Stroke-Prone

Spontaneously Hypertensive Rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 32:1104-1109.

Pakdee P, Kinjo K, Tako M, Hongo F, Tomita Y, Yaga S. Utilization of tropical biomass resources. I. Effect of galactomannan from *Leucaena leucocephala* de Wit seed to cholesterol-lowering in rats. *Nettai Nogyo* 39(1):47-53.

Phil-Sun O, Sei-Jung L, Kye-Taek L. 2006. Hypolipidemic and Antioxidative Effects of the Plant Glycoprotein (36 kDa) from *Rhus verniciflua* Stokes Fruit in Triton WR-1339-Induced Hypolipidemic Mice. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 70(2):447-456.

Piyachaturawat P, Charoenpiboonsin J, Toskulkao C, Suksamrarn A. 1999. Reduction of plasma cholesterol by *Curcuma comosa* extract in hypercholesterolemic hamsters. *Journal of Ethnopharmacology* 66(2):199-204.

Rahman K, Lowe GM. 2006. Garlic and Cardiovascular Disease: A Critical Review. *The Journal of Nutrition* 736S-740S.

Roche. 2002. Versión 6. Catálogo No. 1644807

Rodríguez Paez M, Juárez SM, Antunez J, Baeza I, Wong C. 2003. [alpha]-asarone inhibits HMG-CoA reductase, lowers serum LDL-cholesterol levels and reduces biliary CSI in hypercholesterolemic rats. (Cholesterol saturation index). *Phytomedicine* 10(5):397-398.

Rosa CO, Costa NM, Nunes RM, Leal PF. 1998. The cholesterol-lowering effect of black, carioquinha and red beans (*Phaseolus vulgaris*, L.) in hypercholesterolemic rats. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 48(4):306-310.

Ross-Ibarra, Jeffrey. *Mexican Studies / Estudios Mexicanos*, Vol. 19, No. 2 (Summer, 2003), pp. 287-302.

Sang-Woo K, Sang-Kyu P, Sung-Il K, Han-Chul K, Han-Jin O, Chul-Young B, Dong-Ho B. 2003. Hypocholesterolemic Property of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* Extracts in Human Body. *Archives of Pharmacal Research* 26(12):1042-1046.

Saraswathi NT, Gnanam FD. 1997. Effect of Medicinal plants on the crystallization of cholesterol. *Journal of Crystal Growth* 179 (3/4):611-617.

Saravanan S, Srikumar R, Manikandan S, Jeya N, Sheela R. 2007. Hypolipidemic Effect of Triphala in Experimentally Induced Hypercholesterolemic Rats. *Yakugaku Zasshi* 127(2):385-388.

Sharma A, Mathur R, Dixit VP. 1995. Hypocholesterolemic activity of nut shell extract of *Semecarpus anacardium* (Bhilawa) in cholesterol fed rabbits. *Indian Journal of Experimental Biology* 33(6):444-448.

Sobolová L, Skottová N, Vecera R, Urbánek K. 2006. Effect of silymarin and polyphenolic fraction on cholesterol absorption in rats. *Pharmacological Research* 53:104-112.

Spigelski D, Jones PJ. 2001. Efficacy of garlic supplementation in lowering serum cholesterol levels. *Nutrition Reviews* 59(7):236-241.

Subbiah MT, Norman EJ. 2002. Rain forest plant extract with cellular cholesterol lowering properties. University of Cincinnati, USA, 8pp. CODEN: USXXAM.

Sun-Won, Nam Y, Soon A, Dong K, Jae L, Dae K, Seung P, Byung K, Moo B. 2007. Isolation and Structural Determination of Squalene Synthase Inhibitor from *Prunus mume* Fruit. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 17(12):1970-1975.

Visavadiya NP, Narasimhacharya AVL. 2007. Hypocholesterolemic and antioxidants effects of *Withania somnifera* (Dunal) in hypercholesterolemic rats. *Phytomedicine* 14(2007):136-142.

Wächtershäuser A, Akoglu B, Stein J. 2001. HMG-CoA reductase inhibitor mevastatin enhances the growth inhibitory effect of butyrate in the colorectal carcinoma cell line Caco-2. *Carcinogenesis* 22(7):1061-1067.

Wang HX, Ng TB. 1999. Natural Products with hypoglycemic, hypotensive, hypocholesterolemic, antiatherosclerotic and antithrombotic activities. *Life Sciences* 65(25):2663-2677.

Weidong X, Wang W, Su H, Xing D, Cai G, Du L. 2007. Hypolipidemic Mechanisms of *Ananas comosus* L. Leaves in Mice: Different From Fibrates but Similar to Statins. *Journal of Pharmacological Sciences* 103:267-274.

Yokozawa T, Ishida A, Cho EJ, Nakagawa T. 2003. The effects of coptidis Rhizoma extract on a hypercholesterolemic animal model. *Phytomedicine* 10:17-22.

Zulet MA, Martínez JA. 1995. Corrective role of chickpea intake on a dietary-induced model of hypercholesterolemia. *Plant Foods for Human Nutrition* 48(3):269-277.

RESUMEN CURRICULAR

Candidato para obtener el Grado de Doctor en Ciencias
con acentuación en Química de Productos Naturales

M.C. Lylia Graciela Miranda Velásquez

ACTIVIDAD HIPOCOLESTEROLÉMICA DE PLANTAS DE USO ETNOBOTÁNICO EN MÉXICO.

Campo de estudio: Productos naturales con actividad biológica

Datos personales:

Nacionalidad: Mexicana

Lugar de Nacimiento: Ciudad Obregón, Sonora

Puesto actual: Asociado B de tiempo completo, Facultad de Ciencias Biológicas,
UANL

Estudios realizados:

Licenciatura en Químico Bacteriólogo Parasitólogo, Facultad de Ciencias Biológicas,
UANL, 1980-1985

Maestría en Ciencias con especialidad en Alimentos, Facultad de Ciencias
Biológicas, UANL, 1992-1995

Premios: 2º. Lugar en el Concurso Estatal de Investigación en Salud, en el área
enfermedades endócrinas, nutricionales y metabólicas, organizado por SSA en
Diciembre de 2009.

Publicaciones:

Miranda Velásquez Lylia, Abelardo Chávez Montes, Azucena Oranday Cárdenas,
Mireya Villanueva Cuéllar, Gerardo Lozano Garza, Delia Cruz Vega. 2006.
Actividad Hipocolesterolémica de extractos de *Eryngium heterophyllum*. RESPYN,
vol. 9, ISSN: 1879-0160.

Miranda Velásquez Lylia, Oranday Cárdenas Azucena, Rivas Morales Catalina,
Chávez Montes Abelardo, Cruz Vega Delia, Lozano Garza Gerardo. 2007.
Determinación de actividad hipocolesterolémica y toxicidad sobre *Artemia salina* de
extractos de *Eryngium heterophyllum*. Tópicos Selectos de Botánica 3.

Lylia Miranda Velásquez, Azucena Oranday Cárdenas, Gerardo Lozano Garza, Abelardo Chávez Montes, Catalina Rivas Morales, Delia Cruz Vega. 2007. Actividad Hipocolesterolémica de *Cnidocolus chayamansa*. Revista Latinoamericana de Química, Vol. 35, ISSN: 0370-5943

Miranda Velásquez LG, Cruz Vega DE, Oranday Cárdenas A, Rivas Morales C, Rodríguez Arzave J, Verde Star J. 2009. *Extractos de amaranto y su efecto como hipocolesterolémico. RESPYN, vol. 10, ISSN: 1879-0160.*

4 **Hypocholesterolemic Activity from the Leaf Extracts**
5 **of *Cnidioscolus chayamansa***

6 **Lylli Miranda-Velasquez · Azucena Oranday-Cardenas · Hector Lozano-Garza ·**
7 **Catalina Rivas-Morales · German Chamorro-Cevallos · De la Cruz-Vega**

8 © Springer Science+Business Media, LLC 2010

11 **Abstract** The aim of this study was to determine the
12 hypocholesterolemic activity of *Cnidioscolus chayamansa*.
13 In an *in vivo* model, high-cholesterol diet administered to
14 mice Balb/c induced hypercholesterolemia. Three extracts
15 from *Cnidioscolus chayamansa* (ethanol, methanol and an
16 aqueous extract) were tested on hypercholesterolemic mice.
17 Active extracts were assessed against the *in vitro* inhibitory
18 activity of the same three extracts on the HMG-CoA
19 reductase enzyme was tested by using Vero cells. The
20 specific chemical groups present in the phytochemical
21 extracts were also determined. Only the aqueous extract
22 (at either doses employed) showed a significant cholesterol
23 reduction (27.9 and 31.1%, for 50 and 100 mg kg⁻¹,
24 respectively *P*<0.01). The extract did not inhibit the
25 HMG-CoA reductase enzyme, suggesting that its com-
26 pounds act at another level in cholesterol metabolism.

Reactions to secondary metabolites indicate the presence of
alkaloids in the aqueous and ethanol extracts and phenol
hydroxylic in the ethanol and methanol extracts.

Keywords Cholesterol · *Cnidioscolus chayamansa* · HMG-
CoA reductase · Hypocholesterolemic · Vero cells

Abbreviations

ATCC	American type culture collection	35
°C	Celsius degrees	38
CHD	Coronary heart disease	39
CVD	Cardiovascular disease	40
g	grams	43
HDL	High-density lipoprotein	44
HFD	High-fat diet	46
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase	48
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social	52
kg	kilogram	55
LDL	Low-density lipoprotein	56
µg	micrograms	58
µL	microliters	60
µM	micromolar	62
mL	milliliters	63
ND	normal diet	66
WST-1	tetrazolium salt	68

L. Miranda-Velasquez · A. Oranday-Cardenas · C. Rivas-Morales
Facultad de Ciencias Biológicas,
Universidad Autónoma de Nuevo León,
Pedro de Alba s/n Cd. Universitaria,
66450, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, Mexico

H. Lozano-Garza
Centro de Investigación Biomédica del Noroeste, IMSS,
2 de Abril y San Luis Potosí, Col. Independencia,
64720, Monterrey, Nuevo León, Mexico

G. Chamorro-Cevallos
Instituto Nacional de Ciencias Biológicas,
Instituto Politécnico Nacional,
Plan Ayala y Prof. Carpio s/n, Col. Cam de Santo Tomás,
11340, Mexico, DF, Mexico

D. Cruz-Vega (✉)
Escuela de Medicina, CITEA,
3ª Pta, ITISM. Morenos Prieto 3000 Pte, Col Los Doctores,
CP 64710, Monterrey, NL, Mexico
email: slva_cruz2000@yahoo.com

Introduction

Coronary heart disease (CHD) is a major health problem in
developed and developing countries [1, 2]. Diverse primary
and secondary intervention trials to lower serum cholesterol
in humans have resulted in significant reduction of

75	coronary events and death. One therapy involves the	062-ZOO-1999) regarding technical specifications for	122
76	inhibition of cholesterol production, such as with pravastatin	production, care and use of laboratory animals [14].	123
77	and other 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A		
78	reported (HMG-CoA) reductase inhibitors [3]. Therefore,	Preparation of Plant Extracts	124
79	the development of new inhibitors of cholesterol synthesis		
80	is still common in the pharmaceutical industry [4].	Organic: 30 g of dried and ground plant material were placed	125
81	In drug discovery and development, medicinal herbs	in 500-mL flasks with 250 mL of each solvent (methanol and	126
82	are consistently considered the leading source of pharmaco-	ethanol). The flasks were sealed with rubber stoppers and	127
83	chemicals employed in the treatment of several human	stirred for 4 days on a shaker at room temperature. The	128
84	diseases because of their high chemical diversity and	contents were then filtered through Whatman #1 paper and the	129
85	broad biological functionality [5]. The tree spinach	filtrate evaporated in an oven at 40 °C. Extracts obtained were	130
86	(<i>Cordia alliodora</i> McVaugh) called 'chaya' (from	weighed and kept refrigerated until analysis. Tween80/saline	131
87	the Mayan 'chay' [6], is popular in Mexico and Central	1:9 v/v was used to dissolve the extracts used for the <i>in vivo</i>	132
88	America and has been introduced into the United States	testing. Aqueous: The aqueous extract was obtained by	133
89	(mainly southern Texas and Florida) for potential use as a	placing 30 g of the ground plant in a liter of boiling water.	134
90	leafy vegetable and/or as a medicinal plant by the Hispanic	After 1 min, the container was withdrawn from the flame,	135
91	populations. The therapeutic benefits of chaya tea related	covered and let stand for 20 min and then filtered using	136
92	to noninsulin-dependent diabetes mellitus symptomatology	Whatman #1 paper. The filtrate was lyophilized, weighed	137
93	have been studied [7–9]. Numerous studies have	and stored at –20 °C. Distilled water was used to dissolve the	138
94	evaluated the effectiveness of plants as hypocholesterolemic	extract for the <i>in vivo</i> testing.	139
95	agents. These studies involve different animal models		
96	Yokozawa et al. [10] and Kawabata et al. [11] used rats; Li	Hypocholesterolemic Activity Assays	140
97	et al. [12] used mice; and Carr et al. [13] demonstrated the		
98	hypocholesterolemic effect of <i>argemone</i> grains in hamsters.	This test followed the methods proposed by Gandia et al.	141
99	The present study was undertaken to determine the	[15]. Balb/c male mice were fed <i>ad libitum</i> a high-	142
100	hypocholesterolemic activity <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> of three	cholesterol diet (cholesterol 1%, sodium cholate 0.5%,	143
101	extracts of <i>Cordia alliodora</i> —ethanol, methanol	butter 5%, sucrose 30.0%, casein 10%, laboratory chow	144
102	and aqueous.	53.55% for 5 days, prepared from a powdered basal diet	145
		(Nutricibus Purina, Mexico D.F.). This group was designat-	146
103	Materials and Methods	ed the high-fat diet (HFD). Mice fed only with	147
		laboratory chow for the same duration were used as the	148
104	Plant Material	normal diet control group (ND). The aqueous extract (ACe)	149
		was dissolved in water and the organic extracts in a mixture	150
105	Leaves of <i>C. alliodora</i> were collected at the mature	of Tween80/saline (1:9), and administered through gastric	151
106	stage, from Ciénega de Flores, Nuevo Leon during June of	intubation at doses of 50 and 100 mg/kg ⁻¹ once a day for	152
107	2008. The botanical identification and authentication was	the duration of the experiment. Solution concentrations	153
108	confirmed at the Department of Botany, the Autonomous	were adjusted so that a 30 g mouse would receive 0.15 mL.	154
109	University of Nuevo Leon (Voucher no. F.024187); the	Mice in the ND group received a similar volume. At the	155
110	leaves were air dried at room temperature and then ground.	end of 5 days, each animal was fasted for 12–15 h and	156
		anesthetized with ether. Blood samples were collected	157
111	Animals	through ocular puncture and the total cholesterol was	158
		determined using an automated analyzer.	159
112	Balb/c male mice weighing 25–28 g procured from	HMG-CoA Reductase Inhibition Assays	160
113	Biomedical Research Center of the Northwest IMSS,		
114	Mexico, were used in this study. The animals were housed	For this determination, we used Vero cells, an established cell	161
115	in hanging metal cages (five in each cage) and maintained	line from kidney cells of the African green monkey (ATCC	162
116	at a temperature of 24±2 °C, 45% relative humidity and	CCL-81). The cells were cultured (37 °C, humidified 5% CO ₂	163
117	12 h light/dark cycles (lights on at 8 am). The animals were	atmosphere) and maintained as a monolayer in M-199	164
118	fed <i>ad libitum</i> with the different treatments. All experi-	culture medium supplemented with 5% FCS v/v and 1%	165
119	ments were carried out in accordance with the Laboratory	Penicillin/Streptomycin, and were passages when 80% con-	166
120	of the Animal Care Committee of our Institution and in	fluent with trypsin 0.25%. Vero cells (3 × 10 ⁵ cells) in	167
121	compliance with the Official Mexican Regulations (NOM-	100 µL of the above mixture, were inoculated in each well	168

169 of a set of microplates and incubated for 24 h, then 100 μ L
 170 of the extracts at different dilutions (0, 125, 250, 500, 700
 171 and 1000 μ g mL⁻¹) were added to the wells. Pravastatin
 172 100 μ M was used as a positive control for the inhibition of
 173 the enzyme HMG-CoA reductase. Vero cells were incubated
 174 for 48 h, and the number of viable cells per well was
 175 determined using the WST-1 (Roche Molecular Biochem-
 176 icals, Mannheim, Germany) assay and the absorbance (Abs)
 177 value at 545 nm wavelength was plotted. Abs₅₄₅ nm values
 178 have a linear relationship with the number of viable cells. An
 179 average of three wells per plate were used to determine the
 180 number of cells per well for each experiment.

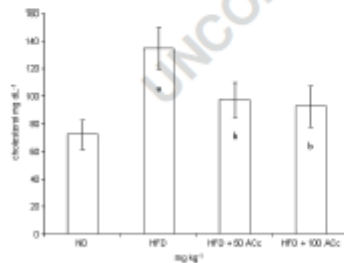
181 Specific chemical reactions were conducted for the
 182 identification of secondary metabolites and functional
 183 groups.

184 Statistical Analysis

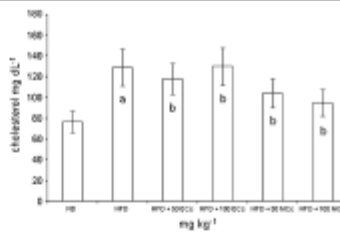
185 Data are the mean \pm SEM of five animals per group, and
 186 the statistical significance between groups was determined
 187 by one-way analysis of variance followed by the Tukey
 188 test. Analysis was carried out using SPSS version 10.0
 189 (SPSS, Chicago, IL, USA). The differences between groups
 190 were regarded as significant at $P < 0.05$ and $P < 0.01$.

191 Results and Discussion

192 In this study, we used the technique proposed by Cardillo
 193 et al. [10], to administer the crude extracts of *C*



194 Fig. 1 Effect of the *C. chayamusa* extract on serum cholesterol in
 195 Balb/c mice. There were four groups of animals: those fed a normal
 196 diet (ND), a high cholesterol diet without *C. chayamusa* treatment
 197 (HFD), and a high cholesterol diet with administration of the aqueous
 198 extract (ACc) at two doses (50 and 100 mg kg⁻¹). Data are the means
 199 \pm SE obtained from seven to nine mice. * $P < 0.01$ represents a
 200 significant difference in relation to the control (ND). ^b $P < 0.01$
 201 represents a significant difference in relation to the control (HFD)



202 Fig. 2 Effect of the *C. chayamusa* ethanol (CC) and methanol
 203 (MC) extracts on serum cholesterol in Balb/c mice. There were six
 204 groups of animals: those fed a normal diet (ND), a high cholesterol
 205 diet without *C. chayamusa* treatment (HFD), a high cholesterol diet
 206 with two different doses of methanol, and a high cholesterol diet with
 207 two different doses of ethanol. Data are the means \pm SE obtained from
 208 eight to 10 mice. * $P < 0.01$ represents a significant difference in
 209 relation to the control (ND). ^b $P > 0.05$ not significantly different from
 210 the untreated control with a (HFD)

211 *chayamusa* to Balb/c male mice in a special diet that
 212 caused hypercholesterolemia. The results showed that the
 213 lipid-enriched diet was effective in increasing cholesterol
 214 by approximately 50–60% regardless of the vehicle (Figs. 1
 215 and 2). The aqueous extract of *C. chayamusa* at doses of
 216 50 and 100 mg kg⁻¹ showed a statistically significant
 217 decrease in cholesterol (of 27.9 and 31.1%, respectively;
 218 $P < 0.01$) when compared with the HFD control (Fig. 1), but
 219 is not dose dependent. The organic extracts at the same
 220 doses showed no effect (Fig. 2). These results support the
 221

222 Table 1 Effect of the Chloroform *chayamusa* aqueous extract on
 223 Vero cell viability at 0 (control), 125, 250, 500, 700, and 1000 μ g
 224 mL⁻¹

Compound	Conc. μ g mL ⁻¹	% V. Vero cells
Control	0 ^a	100
Aqueous extract	125 ^a	79.50
	250 ^a	93.10
	500 ^a	76.20
	700 ^a	81.90
	1000 ^a	79.90
Pravastatin	100 ^{b,4}	47.47

225 Pravastatin was used as positive control for inhibition of HMG-CoA
 226 reductase enzyme.

227 Values are expressed as mean \pm SE obtained from three trials.

228 ^aM-199 medium only

229 ^b μ M

230 ^cNot significantly difference from control ($P > 0.05$)

231 ^dHigh significantly difference from control ($P < 0.01$)

204 use of this herb for the treatment of cholesterol when used
205 as an infusion.

206 The aqueous extract of *C. chayamorus* was tested in
207 Vero cell cultures, which have been used as a model for the
208 study of natural compounds on the inhibition of HMG-CoA
209 reductase. This enzyme is rate limiting in the synthesis of
210 endogenous cholesterol [3], suggesting that the formation
211 of cholesterol is necessary for cell growth, meaning that the
212 inhibition of HMG-CoA reductase leads to inhibition of
213 such growth. The inhibition of the enzyme by the aqueous
214 extract of *C. chayamorus* was investigated by adding
215 various concentrations of Vero cell culture to determine
216 cell viability. The results showed no cell growth inhibition
217 by the aqueous extract of *C. chayamorus* at the doses tested
218 ($P>0.05$) (Table 1), unlike the positive control assay done
219 with pravastatin. The latter compound is developed from
220 natural products, is reported as a potent inhibitor of HMG-
221 CoA reductase [16]. These results suggest that compounds
222 in the aqueous extract of *C. chayamorus* act at another
223 level in cholesterol metabolism rather than by the inhibition
224 of HMG-CoA reductase [17, 18].

225 The phytochemical tests in the aqueous extract of *C.*
226 *chayamorus* only proved the presence of alkaloids that
227 could be responsible for the hypocholesterolemic activity
228 found, an effect that has been reported for other alkaloids
229 [19, 20].

230 Conclusion

231 Our data suggest that the Mexican plant tested has
232 important hypocholesterolemic properties and merits fur-
233 ther studies on the clinical applications of these plant
234 extracts.

235 Acknowledgments We thank QFB Meyra A. Cuellar Milanesa
236 for support in the determination of cholesterol and Centro de
237 Investigación Biotecnológica del Noroeste, IMSS, Mexico for laboratory
238 support. This work is part of the doctoral thesis of the MSc. Lydia
239 Graciela Miranda Velazquez, CONACYT Scholarship, No. 187994.

240 References

243 1. Kerchoff DA, Brouss F, Hommes G, Masak RP (2002) Effects
244 on the human serum lipoprotein profile of β -glucan, soy protein
245 and wolfenone, plant sterols and stanols, garlic and tocotrienols. *J*
246 *Nutr* 132:2494–2505
247 2. Martinoyan DM, Miroshchichenko LA, Kislakova SN, Pogozova
248 AV, Zolotarev VI (2007) Assessment of application for coronary
249 heart disease and hypertension. *Lipids Health Dis* 6:1
250

250 3. Hyoung-Jong K, Dae-Hyoung L, Yoo-Yeon H, K+Sung L, Jong-
251 Soo I. (2005) Characterization of β -hydroxy- β -methylglutaryl
252 coenzyme A reductase inhibitor from *Platycodon grandiflorus*. *J*
253 *Agric Food Chem* 53:5882–5888
254 4. Chang JJ, Chen T, Chan F, Chen Y (2001) The *in vitro* inhibitory
255 effect of tannin derivatives on 3-hydroxy-3-methylglutaryl coen-
256 zyme A reductase on vero cells. *Pharmacology* 62:224–228
257 5. Adeneye AA, Amole GO, Adeneye AK (2006) Hypoglycemic
258 and hypocholesterolemic activities of the aqueous leaf and seed
259 extract *Phyllanthus amarus* in mice. *Fitoterapia* 77(7–8):511–514
260 6. Baltes PG (2008) *Herbolarios Mayas*, 1^a Edición. Yucatan, Mex:
261 Medisano editores del Mayab
262 7. Kuri KI, Kuri HO (1999) Proximate composition and mineral
263 content of two edible species of *Coldasacola* (tree spinach). *Plant*
264 *Foods Hum Nutr* 53:275–283
265 8. Kuri JC, Konoa HD (2004) Antioxidant capacity and phenolic
266 content in leaf extracts of tree spinach (*Coldasacola* spp.). *J Agric*
267 *Food Chem* 52:117–121
268 9. Lourenco GA, Mendonça S, Raymundo-Camacho R (2010) Antioxi-
269 dant, antidiabetic, and antihypertensive activities of soluble fraction
270 from *Coldasacola chayamorus* M. Vaugh. *J Food Sci* 75(2):8168–
271 72
272 10. Yokoyama T, Ishida A, Cho JJ, Nakagawa T (2003) The effects of
273 *Coptidis Rhizoma* extract on a hypocholesterolemic animal model.
274 *Phytochemistry* 10:17–22
275 11. Kawahara T, Han HB, Hashimoto N, Yamachi H, Shimada K,
276 Sekikawa M, Fukushiro M (2007) Tertiary buckwheat sprout
277 powder lowers plasma cholesterol level in rats. *J Nutr Sci*
278 *Nutrmetab* 53:501–507
279 12. Li H, Wang QJ, Zhu DM, Yang Y (2008) Rahnioleide C, a
280 triterpene saponin of *Polypodium savoskoides* Diels, exerts hypo-
281 lipidemic effect on hyperlipidemic mice. *Phytother Res* 22:159–64
282 13. Carr TP, Weller CL, Schlegel VL, Cuppett SL, Chakerin DM,
283 Johnson KE (2005) Grain sorghum lipid extract reduces
284 cholesterol absorption and plasma non-HDL cholesterol concen-
285 tration in humans. *J Nutr* 135(9):2236–2240
286 14. Norma Oficial Mexicana-062-2003 (1999) Especificaciones técni-
287 cas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.
288 Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y
289 Alimentación. Estados Unidos Mexicanos
290 15. Garbafalo L, Salazar M, Salazar S, Morán ME, Labarrios F,
291 Tamate J, Chamorro GA (1997) Hypolipidemic activity of *ca-*
292 *caurone* in mice. *J Ethnopharmacol* 55:161–163
293 16. Ezido A (2004) The discovery and development of HMG-CoA
294 reductase inhibitors. *Atherosclerosis Suppl* 5:67–80
295 17. Inami S, Takano M, Yamamoto M, Murakami D, Tajika K,
296 Yodogawa K, Yokoyama S, Ohno N, Ohta T, Sano J, Inaki CH,
297 Seino Y, Mizuno K (2007) The caudex consumption reduces
298 circulating oxidized low-density lipoprotein. *Int Heart J* 48
299 (6):725–732
300 18. Abidi P, Chan W, Kraemer FB, Li H, Liu J (2006) The medicinal
301 plant ginkgolide is a natural LDL-lowering agent with multiple
302 bioactive components and new-action mechanisms. *J Lipid Res*
303 47:2134–2147
304 19. Kumpkarn RK, Marjanzatha H, Sriwisan K (2005) Protective
305 effect of dietary capsaicin on induced oxidative of low-density
306 lipoprotein in rats. *Mol Cell Biochem* 275(1–2):7–13
307 20. Ciocco AT, Rovati LC, Santolar 1 (2007) Lipidemic effects of
308 berberine administered alone or in combination with other natural
309 cholesterol-lowering agents. A single-blind clinical investigation.
310 *Arzneimittelforschung* 57(1):26–30
311