



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN
ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA
CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA



Capacidad antioxidante *in vitro* de *Valeriana microphylla* y *Valeriana plantaginea* en células cancerígenas

Trabajo de Titulación, Modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención de título de Ingeniera Bioquímica, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Este estudio forma parte del proyecto de investigación Estudio etnobotánico y bioensayos de plantas medicinales relacionadas con el tratamiento de cáncer de cérvix en la ciudad de Ambato, provincia de Tungurahua, Ecuador, aprobado con resolución: 0904-CU-P-2018, dirigido por la Dra. Yenddy Carrero

Autor: Erika Jazmín Moreta Pacha.

Tutor: Dr. José Homero Vargas López, PhD.

Co tutor: Dra. Yenddy Naygith Carrero Castillo, PhD

AMBATO-ECUADOR

ENERO 2021

APROBACIÓN DE LOS TUTORES

Dr. José Homero Vargas López, PhD.

Dra. Yenddy Nayghit Carrero Castillo, PhD.

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizamos la presentación de este Trabajo de Titulación bajo la modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología

Ambato, 21 de diciembre del 2020

Dr. Homero Vargas López, PhD.

C.I. 180197804-8

TUTOR

Dra. Yenddy Carrero Castillo. PhD.

C.I. 175740457-7

COTUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Erika Jazmín Moreta Pacha, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniería Bioquímica, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Erika Jazmín Moreta Pacha

C.I. 180468326-4

AUTORA

APROBACION DE TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación o Experiencias prácticas de investigación y/o intervención, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato

Para constancia firman:

Presidente del tribunal

Ing. Mario Daniel García Solís, PhD.

C.I. 110360547-1

Dra. Lorena de los Ángeles Núñez Villacis

C.I. 180425690-5

Ambato, 11 de enero del 2021

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Trabajo de Titulación o parte de él, un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando los derechos de autor.



Erika Jazmín Moreta Pacha

C.I. 180468326-4

AUTORA

DEDICATORIA

A Dios, por regalarme la vida, por su amor infinito, por encaminarme a ser buena persona, por ayudarme enfrentar cada obstáculo en el transcurso de mi vida, por haber puesto en mi camino personas que han sido mi apoyo incondicional durante mi período de estudio y sobre todo ayudarme a terminar mi carrera.

A mis padres, Lourdes e Isaías, por ser el pilar fundamental en mi vida, por su apoyo incondicional desde mi infancia hasta ahora, por sus consejos, por su paciencia y comprensión en cada etapa de mi vida, además por su trabajo para darnos lo mejor a mi hermano y a mí. A través de estas líneas quiero decir que los quiero mucho y que son la razón para alcanzar mis metas.

A mi hermano, Bryan, para quien trato de ser un buen ejemplo, por estar conmigo en mis buenas y peores momentos, por estar pendiente de mi vida académica, por su paciencia cuando me salía mal las cosas, por aguantar mi genio. Gracias por acompañarme siempre.

A mi tía, Angelica, es mi ejemplo a seguir, que con su perseverancia y sabiduría me ha ayudado a ser una persona de bien, con humildad y propiciando buenos valores; junto a su familia.

A Cristina, por brindarme su amistad desinteresada, por aconsejarme, por estar pendiente de mi en todo momento, por apoyarme incondicionalmente desde pequeña y siempre mimarme.

A mis amigos de la carrera, Jhonny, Jennifer, Jéssica, César, Ruth, Lilibeth, que siempre estuvieron ahí para ayudarme, por sus consejos, alegrías, altas y bajas, por estar pendientes de mi vida académica, por su amistad absoluta durante mi período universitario.

A Darío, Washo, Paulo, Pablo, gracias por brindarme su amistad sincera, ayudarme cuando más lo he necesitado, por sus consejos, por hacerme sonreír.

Los quiero mucho. Dios los bendiga.

AGRADECIMIENTO

Un agradecimiento a la Universidad Técnica de Ambato por haberme contribuido en el ámbito profesional y personal.

A la Facultad Ciencia de la Salud (Querochaca) y la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología por darme la oportunidad de realizar mi parte experimental en sus laboratorios

A mi tutor, Dr. Homero Vargas por permitir ser parte de su grupo de investigación, por su apoyo y guía para culminar mi proyecto.

A la Dra. Yenddy Carrero, gracia por la paciencia y enseñarnos el manejo de los equipos en el laboratorio, por su ayuda durante el desarrollo del proyecto de investigación, por brindarme sus consejos y comprensión sin descanso alguno hasta culminar mi tesis.

Al Dr. Orestes López y al Ing. Fernando Álvarez por brindarme sus consejos, palabras de ánimos en los momentos de tempestad.

ÍNDICE GENERAL

APROBACION DE LOS TUTORES	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	iii
APROBACION DE TRIBUNAL DE GRADO.....	iv
DERECHOS DE AUTOR	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	vii
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
CAPITULO I.....	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS	1
1.1.1 Epidemiología.....	1
1.1.2 Cáncer	2
1.1.3 Cáncer de mama.....	7
1.1.4 Radicales Libres, Inflamación y Cáncer	8
1.1.5 Radicales Libres.....	11
1.1.6 Estrés Oxidativo.....	14
1.1.7 Antioxidantes	15
1.1.7 Plantas medicinales.....	19
1.1.8 Valerianas	20
1.2 OBJETIVOS.....	24
1.2.1 Objetivo General.....	24
1.2.2 Objetivos Específicos	24
CAPITULO II	26
METODOLOGÍA	26
2.1 MATERIALES.....	26
2.1.1 Materia Prima	26
2.1.2 Línea Celular.....	26
2.1.3 Materiales.....	26

2.1.4 Equipos	27
2.1.5 Reactivos.....	28
2.2 MÉTODOS.....	29
2.2.1 Recolección de Especímenes	29
2.2.1 Pulverización de las muestras	29
2.2.2 Cuantificación de sólidos.....	29
2.2.3 Preparación del extracto acuoso para el cultivo celular.....	30
2.2.4 Cuantificación de Proteínas	30
2.2.5 Cultivo Celular.....	31
2.2.6 Ensayos de Citotoxicidad.....	32
2.2.7 Inmunohistoquímica	33
2.2.8 Capacidad Antioxidante.....	34
CAPÍTULO III.....	37
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
3.1 Determinación de solidos solubles totales (SST)	37
3.2 Actividad citotóxica	39
3.2.1 Actividad citotóxica en el extracto acuoso de <i>Valeriana microphylla</i>	39
3.2.2 Actividad citotóxica en el extracto acuoso de <i>Valeriana plantaginea</i>	41
3.3. Actividad antioxidante	44
3.3.1. Método de Griess	44
3.3.2. Capacidad antioxidante equivalente Trolox (TEAC)	45
3.4. Expresión de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) en células MCF-7	47
3.5 Expresión de Anión mitocondrial MITOSOX en células MCF-7.....	50
3.6 Expresión de glutatión en células MCF-7	52
CAPITULO IV.....	56
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	56
4.1 CONCLUSIONES.....	56
4.2 RECOMENDACIONES	57
BIBLIOGRAFÍA	58
ANEXOS	66

Anexo 1. Fotografías de las Hojas/Tallos y Raíces en el proceso de molienda antes (A, B) y después (C, D) de la <i>Valeriana microphylla</i> y <i>Valeriana plantaginea</i>	66
Anexo 2. Fotografías de la preparación del extracto acuoso para el cultivo celular: preparación de extracto (A), filtración (B), evaporación del solvente y determinación de sólidos totales (C), polvo compacto del extracto (D).	66
Anexos 3. Fotografías de cultivo celular MCF7: preparación de los reactivos en el Baño María (A), cultivo celular (B), incubación (C), verificación de células viables en el microscopio (D)	67
Anexo 4. Fotografías de la actividad citotóxica. En placas de 96 pocillos se realizó diluciones seriadas para cada tratamiento.	67
Anexo 5. Fotografías de las pruebas inmunohistoquímicas en placas de 6 pocillos, para cada tratamiento con su respectiva determinación. Cultivo de células y Aplicación de tratamiento (A); lavado y empleo de reactivos CellROS, MITOSOX, Glutation (B); permeabilizar las placas (C, D, E); Lectura de las placas (F, G)	68
Anexo 6. Análisis estadístico	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentración de Sólidos solubles Totales o SST en solución acuosa.....	37
Tabla 2. Anova de Capacidad citotóxica: Análisis estadístico entre la media y desviación estándar de los diferentes tratamientos.	69
Tabla 3. Anova Griess: Análisis estadístico entre la media y desviación estándar de los diferentes tratamientos.....	69
Tabla 4. Anova Trolox: análisis estadístico de los tratamientos entre la media y la desviación estándar.	69

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de daño molecular en proceso de inicio de tumores en inflamación crónica.	11
Figura 2. Generación de Especies reactivas de oxígeno en la mitocondria.	13
Figura 3. Producción intracelular de los productos de la reducción parcial del oxígeno. El radical OH· como agente más dañino para el ADN.	14
Figura 4. Estructura molecular del ácido ascórbico o vitamina C.	18
Figura 5. Estructura molecular del alfa tocoferol.	18
Figura 6. <i>Valeriana plantaginea</i> Kunth.	21
Figura 7. <i>Valeriana microphylla</i> Kunth.	21
Figura 8. Diagrama de barras para diluciones seriada del extracto acuoso hojas-tallos de <i>V. microphylla</i> . Efecto de las diluciones seriadas sobre actividad citotóxica.....	40
Figura 9. Diagrama de barras para diluciones seriada del extracto acuoso de raíz de <i>V. microphylla</i> . Efecto de las diluciones seriadas sobre actividad citotóxica.	41

Figura 10. Diagrama de barras para diluciones seriada del extracto acuoso hojas-tallos de <i>V. plantaginea</i> . Efecto de las diluciones seriadas sobre actividad citotóxica.	41
Figura 11. Diagrama de barras para diluciones seriada del extracto acuoso de raíz de <i>V. plantaginea</i> . Efecto de las diluciones seriadas sobre actividad citotóxica.	42
Figura 12. Gráfico comparativo de las medias de los tratamientos usados para determinar la actividad citotóxica. VM HT (Hojas/Tallos de <i>V. microphylla</i>), VM R (Raíz <i>V. microphylla</i>), VPHT (Hojas/Tallo <i>V. plantaginea</i>) y VPR (Raíz <i>V. plantaginea</i>). $p=0,000$	43
Figura 13. Diagrama de actividad antioxidante usando el método de Gries para determinar la concentración de NO (uM). $*p>0,01$ <i>V. microphylla</i> H/T vs <i>V. plantaginea</i> R ; $**p>0,05$ <i>V. plantaginea</i> H/T vs <i>V. plantaginea</i> R.	44
Figura 14. Diagrama de actividad antioxidante usando el método de Trolox para determinar las unidades Trolox. $*p>0,05$ Control vs <i>V. microphylla</i> H/T	45
Figura 15. Diagrama de expresión de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) en células MCF-7.	47
Figura 16. Expresión de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) en células MFC-7	48
Figura 17. Expresión de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) en células MFC-7	49
Figura 18. Diagrama de expresión de Anión mitocondrial (MITOSOX) en células MCF-7	50
Figura 19. Expresión de anión superóxido (MITOSOX) en la línea celular MFC-7	51
Figura 20. Expresión de glutatión en la línea celular MFC-7	52
Figura 21. Expresión de glutatión en la línea celular MFC-7.....	53
Figura 22. Expresión de glutatión en la línea celular MFC-7	54

RESUMEN

Los radicales libres juegan un papel importante en el metabolismo celular, resultando ser benéficas o mortales para el organismo. Por su naturaleza agresiva, estos pueden contribuir a la génesis del cáncer; sin embargo, existen estrategias de defensa mediante los antioxidantes. Las plantas tienen un rol importante dentro de los recursos terapéuticos, que constituyen agentes bioactivos empleados en laboratorios farmacéuticos en la investigación y propuestas terapéuticas para diversas patologías como el cáncer de mama.

El objetivo de la investigación se basó en determinar la capacidad antioxidante de los extractos de *Valeriana microphylla* y *Valeriana plantaginea* en células MFC-7 (cáncer de mama). Los extractos se realizaron en dos grupos la primera fue la combinación de Hojas/ Tallos y la segunda raíces para cada especie; para la determinación de sólidos totales se utilizó agua como solvente y para el cultivo celular etanol, con los siguientes resultados: los sólidos solubles totales con mejor rendimiento se consiguieron en *Valeriana plantaginea* Hojas/ Tallos. La actividad citotóxica se cuantificó mediante el método MTT; donde el extracto de Hojas/Tallos de *Valeriana plantaginea*, alcanzó el mayor porcentaje. Mediante la tinción inmunohistoquímica, se evidenció la expresión de ROS, MITOSOX, GLUTATION utilizando anticuerpos monoclonales específicos para cada una de las proteínas, las cuales mostraron diferencias significativas en comparación al control. La capacidad antioxidante, se determinó mediante la técnica Trolox mostrando una baja capacidad antioxidante para ambas especies de valerianas. Los hallazgos obtenidos permiten inferir el potencial terapéutico de estas especies de valerianas, sin embargo, debe realizarse estudios complementarios.

Palabras claves

Extractos vegetales, células MFC7, alternativas terapéuticas, capacidad antioxidante, *Valeriana microphylla*, *Valeriana plantaginea*

ABSTRACT

Free radicals play an important role in cell metabolism, proving to be beneficial or deadly for the body. Due to their aggressive nature, these can contribute to the genesis of cancer; however, there are defense strategies using antioxidants. Plants play an important role within therapeutic resources, which are bioactive agents used in pharmaceutical laboratories in research and therapeutic proposals for various pathologies such as breast cancer.

The objective of the research was based on determining the antioxidant capacity of *Valeriana microphylla* and *Valeriana plantaginea* extracts in MFC-7 (breast cancer) cells. The extracts were made in two groups, the first was the combination of Leaves / Stems and the second roots for each species; For the determination of total solids, water was used as a solvent and for cell culture ethanol, with the following results: the total soluble solids with the best performance were obtained in *Valeriana plantaginea* Leaves / Stems. The cytotoxic activity was quantified by the MTT method; where the extract of Leaves / Stems of *Valeriana plantaginea*, reached the highest percentage. Through immunohistochemical staining, the expression of ROS, MITOSOX, GLUTTATION was evidenced using specific monoclonal antibodies for each of the proteins, which show significant differences compared to the control. The antioxidant capacity was determined using the Trolox technique, showing a low antioxidant capacity for both species of valerians. The results allowed us to infer the therapeutic potential of these valerian species, however, complementary studies should be carried out.

Keywords

Plant extracts, MFC7 cells, therapeutic alternatives, antioxidant capacity, *Valeriana microphylla*, *Valeriana plantaginea*

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

A nivel mundial, el cáncer es una de las enfermedades más comunes y que causa mayor número de fallecimientos de los seres humanos. Tiene un gran impacto en la salud pública que conlleva a un problema sanitario de característica epidémica debido a muchos factores, entre ellos: ambientales, hereditarios y alimenticios (OPS, 2020).

Cabe recalcar que, esto ha permitido fomentar el desarrollo de trabajos científicos multidisciplinarios, los cuales han generado grandes aportes (microbiología, bacteriología, bioquímica, genética, entre otras) en pro de la optimización de protocolos terapéuticos y diagnósticos con el fin de reducir el porcentaje de mortalidad (Instituto Nacional de Cancerología-ESE, 2017).

1.1.1 Epidemiología

El cáncer ha provocado millones de defunciones, de los cuales aproximadamente un 70% ocurre en países medios y bajos. Hoy en día se refleja una situación crítica para contraer esta enfermedad, ya que puede iniciarse por la acción de agentes cancerígenos como las irradiaciones (ionizantes o ultravioletas), productos químicos (humo del tabaco, humo de la leña), agentes infecciosos, anormalidades genéticas y factores alimenticios; con una influencia directa en los mecanismos de defensa en el organismo y aumentando la tasa de mortalidad (Garza Jaime, 2014).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial después de las enfermedades cardiovasculares, estimando 9.6 millones de defunciones y 18.7 millones de nuevos casos en el 2018; siendo el cáncer pulmonar, próstata y mamario los tipos de mayor riesgo que causan un elevado número de fallecimientos en hombres y mujeres (Ministerio de Salud, 2020).

En América Latina, el cáncer es un desafío que continúa afectando los sistemas de salud, según los últimos datos disponibles en la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC), en el 2018 se reportaron cifras elevadas, que rondaban aproximadamente los 1.4 millones de nuevos casos y más de 670.000 muertes. Debido al envejecimiento de la población y la transición epidemiológica, para el 2030 se estima un aumento de 2 millones de nuevos casos de cáncer y 980.000 muertes; es decir un aumento de 40% y 46% respectivamente (Silvina French, 2018).

Dentro de las estadísticas el cáncer más común en hombres es el de próstata (21,7%), pulmón (9,5%), colorrectal (8%); en mujeres el principal es el cáncer de mama (25,2%), pulmón (8,5%) en países como Costa Rica, Cuba, Bolivia, Uruguay y Ecuador (Ambrioso, 2020).

En el Ecuador el diagnóstico de cáncer representa un gran reto, ya que trasciende más allá de la problemática médica, afecta las relaciones familiares y sociales del paciente y el riesgo que desarrolla esta neoplasia (Jara & Sanango, 2013).

Según los últimos reportes de la IARC, se calcularon 157,2 casos por 100.000 habitantes en el 2018, siendo el cáncer con mayor frecuencia en hombres el de próstata con 38.8 casos por 100.000 habitantes; mientras que en la mujer es el cáncer de mama con 31.8 casos (GLOBOCAN, 2018).

1.1.2 Cáncer

El cáncer abarca un conjunto de enfermedades que se caracterizan por el desarrollo de células anormales que se esparcen sin control en cualquier parte del organismo. Las células cancerígenas pierden la capacidad para morir y se multiplican hasta formar unas masas denominadas “tumores o neoplasias” cuya expansión puede destruir y sustituir a los tejidos normales (Velasco, 2019).

Existen muchos tipos de cáncer que generalmente llevan el nombre de los órganos en donde se forma la neoplasia, pero hay categorías principales que inician en tipos específicos de células como: El sarcoma que se origina en los huesos, tejidos blandos,

tejidos adiposos, vasos sanguíneos, vasos linfáticos y tejido fibroso. Los carcinomas son los tipos más usuales de cáncer y se forman en células epiteliales. Leucemia que empieza en los tejidos que forma la sangre en la médula ósea. Los tejidos glandulares como las glándulas mamarias y de próstata (Instituto Nacional del cáncer, 2005).

1.1.2.1 Fases y Etapas del cáncer

Etapa 0: también llamada *fase de inducción* es la etapa más larga donde ocurre los primeros cambios celulares; es decir tener características malignas.

Etapa IA: denominada *fase in situ*, se caracteriza por presenciar lesiones cancerosas microscópicas en el tejido originado. En algunos casos no presencia molestias y se puede diagnosticar mediante técnicas que permite su detección precoz (cáncer de mama, cuello uterino o colon).

Etapa IIA: llamada también como la *fase de invasión local*, la lesión comienza a desarrollarse fuera de la localización de origen e invade a otros órganos.

Metástasis: denomina también como *etapa de invasión a distancia*, aparecen lesiones tumorales fuera de su lugar de origen, contaminando otros órganos y tejidos, siendo la sintomatología más compleja.

Etapa IV: *fase terminal*, la enfermedad es avanzada e incurable, no responde a tratamientos que se emplean habitualmente (Asociación Española Contra el Cáncer, 2018).

1.1.2.2 Tratamientos

El objetivo del tratamiento apropiado depende del tipo del tumor, condiciones del paciente y su extensión. Entre las principales modalidades terapéuticas están:

Cirugía

Es uno de los tratamientos más antiguos del cáncer, se emplea en tumores sólidos, localizados en una zona anatómica específica. En ocasiones se utiliza este método para evitar efectos secundarios causados por el tumor. El diagnóstico consiste en extraer un pequeño fragmento del tejido y analizarlo. (American Cancer Society, 2019).

La cirugía se usa generalmente para extirpar crecimientos cancerosos o para obtener pequeñas muestras de tejido para su examen. Para varios tipos de cáncer, la extirpación quirúrgica del tumor puede ser suficiente para curar al paciente. La posibilidad de curación quirúrgica depende del tamaño, la ubicación y el estadio de la enfermedad. Los tipos de cirugía más comunes son:

Cirugía Preventiva (Profiláctica): La cirugía preventiva se usa para extraer tejido del cuerpo que puede convertirse en cáncer, incluso si no hay signos de cáncer en el momento de la cirugía. Por ejemplo, algunas mujeres con un fuerte historial familiar de cáncer de mama tienen cambios genéticos (mutaciones) en los genes del cáncer de mama (llamado BRCA1 o BRCA2) y corren alto riesgo de padecer cáncer de mama, es posible que estas mujeres quieran considerar una mastectomía profiláctica. Esto significa extirpar la mama antes de que se descubra el cáncer (Sociedad Americana contra el Cáncer, 2019).

Cirugía de diagnóstico: La cirugía se realiza a menudo para ayudar a diagnosticar el cáncer. En la mayoría de los casos, la única forma de saber si una persona tiene cáncer y determinar el tipo de cáncer es tomar un trozo de tejido (muestra) y analizarlo. Este procedimiento a menudo se llama biopsia. El diagnóstico se realiza mediante la observación de las células de la muestra al microscopio o mediante otras pruebas de laboratorio realizadas en la muestra (Gobierno de México, 2019).

Cirugía para la clasificación de la etapa: se realiza una cirugía de estadificación del cáncer para determinar el número y la extensión de la propagación del cáncer. Los resultados de los exámenes físicos, las pruebas de laboratorio y las pruebas por imágenes se pueden emplear para determinar el estadio clínico del cáncer. Pero, por lo general, la etapa quirúrgica (también denominada etapa patológica) proporciona la medida más precisa de hasta qué punto se ha diseminado el cáncer. Los ejemplos de procedimientos quirúrgicos que se usan con frecuencia para estadificar el cáncer incluyen laparotomía y laparoscopia (National Cancer Institute, Lasers in Cancer Treatment, 2016).

Cirugía curativa: Por lo general, solo si el cáncer se limita a una parte del cuerpo, se puede realizar una cirugía radical y es posible extirparla por completo. En este caso, la cirugía radical puede ser el tratamiento principal. Puede usarse solo o junto con otros métodos de tratamiento, como quimioterapia o radioterapia, que se pueden realizar antes o después de la cirugía. De hecho, en algunos casos, la radioterapia se aplica durante la cirugía. (Esto se llama radioterapia intraoperatoria).

Cirugía reductora (citorreductora): La cirugía de reducción celular se usa para extirpar parte del cáncer (no todo). Esto a veces se hace cuando la extirpación completa del tumor causa demasiado daño a los órganos o tejidos circundantes. Por ejemplo, se puede utilizar para el cáncer de ovario avanzado y algunos linfomas (National Cancer Institute, Cryosurgery in Cancer Treatment: Questions and Answers., 2016).

Cirugía paliativa: Este tipo de cirugía se realiza para tratar las complicaciones causadas por el cáncer avanzado. Puede usarse para corregir problemas que causan malestar o discapacidad. Por ejemplo, ciertos cánceres de estómago pueden crecer lo suficiente como para bloquear los intestinos. Si esto sucede, se puede utilizar una cirugía para eliminar el bloqueo. Cuando es difícil controlar el dolor por otros medios, la cirugía paliativa también se puede utilizar para tratar el dolor.

Cirugía restaurativa (reconstructiva): Este tipo de cirugía se utiliza para mejorar la apariencia de las personas después de operaciones de cáncer importantes. También se usa para restaurar la función de órganos o partes del cuerpo después de la cirugía. Algunos ejemplos son la reconstrucción mamaria después de una mastectomía, utilizando colgajos de tejido, injertos óseos o materiales protésicos (de metal o plástico) después de una cirugía de cáncer en el área de la cabeza y el cuello (Gobierno de México, 2019).

Radioterapia

Es uno de los métodos más usuales contra el cáncer (30%), puede utilizarse sola o con otros métodos como quimioterapias, hormonas o cirugías. Depende de la localización del cáncer se emplea el tratamiento; la radioterapia interna es una de las más comunes

en utilizarse debido que se dirigen con rayos X desde afuera del cuerpo y la radioterapia interna facilita radiación dentro del organismo con la aplicación de semillas radioactivas que se colocan dentro o cerca del tumor (Cajaraville, Carreras, Massó, & Tamés, 2017).

La radioterapia puede ser de rayos externos o internos. La radioterapia de haz externo requiere una máquina fuera del cuerpo para enfocar la radiación en las células cancerosas. La radioterapia interna es la implantación de radiación en el cuerpo en el cáncer o cerca del mismo (National Cancer Institute (NIH), 2016).

La radiación tiene un efecto secundario, siempre relacionado con el volumen que se irradia. Por tanto, es imposible sobrepasar el campo de radiación y provocar toxicidad. También estará relacionado con la dosis recibida y su grado, el tratamiento acompañante (cirugía o quimioterapia) y la susceptibilidad del individuo (Rotellar, López, & P. Foro Arnalot, 2002).

Quimioterapia

Es uno de los tratamientos más comunes, que se ingiere uno o más fármacos o medicamentos citotóxicos para frenar el crecimiento de las células tumorales hasta que provoque la muerte de estas “apoptosis”. Los fármacos pueden ser de forma oral, inyecciones o directamente vía intravenosa (Armstrong & Dr. Mark Gilbert, 2014).

La quimioterapia actúa deteniendo o retardando el crecimiento de las células cancerosas, que crecen y se dividen rápidamente. Pero esto también daña las células sanas, que pueden crecer y dividirse rápidamente, como las células que recubren la boca y los intestinos o las células que hacen crecer el cabello. El daño a las células sanas puede provocar efectos secundarios. Una vez finalizada la quimioterapia, los efectos secundarios suelen disminuir o desaparecer (NIH National Cancer Institute, 2019).

Terapia Hormonal

Es un método médico de tratamiento del cáncer que usa medicamentos para retardar el crecimiento de ciertos tumores modificando las hormonas (evitando la síntesis de hormonas o cambiando su efecto en ciertas células). Para que la hormonoterapia sea útil los tumores han de presentar en la superficie de sus células receptores para estas hormonas. En las células tumorales portadoras de dichos receptores las hormonas normales suelen funcionar como estimulantes del crecimiento por ello es razonable intentar bloquearlas para detener el avance del cáncer (Zamora Pilar, 2020).

Los tumores que presentan receptores hormonales en la superficie celular son hormono dependientes (es decir, sus hormonas dependientes del crecimiento), y los principales tumores que pueden tratarse con la terapia hormonal son el cáncer de mama y de próstata (Martinez Gilberto, 2004).

1.1.3 Cáncer de mama

El cáncer de mama constituye una enfermedad de alta incidencia a nivel mundial y en Ecuador constituye la primera causa de muertes en mujeres seguido el cáncer de cuello uterino, donde cada año aumentan el número de casos (Verónica Pérez, 2019).

Según la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), el cáncer de mama es una enfermedad donde las células dañinas se multiplican sin control. La mayoría del cáncer de seno son carcinomas, los cuales, son tumores que se originan de las células epiteliales que se encuentran en todo el cuerpo. La formación de carcinomas en el seno se les denomina adenocarcinomas. Esta enfermedad puede comenzar en diferentes partes de la mama, de las cuales constan de tres partes principales: lobulillos (producen leche), conductos (transportan leche al pezón) y tejidos conectivos (formado por tejido fibroso y adiposo). (Society, 2019) Generalmente esta enfermedad se inicia en los conductos o en los lobulillos (Enfermedades, 2018).

El cáncer de mama puede esparcirse fuera de los tejidos mamarios a través de los vasos sanguíneos y los vasos linfáticos. Cuando el cáncer de mama se disemina a otras

localizaciones anatómicas, se denomina metástasis. (Bertrán, 2020) Dependiendo de la propagación del cáncer se divide en: carcinoma in situ (Carcinoma ductal in situ y Carcinoma lobulillar in situ) y carcinoma invasivo (infiltrante) (Society, 2019).

Varios estudios indican que el cáncer de mama puede estar asociado a diversos factores tales como: ambientales, genéticos, contaminación, edad, factores reproductivos, obesidad y radiaciones ionizantes (Médica, 2020). Estos componentes al ser expuestos en el organismo provocan un desequilibrio en el metabolismo celular y los sistemas de defensa antioxidante; es decir, provoca la producción de radicales libres que interactúan con el ADN, las proteínas polisacáridos y lípidos causando lesión celular (Claudia Dorado Martinez, 2003).

Hoy en día, existen diversas formas de tratamientos para el cáncer de mama en las cuales incluye las cirugías, radioterapias, quimioterapias, tratamiento hormonal, tratamiento biológico; pero puede llevar a presentar efectos secundarios perjudiciales tales como la toxicidad del organismo; además cabe recalcar que influye tanto en aspectos psicológicos y psicoemocionales sobre el paciente ante la sociedad. Por lo tanto, organizaciones buscan reducir la tasa de mortalidad que influye este problema de salubridad, además optimizar las técnicas para establecer de un diagnóstico claro, una detección rápida y mejorías en tratamientos (Salinas, 2011).

1.1.4 Radicales Libres, Inflamación y Cáncer

Es importante determinar que el cáncer es un fenómeno multifuncional y en él se describen las tres etapas del desarrollo patológico, inicio, la promoción y el desarrollo del tumor, y los radicales libres juegan un papel importante en todos ellos.

Inicio del proceso neoplásico

La etapa inicial es el resultado del daño continuo del ADN y de los sistemas de reparación que no pueden eliminar bien estas células anómalas. Todo esto ocurre antes del inicio de la síntesis de material genético en la fase S del ciclo celular (fase donde el ADN se replica), que introduce cambios mutagénicos en el ADN de las células

recién generadas. Por tanto, el proceso carcinogénico se debe a la omisión de reparación de bases dañadas o debido a una serie de deleciones o translocaciones relacionadas con roturas de hebras de material genético no reparadas (Gómez Quiróz Luis, 2015).

Estudios demuestran que los radicales libres dañan de forma considerable el ADN, fundamentados en la siguiente observación: El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) induce la rotura cromosómica en presencia de sulfato férrico. Desde entonces, no solo se ha estudiado la interacción entre radicales libres como el ADN, sino también en proteínas, lípidos y ARN. Básicamente, la modificación oxidativa de estas moléculas puede provocar que la homeostasis celular no esté regulada, provocando cáncer; de hecho, se cree que existen aductos en el ADN, como la 8-dihidro-2'-desoxiguanosina que, debido a su alta mutagenicidad en células humanas, sirve como biomarcador de daño oxidativo y carcinogénesis (Durán Hebe Alicia, 1994).

Promoción de tumores

Una vez que comienza la modificación oxidativa del ADN, los radicales libres tienen mayor relevancia y se convierten en reguladores promotores de tumores. La promoción incluye la activación de las vías de transducción de señales que controlan la proliferación, el ciclo celular, la apoptosis o la síntesis de proteínas protectoras (como proteínas antioxidantes o proteínas de choque térmico). Estos incluyen especies reactivas de oxígeno, así como productos de peroxidación de lípidos (Gómez Quiróz Luis, 2015).

En gran medida, la promoción y progresión tumoral causada por especies reactivas de oxígeno depende de la activación de sistemas endógenos que producen estas especies reactivas, como NADPH oxidasa, óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y xantina oxidasa.

Además, iNOS produce cantidades pequeñas de NO^- donde se ha demostrado que es un compuesto que involucra en los procesos carcinógenos mediados por la inflamación crónica. En la actualidad, existe controversia sobre el papel del NO^- en el proceso

carcinogénico, debido a que el papel del NO^\cdot depende de su concentración, la interacción con otros radicales libres, metales y proteínas, tipos de células y dianas genéticas que suelen afectarlo. Estos radicales libres son esenciales para el desarrollo de tumores, por un lado, pueden dañar directamente el ADN y al mismo tiempo brindar protección contra la citotoxicidad, inhibir o promover la proliferación celular y pueden promover o resistir la apoptosis.

Progresión de tumores

La progresión del tumor es la etapa cancerosa, a través de la cual las lesiones benignas se convierten en tumores malignos (Durán Hebe Alicia, 1994). Las especies reactivas de oxígeno ahora funcionan a nivel genómico, induciendo una reordenación del oncogén originalmente mutado, lo que permite que el tumor progrese (Lic. Adonis E. Zorrilla García, 2004).

Inflamación y Radicales libres

El daño crónico causado por agentes infecciosos y bacterias o virus e irritantes pueden desencadenar una respuesta inflamatoria, que se caracteriza por la infiltración de células inmunitarias en el área dañada. Una medida defensiva para eliminar sustancias nocivas y células dañadas es la explosión oxidativa, donde estas células producen radicales libres de oxígeno y nitrógeno. Al iniciar el estrés oxidativo, el daño de las moléculas, en el ADN, proteínas y lípidos prolonga el proceso carcinógeno. La sobrecarga oxidativa es la causa principal para la producción de tumores malignos (Lucía & Muñoz Maira, 2012).

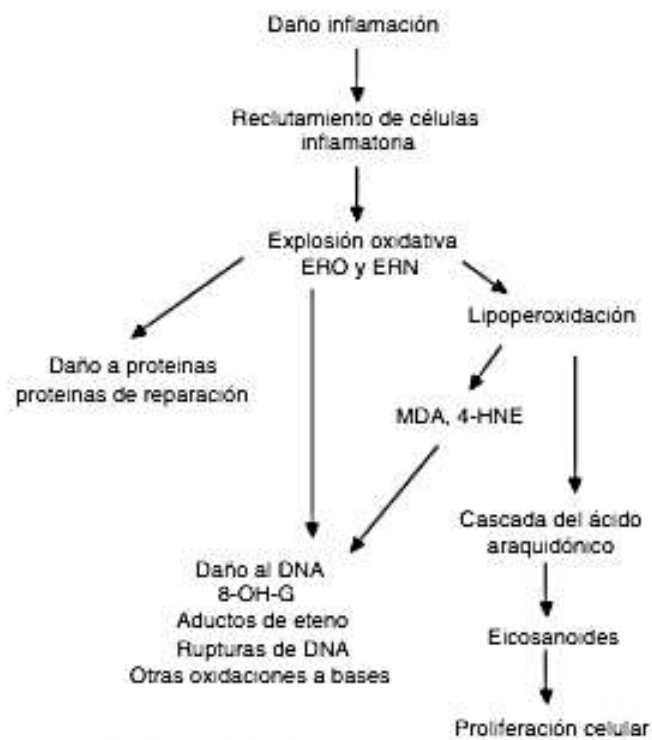


Figura 1. Mecanismo de daño molecular en proceso de inicio de tumores en inflamación crónica.

Fuente: (Gómez Quiróz Luis, 2015)

1.1.5 Radicales Libres

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado en el orbital externo, dándoles una configuración muy reactiva y de gran inestabilidad, por ello tienden a captar un electrón de otros átomos con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica (Soto, 2002). Debido a que estas especies reactivas no poseen receptores específicos, tienen una capacidad de agresión indiscriminada sobre células y tejidos. Como producto de nuestro metabolismo se generan distintos tipos de radicales libres, tales como: Especies Reactivas de Oxígeno (ROS: el anión superóxido, el anión peróxido, el radical perhidroxilo, el radical hidroxilo) y Especies Reactivas de Nitrógeno (RNS: óxido nítrico, radical peroxinitrito), cuya principal fuente son las mitocondrias, los lisosomas, los peroxisomas, así como la membrana nuclear, citoplásmica y del retículo endoplásmico (Octavio Maldonado Saavedra, 2010).

Los efectos benéficos de ROS y RNS se muestran en bajas concentraciones, participando en diferentes funciones fisiológicas de la célula, como defensa contra agentes infecciosos y sistemas de señalización celular (mitosis). Por otra parte, el resultado nocivo que puede causar los radicales libres en los sistemas biológicos son la producción EO (estrés oxidativo) generado por la deficiencia de antioxidantes e incremento de las ROS, exposición a la radiación ionizante y otras toxinas del ambiente (Gregorio Tiskow Drost, 2009).

Los efectos benéficos de ROS y RNS se muestran en bajas concentraciones, participando en diferentes funciones fisiológicas de la célula, como defensa contra agentes infecciosos y sistemas de señalización celular (mitosis). Por otra parte, el resultado nocivo que puede causar los radicales libres en los sistemas biológicos son la producción EO (estrés oxidativo) generado por la deficiencia de antioxidantes e incremento de las ROS, exposición a la radiación ionizante y otras toxinas del ambiente (Gregorio Tiskow Drost, 2009).

1.1.5.1 Especies reactivas de oxígeno

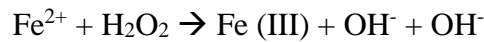
Anión Superóxido (O_2^-)

Es uno de los radicales con mayor abundancia en las células. Se forma principalmente en la cadena de transporte de electrones y en la fagocitosis para uso en defensa de bactericidas (Corrales, 2012). Posee la capacidad de oxidar proteínas, ácidos nucleicos y lípidos; además pueden actuar como agente reductor al dar un electrón a un metal de transición oxidado como el hierro (Fe^{+2}) o el cobre (Cu^{+2}) (Claudia, Mónica, & Uribe Paulina, 2016).

Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

Son menos potentes, pero cuando se origina en presencia de metales de transición como el hierro (Fe^{+2}) o el cobre (Cu^{+2}) consiguen oxidar y causar anión férrico o cúprico en la reacción de Fenton, de tal forma originando el radical hidroxilo (Dr. Luis Díaz Soto, 2002)

Reacción de Fenton:



Radical hidroxilo (OH \cdot)

Es uno de los radicales más inestables y reactivos, provocando interacciones con la primera molécula que esté en contacto, como el ADN; trastornando la capacidad de la división celular y provocando mutaciones. Además, a los ácidos grasos polisacáridos los radicales hidroxilos extraen moléculas de hidrogeno (H $^+$) dando como resultados radicales lipídicos y activar mecanismos inflamatorios. Son los radicales más complejas de eliminar por medio de antioxidantes.

Oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$)

Este radical es un estado eléctricamente excitado del oxígeno, juega un rol clave en muchos aspectos biológicos, como la señalización de procesos celulares, oxidación de alimentos, etc. Es de gran importancia en el campo biomédico, como alternativa para quimioterapia o la radioterapia frente a infecciones microbianas o cáncer; debido la alta reactividad este radical frente a una elevada diversidad de moléculas, tales como proteínas, ácidos nucleicos o lípidos, ocasionando daño oxidativo y posteriormente la muerte celular (Bresolí Roger, 2018).

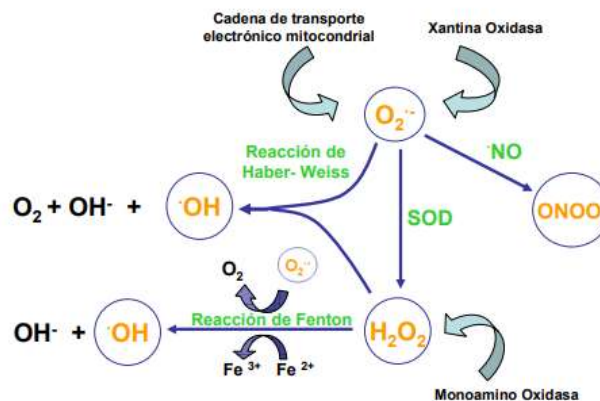


Figura 2. Generación de Especies reactivas de oxígeno en la mitocondria.

Fuente: (Rodríguez Rodríguez Patricia, 2009)

1.1.6 Estrés Oxidativo

El estrés oxidativo (EO) es el resultado de reacciones metabólicas que utilizan O_2 y representa una alteración en el equilibrio pro-oxidante/antioxidante en los sistemas vivos con capacidad de oxidar biomoléculas (lípidos, proteínas, ADN) e inhibir su estructura y función normal (Vicente Sanchez, 2013).

En términos químicos, el EO es un aumento (cada vez más negativo) en la reducción del potencial celular o una disminución en la capacidad reductora de los pares redox celulares como el glutatión. Los efectos del EO dependen de la magnitud de estos cambios, si la célula es capaz de superar las pequeñas perturbaciones y de recuperar su estado original. La vida de un radical libre es extremadamente breve; su agresividad y actividad destructora ocurren en rápido tiempo; lapso requerido para la consecución del electrón complementario, estabilizar su carga eléctrica y con ello, dejar de ser un radical libre. Sin embargo, el EO severo puede causar la muerte celular y aún una oxidación moderada puede desencadenar la apoptosis, mientras que si es muy intensa puede provocar la necrosis (Diaz Guillermo, 2016).

El ADN es uno de los principales blancos del ataque por radicales libres en la célula y las modificaciones que sufre como consecuencia de esos ataques son relevantes para la pérdida de la homeostasis celular (Lic. Adonis E. Zorrilla García, 2004).

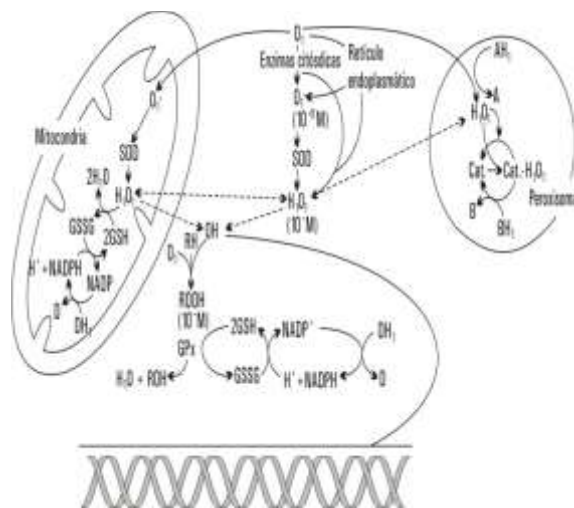


Figura 3. Producción intracelular de los productos de la reducción parcial del oxígeno. El radical $OH\cdot$ como agente más dañino para el ADN.

Fuente: (Lic. Adonis E. Zorrilla García, 2004).

Así mismo, las mitocondrias cumplen un rol importante en la fabricación de energía y además es el principal productor de especies reactivas de oxígeno durante los procesos oxidativos del metabolismo. Con todos estos papeles funcionales, las mitocondrias se convierten en un elemento clave del metabolismo celular y de diversos procesos que alteran algunas enfermedades como muerte celular, neoplasias, entre otras. En particular producen el anión superóxido, una de las especies reactivas de oxígeno responsable de la señalización óxido-reducción y que forma parte del mecanismo de detección de la hipoxia; además es capaz de producir otras especies reactivas que se forma como consecuencia de una reacción en cascada, el cual produce óxido nítrico (NO^\cdot) y esta puede combinarse con O_2^\cdot formando peroxinitrito (ONOO^\cdot) y H_2O_2 , donde la acumulación de estos radicales libres da el inicio de la apoptosis celular (Corrales, 2012) (Dr. Pastor Luna, 2014).

El cáncer básicamente afecta el mecanismo de control que rige la diferenciación y proliferación de las células. En el proceso de peroxidación lipídica de estas estructuras, se producen en diferentes tejidos, sustancias mutágenos y factores cancerígenos derivados de ciertos ácidos grasos, que como productos de degradación originan hidroperóxidos, endoperóxidos, enoles y aldehídos que actúan como agentes proneoplásicos con acción directa sobre el ADN nuclear y mitocondria (Esther Viada Pupo, 2017).

Las células poseen una serie de mecanismos que las protegen contra el estrés oxidativo, que conlleva a un equilibrio entre los radicales libres oxidantes y los mecanismos antioxidantes, además prevenir la producción de radicales libres, destruir los oxidantes una vez desarrollados y reparar los daños producidos por estos (Israel Korc, 1995).

1.1.7 Antioxidantes

Los antioxidantes son moléculas que retardan o inhiben la oxidación de otras moléculas como en sustratos biológicos (lípidos, proteínas o ácidos nucleicos) a pesar de estar en concentraciones bajas (Elizabeth, Angélica, & Torres Olivia, 2017). Tanto las células y los órganos presentan mecanismos antioxidantes, que se dividen en antioxidantes

endógenos y antioxidantes exógenos; los cuales actúan en espacios intracelulares y extracelulares, que permiten la neutralización de diferentes especies reactivas de oxígeno, formando una red de antioxidantes.

Los suplementos antioxidantes se basan en estudios epidemiológicos y clínicos, que muestran una estrecha relación entre los siguientes factores: dieta, estilo de vida, exposición a radiaciones, metales, pesticidas, toxinas y ciertos medicamentos con la aparición y progreso de enfermedades como el cáncer, la diabetes, la aterosclerosis, las enfermedades neurodegenerativas y el envejecimiento (Londoño Julian, 2010).

1.1.6.1 Antioxidantes endógenos

Son sintetizados por el organismo, se dividen en dos grupos enzimáticos y no enzimáticos (Alomar Maria Fernanda, 2015).

Antioxidantes enzimáticos

Los antioxidantes enzimáticos catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan sustratos que reaccionan con radicales libres. Las principales enzimas antioxidantes son: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX) (Trujillo Hernandez Cristina, 2019).

Superóxido dismutasa (SOD)

Estas enzimas contienen metales que catalizan la remoción de O^{2-} , generando como producto final H_2O_2 . Se expresan tres tipos diferentes de SOD, superóxido dismutasa 1 que contribuye en la zona intracelular utilizando como cofactores al cobre y zinc; superóxido dismutasa 2 ubicada en las mitocondrias que utiliza el magnesio como cofactor y el superóxido dismutasa 3 se encuentra en la zona extracelular empleando el cobre y zinc como cofactores (Policastro Lucía Laura, 2002).

Catalasa (CAT)

Se encuentran en los peroxisomas y en pequeñas proporciones en las mitocondrias y citosol. Necesita de cofactores debido a que es una dismutasa y su actividad disminuye al ser expuesto a la radiación UVA y UVB. (Noemi & Pedraza José, 2006). Tiene dos funciones básicas: catálisis y peroxidación. Lo principal es catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. (Trujillo Hernandez Cristina, 2019)

Glutación peroxidasa (GPX)

Se encuentra en la matriz mitocondrial y en el citoplasma. Es uno de los antioxidantes con mayor abundancia en las células y además es importante en la piel. Es una reductasa que necesita NADPH para catalizar su reacción. Además, elimina el H₂O₂ en presencia de glutatión reducido y limita la peroxidación de lípidos (Carvajal Carlos, 2019).

Antioxidantes no enzimáticos

Los antioxidantes endógenos no enzimáticos se encuentran principalmente en el citoplasma, las mitocondrias, la matriz nuclear y el líquido extracelular. Los más importantes incluyen glutatión, ácido úrico, bilirrubina, albúmina y Ubiquinona (Reguillo Muñoz María del Carmen, 2018).

Glutación (GSH)

Es un tiol hidrosoluble compuesta por cisteína, glutamato y glicina, es el más abundante en la mayor parte de tejidos, su función principal es proteger contra el daño oxidativo. La ingesta de espinaca, aguacate, brócoli y cítricos aumenta la producción de glutatión y potencia la actividad de otros antioxidantes (Martinez Lucía, 2020).

Ubiquinona

Es una quinona con una estructura similar al tocoferol, también conocida como coenzima Q. Su forma oxidada, ubiquinol, evita que el oxígeno activo desencadene la peroxidación lipídica y también participa en la conversión de vitamina E en las mitocondrias.

Carotenos

Se producen en plantas (algas, hongos y bacterias) como pigmentos orgánicos. Su función principal es mitigar el $^1\text{O}_2$ y los radicales lipídicos, además protege contra el daño por la radiación UV y previene la degradación del colágeno. Son los únicos carotenoides que pueden convertirse en grandes cantidades de vitamina A cuando el cuerpo los necesita. Los carotenoides pueden ser alfa y betacarotenos, que son precursores de la vitamina A y actúan como nutrientes antioxidantes (Rojas Manzanares María Caridad, 2002).

Polifenoles

Elimina radicales superóxidos, radicales lipídicos y $^1\text{O}_2$ por los que se consideran potentes antioxidantes, además incitan la producción de enzimas antioxidantes como el superóxido dismutasa. Entre los ejemplares de polifenoles está el té verde y el resveratrol (Celia & Hernandez Pablo, 2018).

1.1.7 Plantas medicinales

En los últimos años ha incrementado el interés por el uso de plantas medicinales, debido que puede llevar a soluciones tanto en el campo de la salud y en la industria alimenticia. Por lo general, las plantas medicinales tienen un terreno amplio y beneficioso en aspectos curativos para aliviar o calmar numerosas enfermedades. Son de gran aporte para el sector de la salud debido que posee diversos componente o principios activos curativos para pacientes con enfermedades mortales.

Ecuador al ser un país con alta diversidad biológica y cultural, se encuentra en la lista como uno de los primeros países que emplea medicina ancestral, las cuales destaca plantas medicinales, pero existe pocas investigaciones relacionadas al uso y beneficios curativos que puede brindan las plantas independientemente. Por lo tanto, el país cuenta con extensa diversidad de plantas beneficiosas entre ellas conserva diferentes tipos de valerianas donde su composición química se caracteriza por triterpenos bicíclicos: valepotriatos, valtrato y dihidrovaltrato; aceites volátiles: valeranone, valeranal y ácidos valerénicos; sesquiterpenes, lignanos y alcaloides que causa relajación. También, se ha podido determinar la presencia de aminoácidos libres, como

el ácido gama aminobutírico, tirosina, arginina, ácido γ -aminobutírico (GABA) y glutamina que permiten un tratamiento de la irritabilidad, la ansiedad, el insomnio y los trastornos del sueño de origen nervioso. (Alejandro Bucciarelli, 2010) (Begoña, 2017).

1.1.8 Valerianas

1.1.8.1 Generalidades

El género *Valeriana plantaginea* y *Valeriana microphylla* pertenece a la familia Caprifoliaceae, se encuentra de Venezuela a Perú; en el Ecuador se distribuye en la región andina entre 2500 y 4500 m.s.n.m (Danilo, Raffaella, Adolfo, & Ulloa Carmen, 2016).

1.1.8.2 Descripción botánica

Valeriana plantaginea Kunth (Figura 1) son plantas grandes que miden hasta 1,5 metros, presentan un olor desagradable y fuerte. Sus hojas son gruesas y brillantes en la cara superior, de forma lanceoladas y miden hasta 45 centímetros de largo. Tienen inflorescencia elevada, las ramas son erguidas con numerosas flores pequeña de color blanco que miden 5 milímetros de largo de forma tubular (Carmen, Samara, & JorgensenPeter, 2010).

Valeriana microphylla Kunth (Figura 2) son plantas pequeñas que miden 60 cm de longitud, con olor fétido. Sus hojas son ovaladas o elípticas y miden hasta 10 mm de largo. Tienen inflorescencia en las puntas de las ramas erguidas, miden hasta 5 centímetros de largo, presentan muchas flores; estas pueden ser de color blanco o rosado algunas veces con tintes lilas, miden hasta 3 mm de largo y son de forma tubular. El fruto son de forma lunular coronado y miden hasta 1,5mm (Missouri Botanical Garde, 2017).

1.1.8.3 Clasificación Taxonómica

Según (Cuatrecasas José, 2007), menciona la taxonomía de *Valeriana plantaginea* Kunth.

Dominio: Eukaryota
Reino: Plantae.
Phylum: Magnoliophyta.
Clase: Magnoliopsida.
Orden: Dipsacales.
Familia: Caprifoliaceae.
Género: *Valeriana*.
Especie: *Valeriana microphylla*



Figura 6. *Valeriana plantaginea* Kunth.

Fuente: (Carmen, Samara, & JorgensenPeter, 2010)

Según (Galan Carlos, 2018) *Valeriana microphylla* presenta la siguiente taxonomía

Dominio: Eukaryota
Reino: Plantae.
Filum: Spermatophyta.
Clase: Magnoliopsida.
Orden: Dipsacales.
Familia: Caprifoliaceae.
Género: *Valeriana*.
Especie: *Valeriana microphylla*



Figura 7. *Valeriana microphylla* Kunth.

Fuente: (Danilo, Raffaella, Adolfo, & Ulloa Carmen, 2016)

1.1.8.4 Agente Terapéuticos

Existen suplementos antioxidantes que tienen capacidad antiinflamatoria en muchas variedades de plantas que permiten la reducción del estrés oxidativo en células cancerígenas. En la actualidad, se han realizado pocas investigaciones con plantas de valeriana (semillas, raíces, extractos, aceites esenciales, entre otros) que se enfoquen en

el estudio en los mecanismos de actividad antioxidante y efectos antitumorales que estas pueden inducir. Entre las especies de valeriana más estudiadas son *Valeriana jatamansi* y *Valeriana officinalis*.

Malik Hamaidia y colaboradores en el 2016, realizaron un estudio sobre los efectos en los compuestos que rigen la *Valeriana officinalis* en células cancerígenas, proponiendo un tratamiento alternativo hacia esta enfermedad. Donde, los componentes presentes en la valeriana pueden tener algunas respuestas terapéuticas exitosas como el ácido valérico (Malik Hamaidia, 2016). Debido a la baja naturaleza hidrofóbica de la cadena alquílica, el ácido valérico es miscible en agua y puede usarse para solubilizar otros compuestos. Se pueden obtener análogos del ácido valérico por oxidación de alcoholes primarios y aldehídos con permanganato de potasio o clorito de sodio. En 1882, el químico Beverly Burton sintetizó acetoacetato de mono y dipropiletilo con éxito usando yoduro de propilo y acetoacetato de etilo. También obtuvo nuevos compuestos por descomposición alcalina de acetoacetato de dipropiletilo con ácido acético, acetona y ácido betaoxibutírico. Entre otros productos como la dipropilacetona y el ácido dipropil- β -oxibutírico, el ácido 2-propilpentanoico (ácido valproico) que contienen propiedades particularmente anticancerígenas. El ácido valproico farmacéuticamente es capaz de sensibilizar las células cancerosas humanas (cáncer de colon, pulmón, cáncer cervical, leucemia, cáncer de mama). Por lo tanto, el ácido valproico presenta resultados eficaces (GRONER, 2006).

En el 2014, Sakshima Thusoo y colaboradores, realizaron comparaciones entre el aceite esencial y el extracto metanólico de raíces de *Valeriana jatamansi*, donde se estudió la composición química de cada una de las soluciones. Se compararon la actividad antioxidante y los polifenoles y el contenido de flavonoides de los extractos. Los resultados indicaron que la actividad antioxidante del extracto metanólico podría atribuirse a la presencia de una gran cantidad de polifenoles y flavonoides. El aceite esencial de las raíces de *Valeriana jatamansi* mostró una actividad antioxidante moderada que puede resultar beneficioso en la industria farmacéutica (Sakshima Thusoo, 2014).

Otra publicación realizada en el 2015 evaluó tres productos de descomposición de *Valeriana jatamansi*, valtrals AC (1-3) y dos productos conocidos, baldrinal y homobaldrinal. Los compuestos 1-3 mostraron citotoxicidad selectiva contra el cáncer de próstata (PC-3M) y el cáncer de colon (-8 HCT) (Lin S, 2015).

Según un trabajo de investigación realizado en el 2017, menciona que “*Valeriana jatamansi* Jones (valeriana) y sus extractos poseen fuertes actividades antioxidantes que extienden su aplicación en la práctica clínica al tratamiento de enfermedades.” (Wang F, 2017) “El valtrato, acevaltrato y 1- β acevaltrato (tres valepotriatos iridoides), la comparación de las actividades antioxidantes de los valepotriatos iridoides pueden eliminar significativamente los radicales libres *in vitro*, aliviar los niveles de ROS e inducir apoptosis en las células HepG2. Además, presentan resultados que demuestran que los valepotriatos iridoides podrían promover la citotoxicidad en tres células cancerosas sin afectar las células no malignas” (Wang F, 2017) (Yumei Zhang, 2017).

En otro estudio, “F3 es una fracción novedosa que se aisló por primera vez de *Valeriana jatamansi* Jones que podría inhibir significativamente el crecimiento celular de cáncer de mama de manera independiente de la concentración al inducir apoptosis y no tiene un efecto inhibitor obvio del crecimiento en las células MCF-10A. Los estudios demostraron que la apoptosis inducida por F3 estaba mediada por el daño del ADN presentado por roturas de la cadena de ADN y la activación de γ -H2AX que podría ser atacada por la acumulación de ROS. Esto desencadenó muchas situaciones moleculares clave que implican la activación de la ruta MAPK. Además, como resultados mostraron que F3 exhibió un posible efecto antitumoral e indujo daño en el ADN en xenoinjertos MDA-MB-231” (Zhu, 2019).

En el año 2019, realizaron investigaciones con las semillas de *Centranthus ruber* y *Valeriana officinalis* que contienen ácidos linolénicos conjugados (CLN), con propiedades anticancerígenas. “Para la mediación de los lípidos totales se midieron en un espectrómetro ultravioleta dando un valor máximo de absorción de 270nm en semillas pertenecientes. Por cromatografía en columna de sílice, los lípidos neutros (NL), glucolípidos y fosfolípidos se eluyeron de los aceites de semillas. Se reveló que la mayoría de los CLN en estos aceites de semillas existían en la fracción NL. Cuando

las fracciones de NL de estos aceites de semillas se hicieron reaccionar con lipasa, los CLN mostraron una buena sensibilidad a la hidrólisis de la lipasa. Esto indicó que los CLN en los aceites de semillas de *C. ruber* y *V. officinalis* estaban predominantemente en la posición sn-1,3 de triacilglicerol y menos en la posición sn-2. Estos resultados sugirieron que los CLN de los aceites de semillas de *C. ruber* y *V. officinalis* podrían ser fácilmente absorbidos por las células cancerosas como ácidos grasos libres y tenían buen potencial como sustancias antitumorales” (Honma T, 2019) .

En cuanto a la *Valeriana Plantaginea Kunth* y *Valeriana Microphylla Kunth* pertenecientes a la familia Caprifoliaceae, clase Magnoliopsida; no han sido estudiadas como alternativa benéfica en la industria farmacéutica; en este caso como tratamiento contra el cáncer. Por lo que, en el presente estudio se busca investigar los efectos anticancerígenos de los compuestos activos (antioxidantes) que presentan estas plantas en la línea celular MFC-7 (Cáncer de mama).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo General

Determinar la capacidad antioxidante *in vitro* de los extractos de *Valeriana microphylla* y *Valeriana plantaginea* en células cancerígenas MFC-7

1.2.2 Objetivos Específicos

- Determinar la capacidad citotóxica de los extractos de *Valeriana microphylla* y *Valeriana plantaginea* en células cancerígenas
- Evaluar la expresión de ROS total, Anión superóxido mitocondrial y glutatión *in vitro* en células cancerígenas tratadas con extractos de *Valeriana microphylla* y *Valeriana plantaginea*

- Estimar la concentración de óxido nítrico y capacidad antioxidante en sobrenadante de cultivo de células MFC-7 tratadas con extractos de *Valeriana microphylla* y *Valeriana plantaginea*
- Correlacionar los hallazgos encontrados e inferir el posible potencial antioxidante de los extractos de *Valeriana microphylla* y *Valeriana plantaginea*

CAPITULO II

METODOLOGÍA

Los ensayos experimentales se realizaron en el Laboratorio de Investigación de la Facultad de Ciencias de la Salud (Querochaca) y en la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato

2.1 MATERIALES

2.1.1 Materia Prima

Se empleó hojas/tallos y raíces frescas de las especies *Valeriana plantaginea* y *Valeriana microphylla*, recolectadas en el cerro Igualata.

2.1.2 Línea Celular

Para esta investigación se trabajó con la línea celular (MCF7 ATCC® HTB-22™) derivados del cáncer de mama.

2..1.3 Materiales

- Vasos de precipitación
- Agitador Magnético
- Matraz de 2L
- Papel filtro Whatman #1
- Botellas de vidrio de 500mL
- Probetas 2L
- Papel aluminio
- Tubos de ensayo de 15mL
- Filtro de 0,22 µm
- Jeringas
- Esmalte transparente

- Pinza metálica
- Pipetas graduadas de 5, 10, 25 mL
- Pipeta automática
- Pipeta multicanal
- Puntas amarillas, blancas y azules
- Placas de 96 y 6 pocillos
- Canaletas
- Gradillas
- Placas de cobre
- Pissetas
- Espátulas
- Papel parafilm
- Tubos falcón de 15, 10, 50 mL
- Tubos eppendorf de 1,5 mL
- Frascas Roux de 75 mL
- Placas de cobre

2.1.4 Equipos

- Plancha de calentamiento
- Balanza analítica
- Vortex
- Baño maría
- Baño maría con agitación
- Incubadora con atmosfera de CO₂
- Cámara de flujo Laminar (Nivel de Bioseguridad II)
- Microscopio invertido de contraste
- Microscopio óptico
- Microscopio de fluorescencia Leica DMI8
- Lector de placas Victor X3
- Cámara de Humedad

2.1.5 Reactivos

- Agua Destilada
- PBS 1X
- Medio DMEN suplementado
- 1% de penicilina/estreptomicina (100 µg/mL)
- 1% de Glutamina
- Suero Fetal Bovino 10%
- Tripsina – EDTA al 0,25%
- Reactivo Trypan Blue
- Curva patrón de proteínas (albumina bovina)
- Reactivo Bradford
- Reactivo MTT
- HCL 0,01 M
- SDS 10%
- Paraformaldehido 4%
- Tritón 100X
- Anticuerpos (MITOSOX, Glutation, ROS)
- Medio de montaje DAPI
- PBS Hank´s
- Agua Estéril
- Cloruro de amonio 40X
- Sulfato de cobre
- Reactivo de Griess
- Tampón de ensayo 10X
- Reactivo de Mioglobina
- Buffer de fosfato-citrato
- Peróxido de hidrogeno 3%
- Curva estándar Trolox
- Curva estándar Griess
- Tabletas ABTS
- Solución de parada

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Recolección de Especímenes

Los especímenes se coleccionaron en el cerro de Igualata perteneciente al cantón Quero provincia de Tungurahua, bajo la respectiva autorización emitida por la DIRECCIÓN PROVINCIAL DEL AMBIENTE TUNGURAHUA N°06-2018-IC-FLO-FAU-DPAT-VS. A cada una de las especies de valeriana se les evaluó las características organolépticas y físicas; como estado, olor y estructura de hojas, tallos, flores y raíces. Estas muestras se procesaron en los laboratorios de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología mediante la pulverización de cada especie de valeriana (*Valeriana plantaginea* y *Valeriana microphylla*).

2.2.1 Pulverización de las muestras

En el procedimiento, inicialmente se agrupó en dos conjuntos: hojas/tallos y raíces de cada especie de valeriana; después se lavó con agua destilada y se dejó en estufa a 60°C durante 24 a 48 horas para su deshidratación. A continuación, el material vegetal seco se trituroó utilizando un molino manual y finalmente se pesó mediante la balanza analítica la cantidad pulverizada de cada espécimen para después ser empacadas en fundas tetrapack manteniéndose a temperatura ambiente.

2.2.2 Cuantificación de sólidos

El material vegetal pulverizado se colocó en un matraz Erlenmeyer de 2 litros con agua destilada en una relación 1:20. Después, se colocó el matraz en una estufa de calentamiento durante 30 minutos a ebullición, posteriormente se dejó enfriar para envasar los extractos en tubos de 15mL. Los extractos se filtraron mediante gravedad con papel cualitativo Whatman 1, por último, se almacenó en tubos de ensayo a 25°C.

Seguidamente, se emplearon cápsulas de porcelana que fueron lavadas y secadas en una estufa a una temperatura de 105°C, después se colocó en un desecador para eliminar la humedad durante 2 horas, transcurrido ese tiempo se pesó en la balanza analítica. A continuación, se transfirió a las cápsulas de porcelana un volumen de 25mL

de las muestras y se colocó en la estufa a una temperatura de 95°C durante una hora (evaporación de las muestras); posteriormente se aumentó la temperatura a 102°C durante 12 horas. Al final del tiempo transcurrido se retiró las capsulas de la estufa y se puso en un desecador hasta que se enfrió, por último, se pesó y se registró el valor del sólido de cada capsula.

Para el cálculo de los sólidos totales es la siguiente fórmula:

$$ST = \frac{(A - B) * 1000}{V}$$

Donde:

ST: Solidos Totales en mg/L

A: Peso final de la cápsula con el residuo seco en gramos

B: Peso inicial de la cápsula tarada en gramos

V: Volumen de muestra desecada en litros

2.2.3 Preparación del extracto acuoso para el cultivo celular

Se utilizó el material vegetal pulverizado para el desarrollo de dos extractos acuosos, uno de hojas /tallos y el otro de raíces de cada especie de valerianas. Se resuspendió el material vegetal seco de las muestras en PBS 1X estéril (relación 1:20) con ayuda del Vortex después, se esterilizó empleando un filtro (0,22 µm) en tubos falcón estéril para eliminar todo tipo de contaminantes. Por último, se conservó a -70°C cada extracto sellado con papel parafilm hasta su utilización.

2.2.4 Cuantificación de Proteínas

La cuantificación de proteínas se efectuó por el método Bradford. Para la cuantificación de proteínas se preparó previamente el baño maría con PBS 1X, reactivo Bradford, curva patrón de proteínas (albumina bovina) y extractos de valeriana. Después, en una caja de 96 pocillos se agregó 5µL de curva patrón de proteínas, 5µL de PBS 1X y 5µL del extracto de valeriana; después de añadió 150 µL del reactivo Bradford, cabe recalcar que se trabajó en ausencia de luz en la cámara de flujo debido que el reactivo es sensible y desnaturaliza. Al finalizar, se incubo durante 5 minutos y se leyó las placas en el lector Victor X3 (PerkinElmer, USA) a 570 nm.

2.2.5 Cultivo Celular

En una frasca de Roux de 75mL se empleó líneas celulares MCF7 derivadas de adenocarcinoma del pecho (cáncer de mama) en medio DMEN (DuLbecco Modified Eagle Medium) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), para la inhibición de contaminantes se agregó 1 % de Penicilina/Estreptomicina y 1% de glutamina, y después se incubó en una atmósfera de 37°C y 5% CO₂ para su crecimiento celular.

2.2.5.1 Pases Celulares

La población celular con crecimiento y adherencia entre el 70-80% (confluencia), se realizó pases celulares en otros soportes (frascas Roux de 75mL). Primero se preparó el baño maría a temperatura de 37° C con tripsina, medio DMEN y PBS 1X; las frascas con cultivo celular (MCF-7) fueron sacadas de la incubadora, se desechó el medio y se lavó con 8mL de PBS 1X y se agitó, seguidamente se desechó el contenido; se agregó 1mL tripsina para desenganchar las células de la frasca y se incubó a 37°C durante 4-5 minutos a temperatura de 37° C a condiciones del 5% de CO₂ y atmósfera húmeda, transcurrido ese tiempo se inactivó con 5mL de medio DMEN suplementado. Se dividió en otras frascas partes iguales el volumen final y se le agregó 12mL de medio DMEN suplementado; finalmente se incubó en una atmósfera de 37°C y 5% CO₂ para su crecimiento celular.

2.2.5.2 Descongelación Celular

Las células MCF-7 almacenadas en un crovial con medio DMEN enriquecido con FBS (10%) y DMS (10%) a -80°C, se colocó en el baño maría previamente preparado junto al medio DMEN suplementado a temperatura de 37°C. En un tubo falcón de 15mL se agregó 5mL de medio DMEN suplementado y todo el contenido de células MCF-7 del crovial. Después se centrifugó la suspensión a 500 rpm durante 5 minutos, al transcurrir ese tiempo se desechó el sobrenadante y se mantuvo el pellet para una resuspensión con 2mL de medio DMEN suplementado. El contenido final se colocó en una frasca Roux con 12mL de medio de cultivo y se incubó a condiciones estándar durante 24 horas para alcanzar la confluencia entre 70-80%.

2.2.5.3 Conteo Celular

Se verificó la cantidad de células viables (70-80% de confluencia) de las frascas que se encontraban en la incubadora, previamente se preparó el baño maría con PBS 1X, Tripsina y Medio de cultivo DMEN a 37°C. Primero, se desechó el contenido de las frascas y se agregó 8mL de PBS, al agregar ese volumen se agitó un poco para un buen lavado, después se desechó el PBS de la frasca y de inmediato se agregó 1ml de tripsina-EDTA (0,25%), se incubó de 4 a 5 minutos a 37°C con 5% de CO₂. Al transcurrir ese tiempo se verificó que las células se hayan desenganchado de la frasca; siendo así se añadió 2ml de medio de cultivo para inactivar la acción de la tripsina, posteriormente se agregó la suspensión en un tubo falcón y se centrifugó a 500rpm durante 5 minutos. Después se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 2 mL de medio de cultivo DMEN suplementado, se centrifugó con las mismas condiciones ya mencionadas y se desechó el sobrenadante, al pellet se le agregó 2mL de PBS 1X y se volvió a realizar el mismo proceso en la centrifuga. A continuación, se desechó el sobrenadante y se añadió 2 mL de medio de cultivo al pellet final (solución de células MCF-7) y se agitó en el Vortex.

Para teñir las células viables y realizar el conteo celular respectivo, se utilizó el reactivo Trypan Blue relación 1:1; es decir se añadió 100 µL del reactivo Trypan Blue y 100 µL de la solución de células MCF-7 en un tubo eppendorf (solución final). En la cámara de Neubauer se añadió 10 µL de la solución final en cada cuadrante para el conteo en el microscopio óptico (lente 10X). Finalmente se registró el valor y se realizó los cálculos respectivos:

$$Nt*2*10000= \# \text{ células/mL}; \text{ donde}$$

Nt: número de células viables (conteo en el microscopio)

2.2.6 Ensayos de Citotoxicidad

Para conocer la dosis óptima y IC₅₀ para cada una de las muestras se realizaron ensayos MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-di-feniltetrazol). Se sembraron células MCF-7 en placas de 96 pocillos a una densidad de 10.000

células/pocillo; después se añadió 100 µL de medio DMEN suplementado en cada pocillo y se dejó crecer en 24 horas. Al pasar este tiempo se efectuó dos lavados con PBS 1X y se añadió los tratamientos (extractos de valerianas) en diluciones sucesivas o seriadas en base logarítmica 10, se dejó incubar durante 24 horas a condiciones estándares. Posteriormente se retiró todo el contenido de cada pocillo y se realizó dos lavados con PBS 1X, se añadió 10 µL de MTT (5mg MTT/mL PBS 1X) en cada pocillo con 100 µL de medio de cultivo DMEN sin rojo fenol para después ser incubado durante 2 horas. A continuación, se añadió 100 µL de HCL (0,01 M) y 100 µL de SDS (10%), se mantuvo en la incubadora durante 2 horas en condiciones estándares. Por último, se leyó en el lector de microplacas Victor X3 (PerkinElmer, USA) el formazan producido a 570nm.

2.2.7 Inmunohistoquímica

Este ensayo se realizó mediante pruebas de microscopia de fluorescencia, para ello se sembró en placas de 6 pocillos 50.000 células MCF-7 por pocillo en cubreobjetos estériles en 2 mL de medio de cultivo DMEN suplementado, se incubó por 24 horas. Al pasar este tiempo con mucho cuidado se desechó el contenido de los pocillos y se realizó dos lavados con PBS 1X; se agregó los tratamientos en función del valor de la dosis optima y se incubó durante 24 horas. Después se desechó el medio de cada pocillo y se añadió Paraformaldehido 4% (PFA) durante 15 minutos, luego se retiró el PFA y se realizó dos lavados con 500 µL PBS 1X y se desechó el mismo, así se agregó 400 µL de tritón 100X durante 8 minutos, se retiró el tritón 100X y se procedió a realizar dos lavados con 500 µL de PBS 1X durante 5 minutos, para el lavado final no se excluyó el PBS 1X y se sellaron con papel parafilm las placas para almacenarlo en la nevera a -20°C.

Se trabajó en ausencia de luz para evitar la desnaturalización de los reactivos, por lo tanto, se agregó 300 µL del reactivo CellROX®, reactivo MitoSox™ y el reactivo Glutathione Detection correspondientes a cada tratamiento y se incubó dentro de la cámara de humedad en el baño maría con agitación a 37°C durante 30 minutos para Glutathione y ROS y una hora para MitoSox. Al tiempo transcurrido se desechó el sobrenadante y se realizó dos lavados empleando 500 µl de PBS Hank's con

intermedios de 5 minutos en el baño maría con agitación. Finalmente, se excluyó el sobrenadante (se guardó hasta su uso previo) y se retiraron los cubreobjetos de los pocillos para ponerlos en el papel filtro a temperatura ambiente cubiertas con papel aluminio para protegerlos de la luz durante 24 horas. Se permontaron sobre portaobjetos en medio de montaje con DAPI y se utilizó el microscopio invertido de fluorescencia Leica DMi8 para la lectura de las muestras.

2.2.8 Capacidad Antioxidante

Se emplearon los sobrenadantes que se excluyeron en el método de Inmunohistoquímica y se marcó para Óxido nítrico en la técnica de GRIESS y capacidad antioxidante total en la técnica de TROLOX.

2.2.8.1 Técnica GRIESS

Preparación del Reactivo Griess

El reactivo Griess se preparó en volúmenes iguales de N-(1-naftil) ethylen bnhjediamina (Componente A) y el ácido sulfaníico (Componente B). Esta preparación se realizó en ausencia de luz, debido que pierde su estabilidad y se desnaturaliza la solución.

Preparación de soluciones activadoras de cadmio

Cloruro de Amonio

Para la preparación de Cloruro de Amonio se pesó 31,5 gramos de cloruro de amonio y se disolvió en 250 mL de agua destilada en agitación, posteriormente se colocó en un frasco de vidrio estéril. Después de la solución concentrada de cloruro de amonio se preparó una solución diluida 40X de cloruro de amonio. Para ello se añadió 12,5 mL de solución concentrada de cloruro de amonio con 500 mL de agua destilada y se colocó en un frasco de vidrio estéril. Ambas soluciones se ajustaron a un pH de 8.5 con NaOH y se colocó a Temperatura de 2 a 6°C en la refrigeradora.

Sulfato de cobre 2%

Se pesó 5 gramos de sulfato de cobre en un vaso de precipitación y se añadió 250 mL de agua destilada; se agitó la solución para colocar en un frasco de vidrio estéril. Una vez preparadas se colocó en el refrigerador hasta su uso.

Ácido Clorhídrico (HCL 2N)

Se trabajó en una cabina de extracción de gases donde se añadió 14,07 mL de HCL 37% y 70,93 mL de agua destilada en un frasco de vidrio estéril. Se mantuvo almacenada a temperatura ambiente

Activación de cadmio

Para la activación de Cadmio se pesó 50 gramos de perlas de cadmio en una balanza analítica, después se colocó en un tubo falcón de 45mL y se añadió ácido clorhídrico 2N hasta cubrir completamente las perlas, se agitó fuertemente. A continuación, el HCL se desechó por decantación y se añadió agua destilada hasta cubrir las perlas de cadmio y se agitó fuertemente. El agua destilada fue excluida mediante decantación y se añadió sulfato de cobre y se removió hasta que tomó de una tonalidad azul a transparente y se desechó el sobrenadante. Después se añadió se hizo un lavado con agua destilada a las perlas y se agitó; el sobrenadante se excluyó y se agregó cloruro de amonio con agitación y se desechó por decantación.

Cuantificación de Óxido Nítrico

Se codificó tubos de ensayo respectivamente con los códigos de cada tratamiento y se añadió dos perlas de cadmio activadas con 240 uL de muestra, fueron incubadas durante 30 minutos y homogenizadas constantemente en el Vórtex. Para la curva de calibración se preparó diluciones seriadas con el estándar del kit (nitrato de sodio 1 – 100 uM).

Después del tiempo transcurrido de incubación de las muestras a temperatura ambiente con las perlas de cadmio fueron transferidas en placas de 96 pocillos donde se añadió

150 uL de la muestra, 130 uL de agua destilada y 20 uL del reactivo de Griess. Para la curva de calibración 1-100 uM se añadió 130 uL de agua destilada y 150 uL de las disoluciones estándar; el blanco se realizó con 280 uL de agua destilada. Se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en ausencia de la luz. Finalmente, las placas fueron leídas en el espectrofotómetro Víctor X3 (PerkinElmer, USA) a 570 nm.

2.2.8.2 Técnica de TROLOX

Siguiendo las instrucciones del Kit comercial Trolox SIGMA-ALDRICH (Antioxidant Assay Kit) se realizó la curva estándar (0-0,42 mM); después se preparó la solución de trabajo de sustrato ABTS mediante la adición de 25 uL solución de peróxido de hidrógeno al 3% y 10 ml de solución sustrato ABTS; esto se realizó durante 20 a 30 minutos. A continuación, se preparó los ensayos en la placa de 96 pocillos donde se realizó la curva estándar con 10 uL del estándar Trolox (0-0,42mM) y 20 uL de solución de trabajo de mioglobina; para las muestras se añadió 10 uL de muestra o tratamiento y 20 uL de solución de trabajo de mioglobina. Después se agregó 150 uL de la solución de trabajo de sustrato ABTS en cada pocillo y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se añadió 100 uL de solución de parada a cada pocillo y leyó la absorbancia en el lector de placas Víctor X3 (PerkinElmer, USA) a 405 nm.

2.2.8.3 Análisis estadístico

Para el análisis de los datos se empleó el paquete estadístico GraphPad Prism versión 8 en el cual se incluyó análisis de varianza (ANOVA) y post test de Tukey para los grupos estudiados, las imágenes obtenidas mediante microscopia se analizaron mediante el programa LASX de Leica Microsystems. Se tomó como índice de confianza el 95% y todo valor $p < 0,05$ como significativo.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Determinación de sólidos solubles totales (SST)

Tanto a la *Valeriana microphylla* como a la *Valeriana plantaginea* se les realizaron varios procesos, entre ellos: el uso específico de la planta, donde se dividió en dos partes; la primera combinación entre las hojas / tallos y la segunda raíces de las dos especies de valeriana y el disolvente de extracción. Cabe señalar que las raíces no se usaron junto con otra parte de la planta, porque el sistema de raíces se emplea con mayor abundancia en tratamientos medicinales.

Tabla 1. Concentración de Sólidos solubles Totales o SST en solución acuosa.

Tratamiento	Volumen de extracto obtenido	Concentración de sólidos solubles totales (SST) (mg/mL)	Rendimiento de sólidos solubles totales extraídos (SST) (%p/v)
VMR	1L	6,98±0,002	13,78±0,12
VPR	1L	10,96±0,35	21,31±0,68
VMHT	2L	7,31±0,001	14,54±0,09
VPHT	1L	21,59±0,002	42,41±0,05

VMR: *Valeriana microphylla* Raíz, VPR: *Valeriana plantaginea* Raíz, VMHT: *Valeriana microphylla* Hojas/Tallos, VPHT: *Valeriana plantaginea* Hojas/Tallos.

Las dos especies de valeriana utilizadas en el estudio pertenecen a la familia Caprifoliaceae presentan en sus raíces una composición química que incluye principalmente sesquiterpenos, iridoides (Mavillar Del Fresno & Carretero Accme, 2001) y en menor medida se puede encontrar saponinas.

El rendimiento de SST de los extractos de raíces en ambos casos fue muy bajo, para VMR fue de 13,78 ± 0,12% y 21,31 ± 0,68 para VPR. El bajo rendimiento en ambos casos puede deberse al disolvente (agua) utilizado para el extracto. El agua es un

solvente polar, por lo que el extracto será rico en compuestos polares. Como se mencionó anteriormente, los sesquiterpenos representan una alta proporción de SST en la raíz de valeriana, pero estos compuestos tienen baja solubilidad en agua (Racero, González, & Macías, 2004). Por lo tanto, se perderá una gran parte de sesquiterpenos y la totalidad de compuestos con una afinidad nula por el agua.

Los compuestos iridoides son solubles en agua (Ríos Gómez, 2015), en tanto que las saponinas son compuestos anfipáticos con alta solubilidad en agua (Troisi, Di Fiore, & Pulvento, 2014). Por lo que en este caso de los iridoides y saponinas juntamente con otros compuestos de naturaleza polar representarían el rendimiento obtenido en el proceso de extracción.

La diferencia en el rendimiento de los extractos de raíz entre las dos especies de valeriana se debe principalmente a dos causas; la más importante a que son especies diferentes y aunque pertenezcan a la misma familia, por tanto, sus componentes fotoquímicos sean los mismos, la concentración de estos va a variar dependiendo de la especie. La segunda causa es posiblemente el tratamiento que se le dio a las raíces (proceso de secado y proceso de extracción), dado que según García. M, Cortez M, & Rodríguez E. (2010), asegura que en aquellos procesos los cuales involucran el aumento de temperatura no solo afectan la estructura de las células de la planta sino también las concentraciones de compuestos fotoquímicos de las mismas.

El rendimiento SST para los extractos Hojas/Tallos son $14,54 \pm 0,09$ para VMHT y $42,41 \pm 0,05$ para VPHT, como se observa existe una gran diferencia entre los extractos de cada una de las especies de valerianas analizadas. La diferencia resultante en el rendimiento no tiene un origen claro debido a que en base a varios estudios las hojas y tallos aún no han sido caracterizados fitoquímicamente (Ascate-Pasos, Ganoza-Yupanqui, Suárez-Rebaza, & Bussmann, 2020); por lo que no podemos afirmar que el bajo rendimiento en el caso del extracto VMHT se deba a la relación compuestos-solvente.

El mayor rendimiento obtenido es el perteneciente a VPHT este valor se puede deber a varios factores en los que destacan que es más rico en compuestos fitoquímicos de

naturaleza polar. Según Porras A. & López A. (2009), mencionan que en general las hojas y tallos de plantas de clima subtropical son ricas en compuestos fenólicos; por ende, se puede asumir que en el caso de *Valeriana plantaginea* presenta una gran cantidad de compuesto fenólicos que contribuyen a su alto rendimiento en la extracción.

3.2 Actividad citotóxica

3.2.1 Actividad citotóxica en el extracto acuoso de *Valeriana microphylla*

La actividad citotóxica se calculó mediante el uso del método colorimétrico denominado MTT, para este ensayo se usaron células MFC-7, se trabajó con diluciones seriadas desde $1 \cdot 10^{-1}$ que representa el extracto hasta la $1 \cdot 10^{-11}$.

Las Figura 8,9,10 y 11 corresponden al porcentaje de muerte celular para los extractos de hojas-tallos y raíces de las especies de *V. microphylla* y *V. plantaginea*; en todos los casos se puede apreciar que el porcentaje de muerte celular no supera el 25%.

El porcentaje de muerte celular de 25% obtenido en este estudio en comparación con el porcentaje de muerte celular de otras investigaciones en otras especies de valerianas es bajo, esta diferencia se puede deber a varios factores según Lin S., & otros (2009) los más importantes son el solvente con el que se realizó el extracto y la especie de valeriana con la que se trabajó.

La mayoría de las investigaciones en el ámbito del efecto citotóxico de un extracto de origen vegetal trabajan con solvente etanólicos o metanólicos; debido a que siempre se obtienen mejores resultados, dado que la mayoría de los compuestos con actividad citotóxica presentan una polaridad más afín a estos solventes (Garro, Cardona, Rojano, Robledo, & Alzate, 2015). Por lo que se puede decir que el bajo efecto citotóxico de nuestros extractos se debe en gran parte al solvente con el que se trabajó en este caso agua y que posteriormente no se realizó un proceso de concentración del extracto.

En cuanto a la baja concentración de compuestos fitoquímicos relacionados con el efecto citotóxico sobre células cancerígenas. Un gran número de valepotriatos que

pertenecen al grupo de los iridoides han reportado tener actividad citotóxica contra células cancerígenas (Wang, y otros, 2010). Los principales valepotriatos que intervienen en la inhibición de la proliferación celular son sorbifolivaltrato, isoaltrato y valtrato; los mismo muestran una fuerte actividad citotóxica contra varias líneas celulares (GUO, y otros, 2006). Lo anteriormente mencionado explica que una baja concentración de estos fitoquímicos en los tratamientos aplicados es la razón que se alcance como máximo un porcentaje de muerte celular de 23, 62 % (véase Fig. 11).

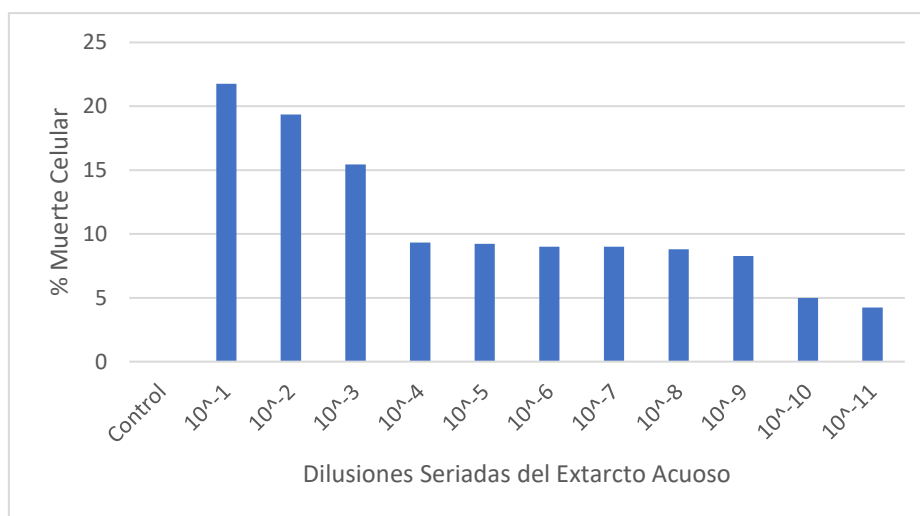


Figura 8. Diagrama de barras para diluciones seriada del extracto acuoso hojas-tallos de *V. microphylla*. Efecto de las diluciones seriadas sobre actividad citotóxica.

En el caso del extracto acuoso Hojas/Tallos de *Valeriana microphylla* (véase Fig. 8), se observa que para la dilución $1 \cdot 10^{-1}$ se obtiene el mayor porcentaje de muerte celular siendo el mismo de 21, 77%; además se observa que este porcentaje disminuye progresivamente mientras más diluido se encuentra en extracto. Se aprecia que la caída del porcentaje de muerte celular no es tan excesiva en las tres primeras diluciones ($1 \cdot 10^{-1}$, $1 \cdot 10^{-2}$ y $1 \cdot 10^{-3}$). Existe un intervalo de diluciones que va desde $1 \cdot 10^{-4}$ hasta $1 \cdot 10^{-9}$ en el cual el porcentaje de muerte celular permanece casi constante sin variaciones significativas entre las diluciones. El menor porcentaje de muerte celular fue de 4,23% correspondiente la dilución $1 \cdot 10^{-11}$.

El efecto citotóxico del extracto acuoso de raíces de *V. microphylla* (véase Fig. 9), al contario de los demás extractos (véase Fig. 8, 9 y 10) presentó un comportamiento más constante, es decir el porcentaje de muerte celular no varió en gran medida en función

de las diluciones realizadas. Lo anterior muestra que la muerte celular no tiene nada que ver con el extracto, que puede considerarse como muerte celular natural provocada por factores externos relacionados con el medio de cultivo o aumento de la concentración de caspasa. (Sánchez, 2013).

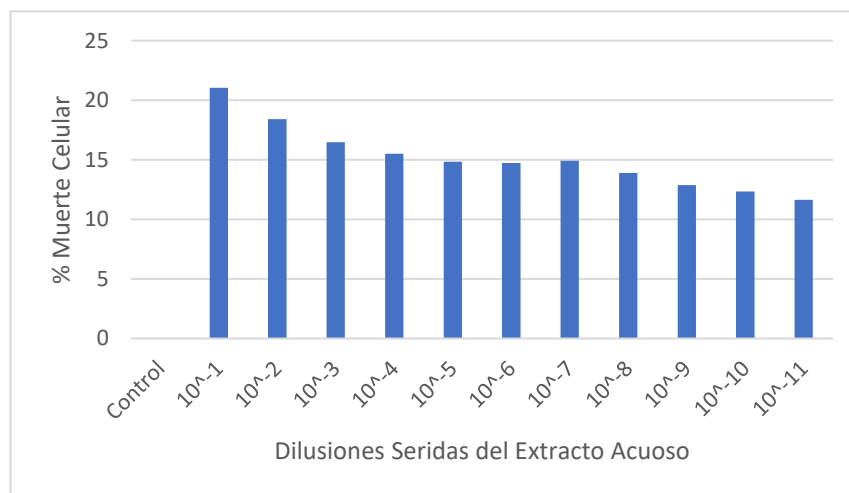


Figura 9. Diagrama de barras para diluciones seriada del extracto acuoso de raíz de *V. microphylla*. Efecto de las diluciones seriadas sobre actividad citotóxica.

3.2.2 Actividad citotóxica en el extracto acuoso de *Valeriana plantaginea*

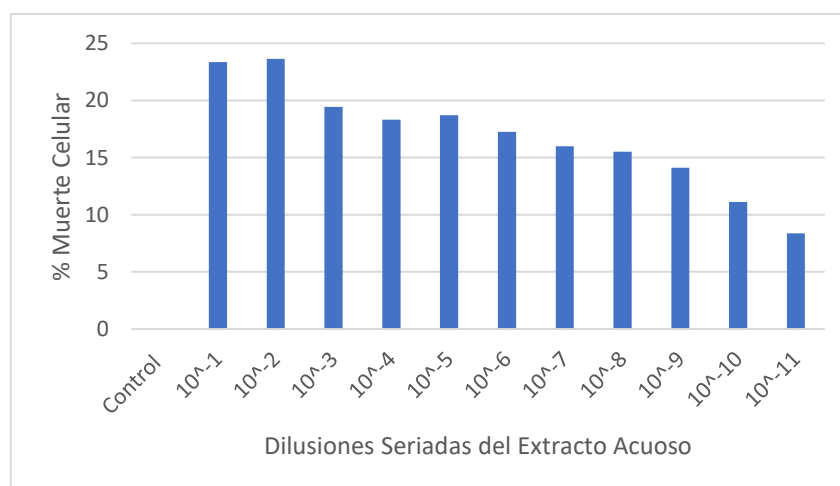


Figura 10. Diagrama de barras para diluciones seriada del extracto acuoso hojastallos de *V. plantaginea*. Efecto de las diluciones seriadas sobre actividad citotóxica.

El extracto de Hojas/Tallos de *Valeriana plantaginea*, alcanzó el porcentaje de muerte celular más alto en relación con los demás tratamientos, siendo el mismo de 23,37%.

Esto tiene concordancia con el rendimiento obtenido en el proceso de extracción dado que este extracto posee el mejor rendimiento. Se puede observar que el descenso en el porcentaje de muerte celular (véase Fig. 10) en las diluciones sucesivas disminuye, pero no de manera significativa teniendo un porcentaje de 8,37% para la muestra más diluida.

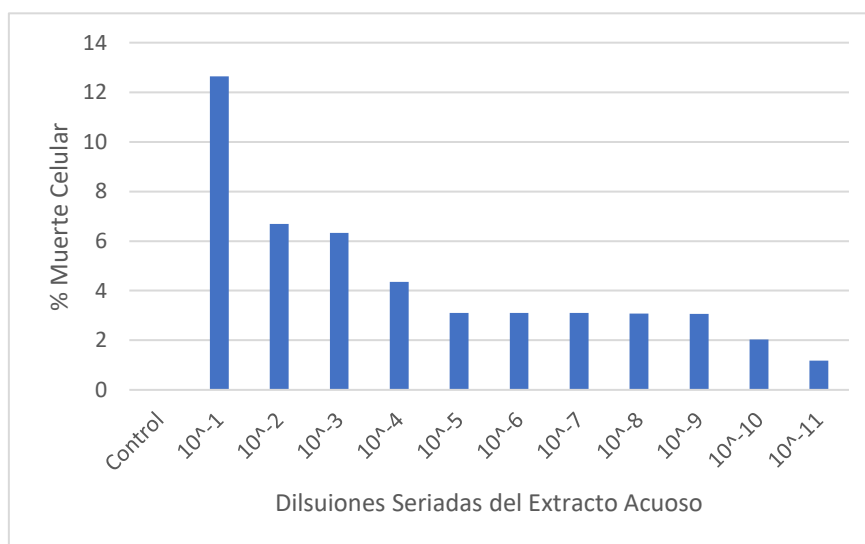


Figura 11. Diagrama de barras para diluciones seriada del extracto acuoso de raíz de *V. plantaginea*. Efecto de las diluciones seriadas sobre actividad citotóxica.

El extracto de raíz de *V. plantaginea* presenta el porcentaje de muerte celular más bajo de todos los tratamientos evaluados, siendo el mismo de 12,64% (véase Fig. 11). El valor obtenido para este extracto presenta una gran variación con respecto a los demás tratamientos; esta variación no tiene relación con el rendimiento alcanzado al momento de la extracción, debido a que el rendimiento de la extracción es uno de los más altos. Como se mencionó anteriormente el bajo porcentaje de muerte celular es un indicativo de que una gran fracción de fitocompuestos presentes en este extracto específicamente no presenta actividad citotóxica significativa.

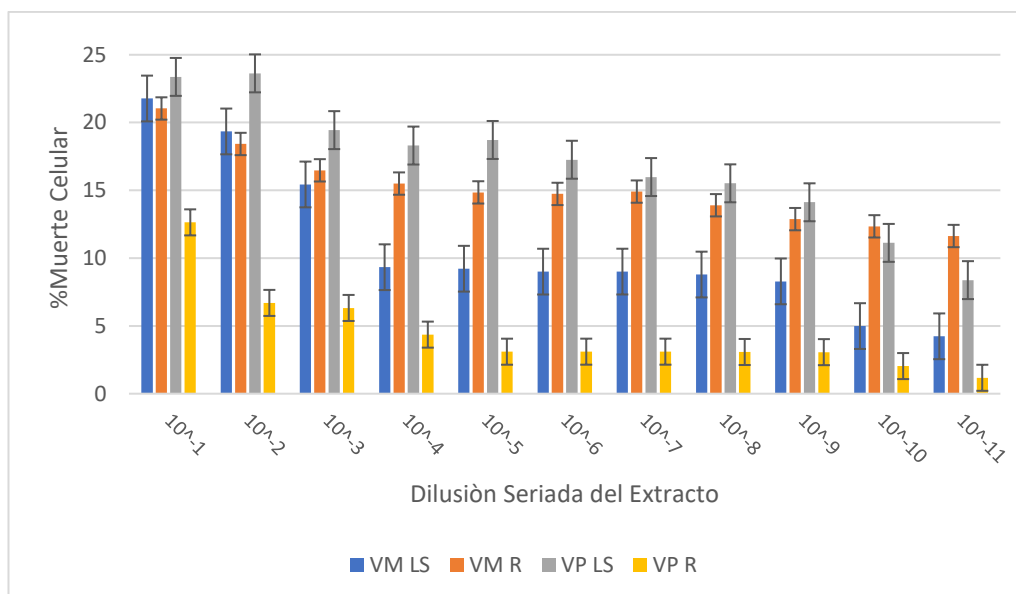


Figura 12. Gráfico comparativo de las medias de los tratamientos usados para determinar la actividad citotóxica. VM HT (Hojas/Tallos de *V. microphylla*), VM R (Raíz *V. microphylla*), VPHT (Hojas/Tallo *V. plantaginea*) y VPR (Raíz *V. plantaginea*). $p=0,000$.

El análisis ANOVA realizado (véase Anexo 1) determinó un $p < 0,05$; por lo que la citotoxicidad depende de la combinación de factores como la especie de valeriana (*V. microphylla* y *V. plantaginea*) y las partes (hojas, tallos y raíces) utilizadas para realizar los extractos. Además, la prueba de Tukey (véase Tabla 2.) realizada indica que existe una relación directa en la capacidad citotóxica de los extractos y las partes de la planta con las que se realizó dicho extracto.

En base a los gráficos obtenidos (véase Fig. 8, 9, 10 y 11) y el análisis ANOVA realizado se concluye que no existe una diferencia significativa entre las especies de valeriana y la estructura vegetal con la que se trabajó; sin embargo en base a estudios en otras especies de valeriana los extractos provenientes de las partes subterráneas de las valerianas suelen tener una mayor concentración de compuestos citotóxicos (Glaser, Schulthesis, Moll, Hazra, & Holzgrave, 2015). Por ende, en estudios su actividad citotóxica suele ser mayor que si se trabaja con extractos de partes aéreas de la planta; el resultado de la investigación y que no exista diferencia significativa puede tener su origen como ya se mencionó antes en la especie de valeriana, dado que las especies con las que se trabajó nunca han sido estudiadas por lo que se desconoce su composición bioquímica.

3.3. Actividad antioxidante

3.3.1. Método de Griess

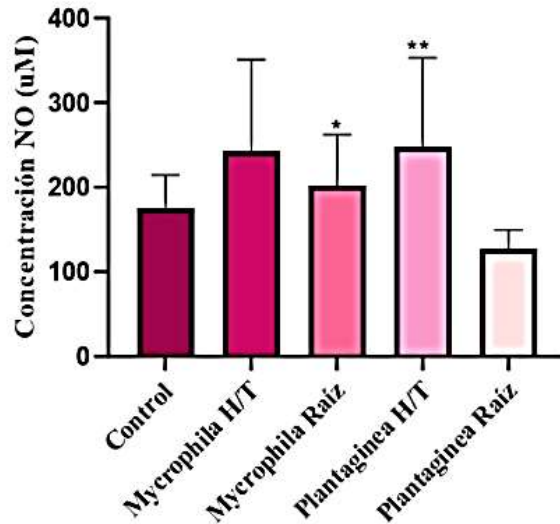


Figura 13. Diagrama de actividad antioxidante usando el método de Griess para determinar la concentración de NO (uM). * $p > 0,01$ V. *microphylla* H/T vs V. *plantaginea* R ; ** $p > 0,05$ V. *plantaginea* H/T vs V. *plantaginea* R.

El resultado del estudio de la actividad captadora de óxido nítrico o llamado ensayo de Griess (véase Fig. 13), muestra una concentración de óxido nítrico (NO) superior al control en los tratamientos *V. microphylla* H/T, *V. plantaginea* H/T y *V. microphylla* Raíz. El aumento de NO en los tratamientos nombrados anteriormente no tiene un origen claro; sin embargo, según Gorocica Rosete, Chávez Sánchez, Lascurain Ledesma, Espinosa Mancilla, & Zenteno Galindo (1999), indican que la concentración de NO *in vitro* está relacionada con factores biológicas que alteran el medio, tales como concentración gaseosa (O_2 y CO_2), composición del medio de cultivo, contaminación por microorganismos y la presencia de inductores de las enzimas óxido nítrico sintasas (NOS).

En cuanto a las células cancerígenas esta presenta una relación directa entre su potencial metastásico y la producción de NO (Carrillo & Osiris, 2017), y se ha visto favorecida la producción de nitritos cuando se agregan inductores de los genes *NOS* (Díaz Arce, 2004). Por lo tanto, el incremento en los tres tratamientos (*microphylla*

H/T, *plantaginea* H/T y *microphylla* Raíz) puede ser causado a que los extractos contenían fitocompuestos con potencial de inducción de genes y enzimas NOS.

En el caso del tratamiento *V. plantaginea* Raíz (véase Fig. 13) se aprecia una disminución en la concentración de NO en relación con el control, esto es un indicativo de que el extracto contiene una mayor cantidad de compuestos antioxidantes como fenoles y flavonoides (Sánchez-Moreno , Calixto , & Larrauri, 1999). Sin embargo la disminución en la concentración no es demasiado representativa; esto se debe a que los principales compuestos antioxidantes que interfieren en la eliminación de ROS son los fenoles que reaccionan directamente con estas moléculas, o metales que pueden quelarse como cofactores de enzimas que interfieren con la producción de ROS (Ortiz, Sánchez, Méndez , & Murillo, 2009), pero la concentración de fenol en extractos de plantas está relacionada con el solvente utilizado para la extracción; por lo tanto, según Pietta (2000) cuando el solvente es etanol, comparado con el solvente acuoso (agua), la concentración de fenol en extractos de plantas puede ser mejor.

El resultado del análisis ANOVA realizado indica que existe no existe diferencia significativa ($p > 0,05$) entre el tratamiento usado y la concentración final de NO en las muestras estudiadas, sin embargo, si se encontró diferencias al comparar hoja y tallo versus raíz de las diferentes especies de valerianas.

3.3.2. Capacidad antioxidante equivalente Trolox (TEAC)

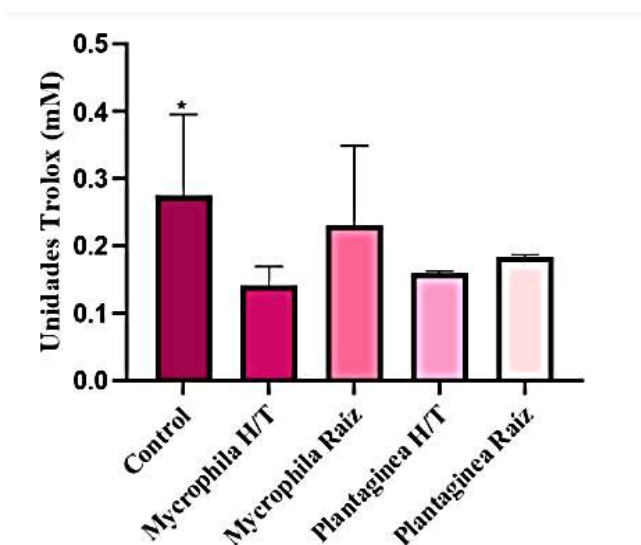


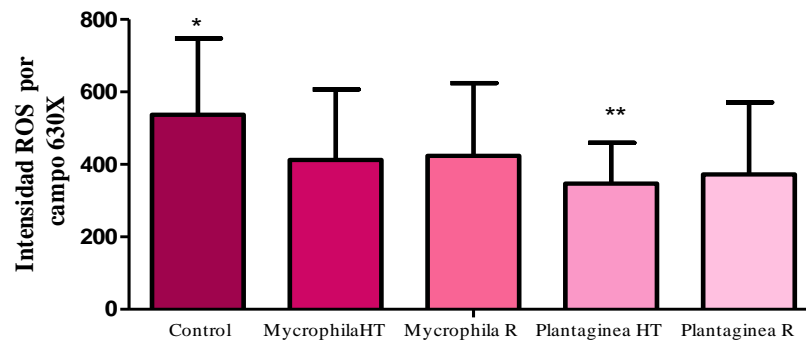
Figura 14. Diagrama de actividad antioxidante usando el método de Trolox para determinar las unidades Trolox. * $p > 0,05$ Control vs *V. microphylla* H/T

El ensayo de capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) indica la capacidad antioxidante de una sustancia determinada en comparación con el estándar de Trolox (Arts Aalt, Haenen, & Voss, 2003). En la Fig.14 se observa que en ninguno de los tratamientos utilizados se obtiene una capacidad antioxidante equivalente a Trolox mayor a la del control, sin embargo, para *V. microphylla* Raíz y *V. plantaginea* Raíz se obtiene un valor de unidades de Trolox más cercanos al control. Lo mencionado anteriormente se debe este ensayo mide todos los compuestos con potencial antioxidante, por lo que los extractos provenientes de las partes subterráneas de las valerianas (raíces) como se mencionó en este estudio poseen una mayor cantidad de compuestos con propiedades antioxidantes (Garro, Cardona, Rojano, Robledo, & Alzate, 2015). Para los casos de *V. microphylla* H/T y *V. plantaginea* H/T se aprecia que su capacidad antioxidante es realmente baja al compararse con el control esto se debe a la concentración de los extractos dado que según Carbonel Villanueva, Suárez Cunza, & Arnao Salas, (2010) mencionan que para el cálculo de la actividad equivalente de Trolox se obtienen mejores resultados cuando se trabaja con extractos concentrados que cuando se usan extractos crudos.

En el análisis estadístico mostró diferencia significativa ($p > 0,05$) entre el control y el extracto de *microphila* hoja y tallo, el cual fue el extracto con menor capacidad antioxidante.

Los resultados obtenidos en este estudio son consistentes con los obtenidos en la prueba de Griess, por lo que se puede decir que los extractos de valerianas utilizados en este estudio tienen baja capacidad antioxidante debido a factores como los solventes, proceso de extracción y concentración.

3.4. Expresión de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) en células MCF-7



* $p < 0.001$ Control vs MHT, MR, PHT y PR

** $p < 0.05$ PHT vs MR

Figura 15. Diagrama de expresión de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) en células MCF-7.

Para cada tratamiento se determinó la expresión de especies reactivas de oxígeno, que producen fluorescencia fotoestable y cuantifica el estrés oxidativo celular de manera eficiente mediante por intensidad por campo con una magnificación 630X. Este ensayo permitió medir la actividad de hidroxilo, peroxilo y otras especies de oxígeno dentro de una célula. Al unirse ROS con el reactivo empleado se oxida, emitiendo una señal a nivel de la mitocondria y núcleo. En la Fig. 15 se observa que ningún tratamiento utilizado es mayor al del control, sin embargo *V. microphylla* H/T y *V. microphylla* Raíz se obtiene un valor de intensidad más contiguos al del control, es decir que se expresó mayor cantidad de proteínas al unirse con el anticuerpo, lo que hace que la fluorescencia aumentara.

En cuanto, para los tratamientos de *V. plantaginea* H/T y *V. plantaginea* raíz la fluorescencia es mínima; existe diferencia significativa ($p < 0.001$) entre el control y los diferentes tratamientos, cabe destacar que en las células tratadas con plantaginea HT se evidencio una reducción considerable de ROS, los cual podría considerarse beneficioso en este tipo de modelo celular y su repercusión en la terapéutica.

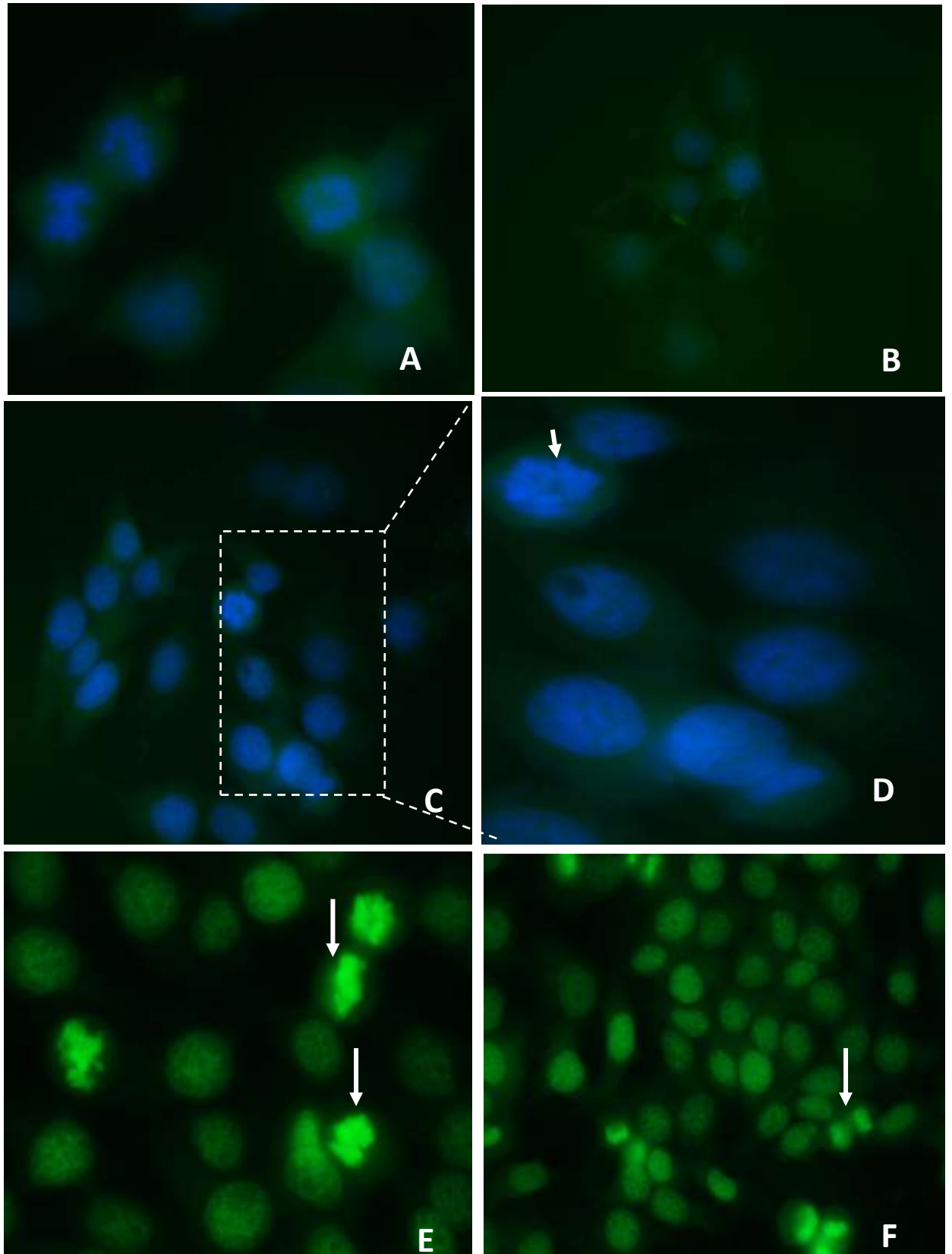


Figura 16. Expresión de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) en células MFC-7
 A, B corresponde al Control, C, D corresponde a *V. microphylla* Hojas/Tallos, E, F
 corresponde a *V. microphylla* raíz. Las flechas indican células apoptóticas. Se
 emplearon los filtros GFP (475-509 nm) y DAPI (489-513nm) con una
 magnificación 630X.

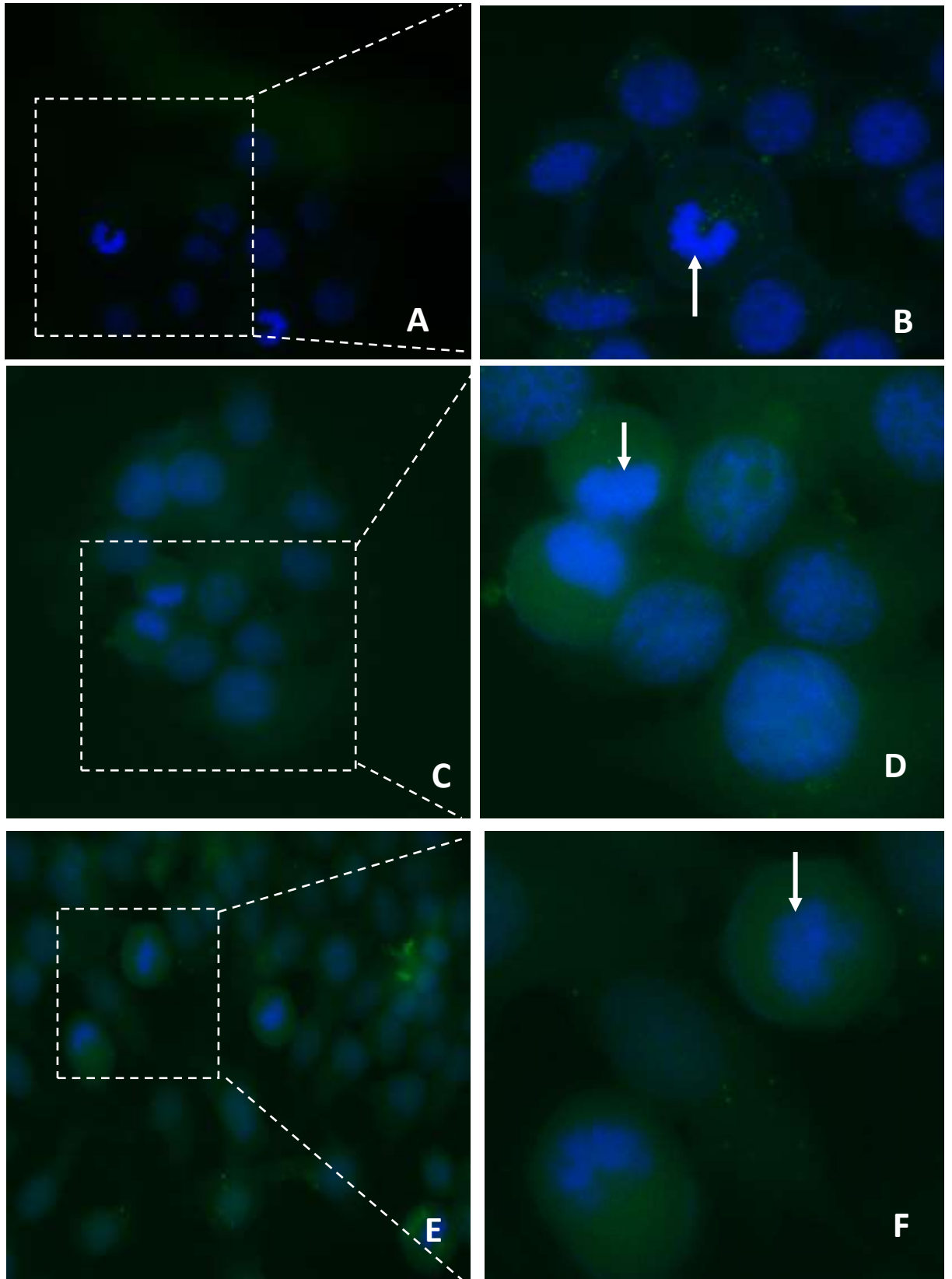


Figura 17. Expresión de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) en células MFC-7
 A, B corresponde a *V. plantaginea* raíz, C, D, E, F corresponde a *V. plantaginea*
 Hojas/Tallos. Las flechas indican células apoptóticas. Se emplearon los filtros GFP
 (475-509 nm) y DAPI (489-513nm) con una magnificación 630X

Considerando el número total de células y el número de células que expresan, es muy importante analizar la media y desviación estándar de las células positivas en cada campo, porque la intensidad puede explicarse subjetivamente y la identificación por conteo indica el valor de las células reales. En la Fig. 16 se observa la expresión de ROS en los núcleos, además permitió localizar células apoptóticas (núcleo forma de mariposa) que en su gran mayoría se refleja en las muestras de E, F corresponde a *V. microphylla* raíz y a E, F corresponde a *V. plantaginea* Hojas/Tallos (véase Fig.17)

3.5 Expresión de Anión mitocondrial MITOSOX en células MCF-7

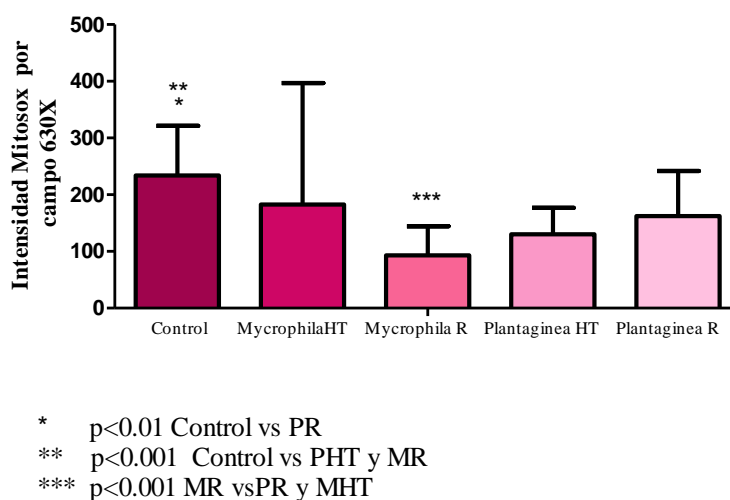


Figura 18. Diagrama de expresión de Anión mitocondrial (MITOSOX) en células MCF-7

El anión mitocondrial (MITOSOX) se dirige específicamente a las mitocondrias de las células vivas. Se oxida fácilmente por superóxido, pero no se oxida por otros sistemas generadores de ROS o RNS. Cuando se une a ácidos nucleicos, el producto de oxidación es altamente fluorescente. La expresión de anión mitocondrial se analizó en células MFC-7 tratadas con VMHT, VMR, VPHT y VPR, junto al control sin tratamiento.

Las placas fueron medidas por la intensidad en campo de 630 X, donde se presentó los siguientes resultados, en la Fig. 16 se observa que al comparar el control y los tratamientos se obtuvieron diferencias significativas entre las células control con todos los tipos de valeriana, sin embargo es importante resaltar la considerable reducción de anión superóxido mitocondrial en las células tratadas con *V. microphylla* raíz, aunado

a los resultados obtenidos en esta especie en la expresión de ROS es un buen indicio que permitiría inferir una posible actividad terapéutica.

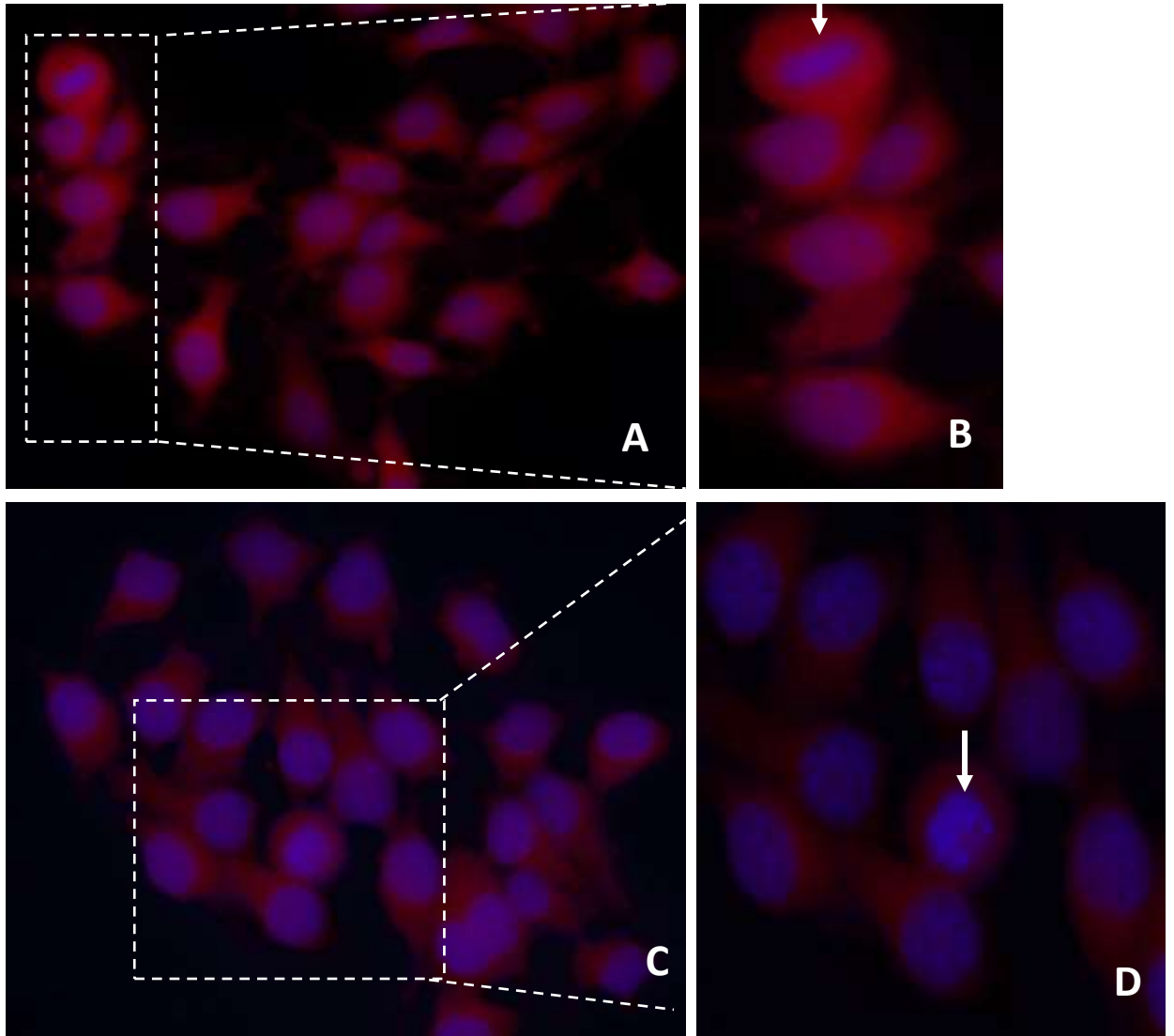


Figura 19. Expresión de anión superóxido (MITOSOX) en la línea celular MFC-7
A, B corresponde al Control, C, D corresponde a V. microphylla Hojas/Tallos.

Mitosox produce una fluorescencia roja en mitocondrias, por lo tanto, en la Fig.19 se observa que las muestras de control (A, B) se expresan con mayor intensidad lo que indica que existe la presencia de superóxidos y *V. microphylla* Hojas/Tallos que corresponde a C, D la fluorescencia es mínima y además existe la presencia de células apoptóticas en cantidades mínimas.

3.6 Expresión de glutatión en células MCF-7

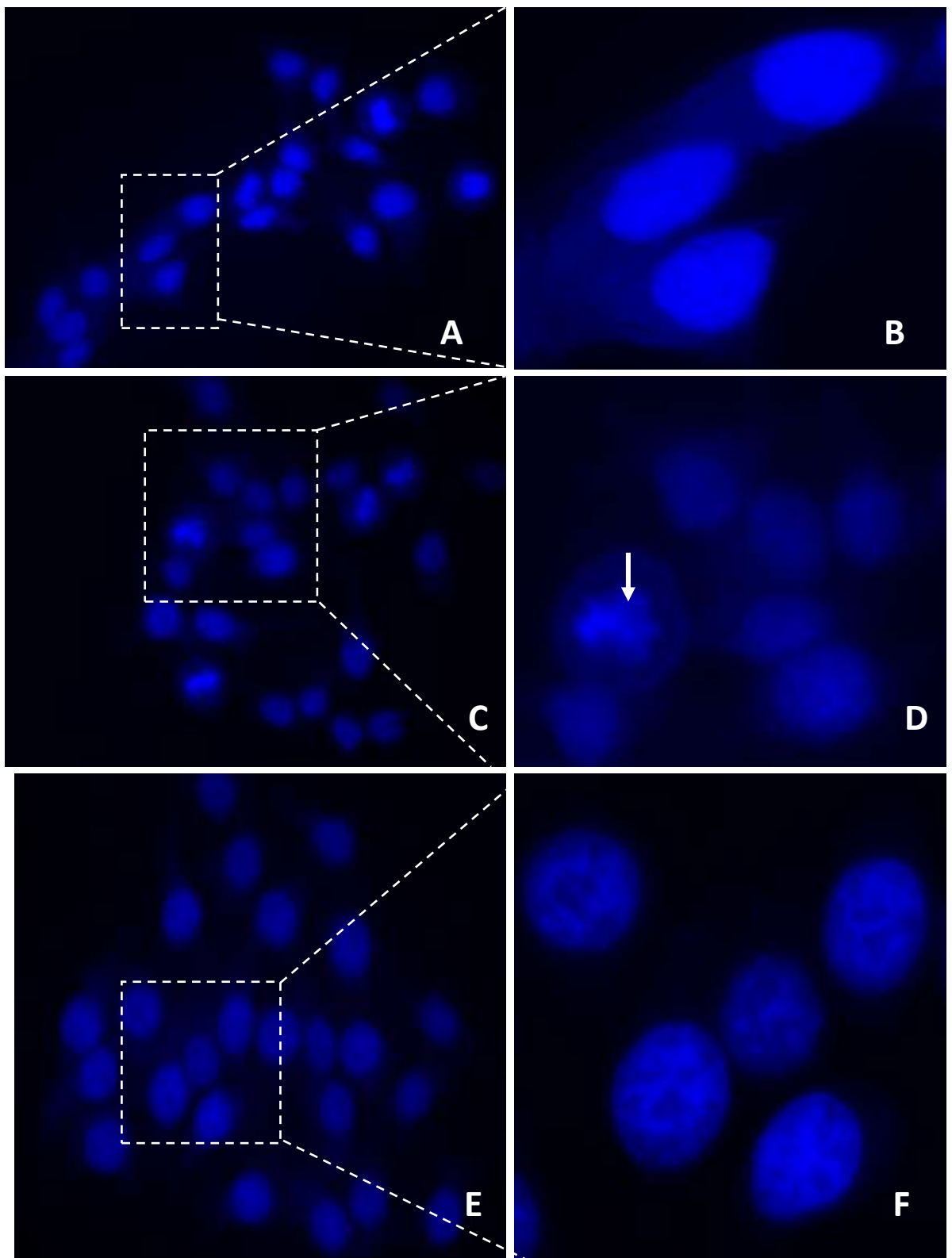


Figura 20. Expresión de glutatión en la línea celular MFC-7
A, B, C, D corresponde al Control, E Y F corresponde a *V. microphylla*
Hojas/Tallos.

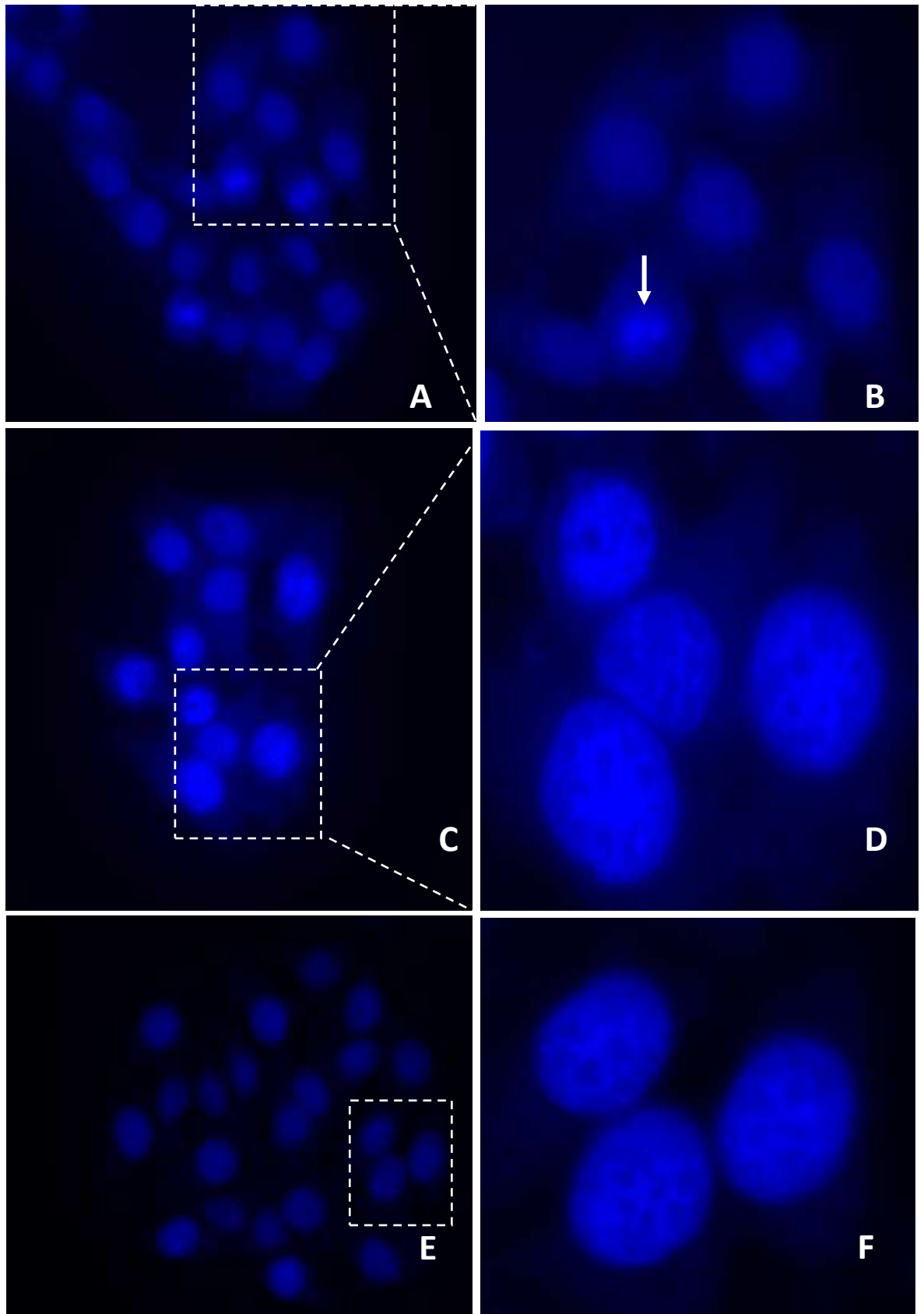


Figura 21.. Expresión de glutatión en la línea celular MFC-7.
A, B, corresponde a V. microphylla Hojas/Tallos C, D, F y E corresponde a V. microphylla Raíz

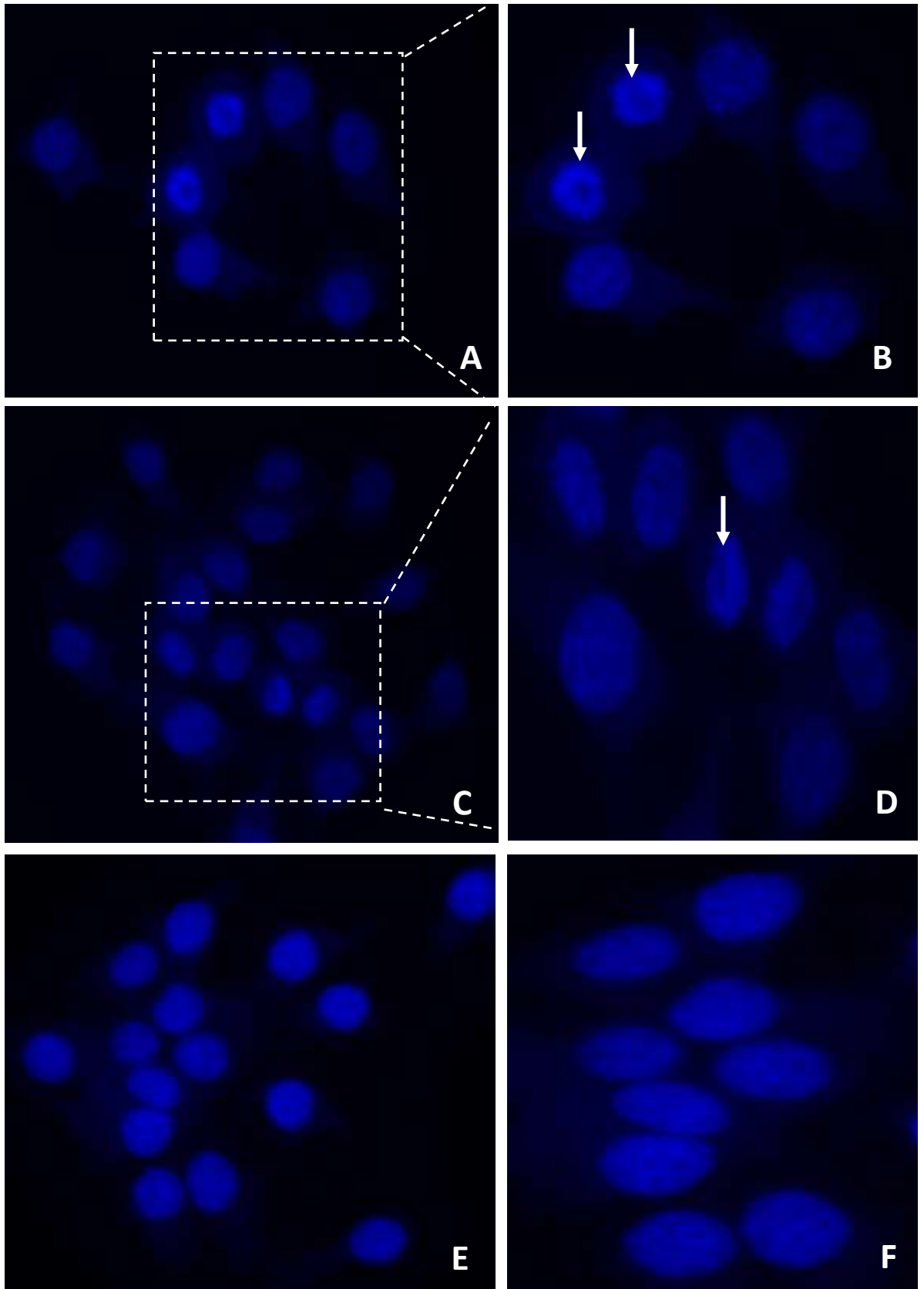


Figura 22.. Expresión de glutatión en la línea celular MFC-7
A, B, C, D corresponde a *V. plantaginea* Hojas/Tallos, E, F corresponde a *V. plantaginea* Raíz

El glutatión es un ensayo colorimétrico que reacciona con el grupo tiol libre en GSH para obtener un producto coloreado, diseñado para cuantificar y detectar glutatión en sangre completa, suero, plasma, glóbulos rojos, orina, lisados celulares y muestras de tejido. El glutatión (GSH) es la concentración más alta de tiol no proteico en células de mamíferos, con una concentración de 0,5 a 10 mM. GSH juega un papel clave en muchos procesos biológicos, incluida la síntesis de proteínas y ADN, el transporte de aminoácidos y la protección de las células contra la oxidación.

El glutatión peroxidasa (GP) puede utilizar GSH como agente reductor para minimizar los niveles dañinos de peróxido de hidrógeno celular. El dímero GSH oxidado GSSG se forma mediante la reacción GP de GSH y peróxido. El potente inductor de NFκB, el acetato de tetradecanoilforbol, aumenta los niveles de GSSG intracelular y la relación GSSG / GSH, lo que indica que GSSG juega un papel importante en la cascada de señales de activación de NFκB. El glutatión S-transferasa (GST) es una enzima importante que cataliza la reacción de adición nucleofílica de GSH a electrófilos. Están codificados por cinco familias de genes, cuatro de las cuales codifican para GST citoplásmica y una codifican para GST microsomal (Bonola Gallardo, 2015).

Mediante la intensidad del campo 630 X, en la Fig. 20 se observa que las de control (A, B, C, D) se expresa glutatión en los nucleolos en pocas cantidades que en las células apoptótica a comparación de *V. microphylla* Hojas/Tallos (E, F), debido que el reactivo se unió a cualquier grupo sulfidrilo accesible (-SH, cisteína), ya sea glutatión reducido o la superficie de una proteína; en cuanto en la Fig. 21 representa la relación entre *V. microphylla* Hojas/Tallos (A, B) y *V. microphylla* Raíz (C, D, F, E), la presencia de la intensidad de fluorescencia en sus nucleolos es significativo (puntos de color azul con mayor intensidad dentro del núcleo)

En cambio, para las muestras de *V. plantaginea* Hojas/Tallos y *V. plantaginea* Raíz, (véase Fig.22), se observa células apoptóticas y células en su estado normal con expresión de glutatión reducido en gran mayoría celular en comparación al del control; debido que existe un balance entre grupos tiólicos libres y los puentes S-S.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

- Mediante el proceso de pulverización de las muestras se obtuvo diferentes extractos, siendo el de *Valeriana plantaginea* Hojas/Tallos el mejor tratamiento de extracción con 42,41% \pm 0,05 en Solidos Solubles Totales.
- Se determinó la capacidad citotóxica de 4 extractos diferentes en células MFC-7, donde el extracto de Hojas/Tallos de *Valeriana plantaginea* alcanzó el porcentaje de muerte celular significativo de 23,37%, dilución 10^{-2} en relación con los demás tratamientos
- Se evaluó ROS total, Anión superóxido mitocondrial y glutatión para cada uno de los tratamientos, donde *V. microphylla* raíz y a *V. plantaginea* Hojas/Tallos se presenció mayor cantidad de células apoptóticas en ROS, aunque para cada ensayo la intensidad de fluorescencia esta debajo al del control.
- Con los ensayos Trolox y Griess se determinó la capacidad antioxidante *in vitro* en los sobrenadantes de los extractos de valeriana, donde existió baja presencia de capacidad antioxidante para todos los tratamientos por factores de solvente, extracción y concentración de las muestras.
- Tanto en los extractos de *Valeriana microphylla* y *Valeriana plantaginea* mostraron potencial actividad en la reducción de ROS y anión superóxido, que podría sugerir bondades terapéuticas, las cuales deben continuar estudiándose.

4.2 RECOMENDACIONES

- Realizar un análisis con solventes etanólicos para la composición del extracto y la determinación de concentración de sólidos totales de *Valeriana Microphylla* y *Valeriana plantaginea*
- Utilizar protocolos como liofilización, fraccionamiento, cromatografía líquida que permite conservar de mejor manera todos los principios activos de las especies
- Realizar estudios de capacidad apoptótica de manera que se construya un análisis bioquímico completo de los componentes de los extractos.
- Realizar estudios de capacidad antioxidante *in vitro* de *Valeriana Microphylla* y *Valeriana plantaginea* con la línea celular Hela (cáncer de cuello uterino)

BIBLIOGRAFÍA

- Ascate-Pasos, M., Ganoza-Yupanqui, M., Suárez-Rebaza, L., & Bussmann, R. (2020). *Valeriana pilosa Ruiz & Pav.: una revisión de usos y farmacología*. Lima, Perú: Scielo. Obtenido de <http://ethnobotanyjournal.org/index.php/era/article/view/2253>
- Díaz Arce, D. (2004). *Óxido nítrico, mutagénesis y cáncer*. Cuba. Recuperado el 02 de Diciembre de 2020, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002004000300009
- Lin, S., Shen, Y.-H., Li, H.-L., Yang, X.-W., Chen, T., Lu, L.-H., . . . Wang, H. (2009). *Acylated Iridoids with Cytotoxicity from Valeriana jatamansi*. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104331>
- Ortiz, H., Sánchez, W., Méndez, J., & Murillo, E. (2009). *POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE HOJAS Y CORTEZA DE BAUHINIA KALBREYERI HARMS: CONTRIBUCIÓN DE SUS FLAVONOIDES EN ESTA ACTIVIDAD*. Recuperado el 02 de Diciembre de 2020, de https://www.researchgate.net/profile/Jonh_Mendez_Arteaga/publication/268421753_POTENCIAL_ANTIOXIDANTE_DE_HOJAS_Y_CORTEZA_DE_BAUHINIA_KALBREYERI_HARMS_CONTRIBUCION_DE_SUS_FLAVONOIDES_EN_ESTA_ACTIVIDAD/links/54ede6ea0cf25238f9393310.pdf
- Racero, J. C., González, I., & Macías, A. J. (2004). *Síntesis de sesquiterpenos isocariolánicos con potencial actividad antifúngica frente a Botrytis cinerea*. Scielo. Recuperado el 31 de 10 de 2020, de <http://www.scielo.org.mx/pdf/rsqm/v48n1/v48n1a12.pdf>
- Alejandro Bucciarelli, E. J. (2010). Perspectivas del uso de productos fitoterápicos en el tratamiento del insomnio, la ansiedad y desordenes relacionados. . *Revista de la Asociación Médica de Bahía Blanca*, 20(4), 89-95.
- Alomar Maria Fernanda. (2015). Antioxidantes: captadores de radicales libres o sinonimo de salud? 3-15.
- Ambrosio, M. d. (2020). *Cáncer genera nuevas desigualdades en América Latina*. Recuperado el 2020 de Marzo de 28, de https://www.scidev.net/america-latina/salud/noticias/cancer-genera-nuevas-desigualdades-en-america-latina.html?__cf_chl_jschl_tk__=f9cd610ad33498aa6602f84189fb39e76031553d-1585343494-0-AfPaiZGEZzJvdJq1FfPr3YQGk5j-R7TH43C5QdACVjmEzVsz75wYGyFPoqhCF_XSuoJCoO
- American Cancer Society. (2019). *Cirugía de Cáncer*. Obtenido de <https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/8470.96.pdf>
- Armstrong, T., & Dr. Mark Gilbert. (2014). ¿Qué es la quimioterapia? En *Quimioterapia* (págs. 3-10). Chicago: COPYRIGHT .

- Arts Aalt, M., Haenen, B. G., & Voss, H.-P. (2003). *La capacidad antioxidante de los productos de reacción limita la aplicabilidad del ensayo de capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC)*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fct.2003.08.004>
- Asociación Española Contra el Cáncer. (2018). *Fases y etapas del cancer*. Obtenido de <https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/que-es-cancer/fases>
- Begoña, M. R. (2017). *Tratamiento Fitoterapeutico de las alteraciones el sueño como alternativa a los fármacos de síntesis desde la farmacia Comunitaria*.
- Bertrán, A. S. (2020). *Cáncer de Mama*. Obtenido de <https://seom.org/info-sobre-el-cancer/cancer-de-mama?showall=1>
- Bogdan, I., & Baumann Leslie. (2010). Antioxidantes. *Revista Chilena Dermatol*, 8-20.
- Bonola Gallardo, I. C. (2015). Estrés oxidante: el sistema enzimático glutatión y la salud bucal. *Elsevier*, 2-8 .
- Bresolí Roger. (2018). *Oxígeno Singlete*. Obtenido de <https://m.iqs.edu/es/noticia/generaci%C3%B3n-y-detecci%C3%B3n-efectiva-de-ox%C3%ADgeno-singlete-en-terapias-fotodin%C3%A1micas>
- Cajaraville, Carreras, Massó, & Tamés. (2017). *Oncología*. Obtenido de <https://www.sefh.es/bibliotecavirtual/fhtomo2/CAP14.pdf>
- Carbonel Villanueva, K. N., Suárez Cunza, S., & Arnao Salas, A. I. (2010). *Características fisicoquímicas y capacidad antioxidante in vitro del*. Recuperado el 02 de Diciembre de 2020, de <http://www.scielo.org.pe/pdf/afm/v77n4/a03v77n4.pdf>
- Carmen, U., Samara, Á., & JorgensenPeter. (2010). Guía de 100 plantas silvestres de paramo del Paruqe Nacional Cajas. Cuenca: Grafisum.
- Carrillo, A., & Osiris, E. (2017). *Papel del óxido nítrico (NO) y de especies reactivas de nitrógeno (RNS) sobre el potencial metastásico de células tumorales de mama, MDA-MB 231*. Recuperado el 02 de Diciembre de 2020, de <https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/619>
- Carvajal Carlos. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*.
- Celia, C., & Hernandez Pablo. (2018). Activos antioxidantes en la formulación de productos cosméticos antienvjecimiento. *Ars Pharm*, 77-84.
- Claudia Dorado Martinez, C. R. (2003). Estrés Oxidativo y neurodegeneración . *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 46(6), 229.
- Claudia, J., Mónica, Z., & Uribe Paulina. (2016). Oxidación y antioxidantes: hechos y controversias. *Rev Asoc Colombia Dermatol*, 162-173.

- Corrales, L. C. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 10(18), 135-250.
- Cuatrecasas José. (2007). *Valeriana plantaginea Kunth - Valerianaceae*.
- Danilo, M., Raffaella, A., Adolfo, V., & Ulloa Carmen. (2016). Valerianas. En *Flora del páramo del cajas* (págs. 56- 148). Cuenca: Editorial Don Bosco-Centro Gráfico Salesiano.
- Diaz Guillermo, E. W. (2016). Estres Oxidativo . *RevistaN°13 Motrocidad y Persona*, 45-60.
- Dr. Luis Diaz Soto. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidants. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 1561-3046.
- Dr. Pastor Luna, D. P. (2014). Las mitocondrias como blanco terapeutico . *Revista Mexicana de Anestesiología*, 37(4), 283-296.
- Durán Hebe Alicia. (1994). Análisis de la promoción y progresión tumoral inducidas por peróxido de benzoilo en el modelo de carcinogénesis en multiples estadios en pie de ratón. *Biblioteca Digital FCEN-UBA*, 1-134.
- Elizabeth Vallejo, A. R. (2017). Una poderosa herramienta en la medicia preventiva del cancer: los antioxidantes . *El Residente*, 12(3), 104-111.
- Elizabeth, V., Angélica, R., & Torres Olivia. (2017). Una poderosa heramienta en la medicina preventiva del cáncer: los antioxidantes. *El Residente*, 104-111.
- Emory Winship Cancer Institute. (2020). *Cirugía para el cáncer*. Obtenido de <https://www.cancerquest.org/es/para-los-pacientes/tratamientos/cirugia>
- Enfermedades, C. p. (2018). *Cancer de mama*. Obtenido de https://www.cdc.gov/spanish/cancer/breast/basic_info/what-is-breast-cancer.htm
- Esther Viada Pupo, L. G. (2017). Estres Oxidativo. *Revista SCIELO*, 21(1).
- Galan Carlos. (2018). *Valeriana microphylla*.
- García , M., Cortes, M., & Rodríguez , E. (2010). *Evaluación del Secado de Perejil Aplicando Técnicas de Deshidratación Osmótica Como Pretratamiento*. Recuperado el 31 de 10 de 2020, de <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v63n2/a22v63n01.pdf>
- García, A. E., Izquierdo, M. E., & Moreisby Izquierdo Expósito. (2004). *Revista SCIELO*.
- Garro, A., Cardona, W., Rojano, B., Robledo, S. M., & Alzate , F. (2015). *Antioxidant and cytotoxic activity of extracts of Pilea dauciodora Wedd (Urticaceae)*. Recuperado el 23 de Noviembre de 2020, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962015000100008

- Garza Jaime. (2014). *El Cáncer*. México: Monterrey Printed.
- Glaser , J., Schulthesis , M., Moll, H., Hazra, B., & Holzgrave, U. (2015). *Antileshmanian and Citotoxic Compounds from Valeria Wallichii and Identification of a novel Nepetolactone Derivative*. doi:<https://doi.org/10.3390/molecules20045740>
- GLOBOCAN. (2018). *Informe GLOBOCAN 2018*. Recuperado el 28 de Marzo de 2020, de <https://www.edicionmedica.ec/secciones/salud-publica/ecuador-registra-28-058-nuevos-casos-de-c-ncer-seg-n-informe-de-oms-92834>
- Gobierno de México. (2019). *La cirugía como tratamiento contra el cáncer*. Obtenido de <https://www.infocancer.org.mx/?c=tratamiento&a=cirugia-tratamiento-contra-cancer>
- Gómez Quiróz Luis. (2015). *Especies Reactivas de Oxígeno y Cáncer*. México: Editorial el Manual Moderno.
- Gorocica Rosete, P., Chávez Sánchez, R., Lascurain Ledesma, R., Espinosa Mancilla, B., & Zenteno Galindo, E. (1999). *Óxido nítrico, una molécula multifuncional*. Recuperado el 02 de Diciembre de 2020, de <https://www.medigraphic.com/pdfs/iner/in-1999/in994i.pdf>
- Gregorio Tiskow Drost, P. (2009). Radicales libres en biología y medicina: Una breve Revisión . *Gaceta de Ciencia y Veterinarias* , 2(1), 44-57.
- GRONER, B. (16 de 05 de 2006). *ACIDO VALPROICO PARA EL TRATAMIENTO DE CANCER DE MAMA, CANCER DE COLON, CANCER DE CABEZA Y CUELLO, CARCINOMA DE CELULAS PEQUEÑAS DE PULMON Y LEUCEMIA, EN COMBINACION CON RADIOTERAPIA*. Obtenido de <https://patentscope.wipo.int/search/es/detail.jsf?docId=ES5701768&tab=NATIONALBIBLIO>
- GUO, Y., XU, J., LI, Y., Watanabe, R., Oshima, Y., Yamakun, T., & Ohizum, Y. (2006). *Iridoids and Sesquiterpenoids with NGF-Potentiating Activity from the Rhizomes and Roots of Valeriana fauriei*. Recuperado el 27 de Noviembre de 2020, de <https://pdfs.semanticscholar.org/199f/2b48ae3d745778a8d741750c7fc29d58eaba.pdf>
- Herrera Omaira del Socorro, D. J. (2011). INMUNOHISTOQUÍMICA EN PATOLOGÍA DE MAMA. . *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 267-271.
- Honma T, S. N. (2019). *Las semillas de Centranthus ruber y Valeriana officinalis contienen ácidos linolénicos conjugados con efectos antitumorales reportados*. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31061266>
- Instituto Nacional de Cancerología-ESE. (2017). La investigación en cáncer. *Revista Colombiana de Cancerología*, 1-2.

- Instituto Nacional del cáncer. (2005). *¿Qué es el cáncer?* Obtenido de <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>
- Israel Korc, M. B. (1995). Radicales libres: Bioquímica y sistemas antioxidantes, Implicancia en la patología neonatal. *Rev Med Uruguay*, 11(2), 121-135.
- Jara, L. G., & Sanango, L. X. (2013). *Impacto del tratamiento quimioterapéutico en pacientes que asisten a la Unidad de Oncología del Hospital Vicente Corral Moscoso*. Recuperado el 2020 de Marzo de 28, de <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/4908/1/Tesis%20de%20P%20grado.pdf>
- Lic. Adonis E. Zorrilla García, L. M. (2004). Papel de los radicales libres sobre el ADN: carcinogénesis y terapia antioxidante. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 23(1).
- Lin S, C. T. (2015). *Tres productos de descomposición de valepotriatos de Valeriana jatamansi y su actividad citotóxica*. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25971678>
- Londoño Julian. (2010). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. *Grupo de Investigación en Ingeniería de Alimentos-GRIAL*, 130-162.
- Lucía, C., & Muñoz Maira. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova- Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 135-250.
- Malik Hamaidia, P.-Y. B. (2016). From Valeriana officinalis to cancer therapy: the success of a bio-sourced compound. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*(20), 314-320.
- Marcia Avellano, M. S. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenas*, 2, 161-172.
- Marta Coronado, S. V. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Chil. Nutr*, 42(2), 206-212.
- Martínez Gilberto. (2004). Terapia Hormonal de reemplazo y cáncer. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 40-59.
- Martínez Lucía. (2020). *Glutación: superhéroe de los antioxidantes*. Obtenido de https://www.cuerpomenta.com/alimentacion/nutricion/glutacion-eficacia-antioxidantes_4251
- Mavillar Del Fresno, Á., & Carretero Accme, E. (2001). *Valeriana officinalis. Fitoquímica, farmacología y terapéutica* (Vol. 15). ELSEVIER. Recuperado el 31 de 10 de 2020, de <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-articulo-valeriana-officinalis-fitoquimica-farmacologia-terapeutica-13019927>

- Médica, S. E. (2020). *Cáncer de mama*. Obtenido de <https://seom.org/info-sobre-el-cancer/cancer-de-mama?showall=1>
- Ministerio de Salud, P. (2020). *Cifras de Ecuador – Cáncer de Mama*. Obtenido de <https://www.salud.gob.ec/cifras-de-ecuador-cancer-de-mama/>
- Missouri Botanical Garden. (2017). *Valeriana microphylla*. Obtenido de <http://www.mobot.org/mobot/ParamoCajas/results.aspx?taxname=Valeriana%20microphylla>
- National Cancer Institute (NIH). (2016). La radioterapia y usted: apoyo para personas con cáncer. Estados Unidos: NCI.
- National Cancer Institute. (2016). Obtenido de Lasers in Cancer Treatment: www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Therapy/lasers
- National Cancer Institute. (2016). *Cryosurgery in Cancer Treatment: Questions and Answers*. Obtenido de www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Therapy/cryosurgery
- NIH National Cancer Institute. (2019). La quimioterapia y usted. Estados Unidos.
- Noemi, C., & Pedraza José. (2006). Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *BIOMEDICINA*, 164-173.
- Octavio Maldonado Saavedra, E. N. (2010). Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. *Rev Med UV: Artículo de Revisión*(6), 32-39.
- OPS. (2020). *Programa de Cáncer*. Obtenido de https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=292:cancer-program&Itemid=3904&lang=es
- Pietta, P.-G. (2000). *Flavonoides como antioxidantes*. doi:10.1021 / np9904509
- Policastro Lucía Laura. (2002). Participación de las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno a la transformación celular y en la modulación de la radiosensibilidad. *Universidad de Buenos Aires*, 29-31.
- Porrás, A., & López, A. (2009). *Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos*. México. Recuperado el 31 de 10 de 2020, de [https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Porrás-Loaiza-et-al-2009.pdf](https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Porrás-Loaiza-et-al-2009.pdf)
- Ramírez, R. L. (2007). ¿Son seguros y efectivos los antioxidantes? *Scientia et Technica Año XIII*(33), 41-44.
- Reguillo Muñoz María del Carmen. (2018). Métodos analíticos para la determinación de antioxidantes en muestras biológicas. *Universidad Complutense: Facultad de Farmacia*, 9-11.
- Ríos Gómez, Y. (2015). *Química y Farmacología de Iridodes* (1 ed.). (A. R. Guillermo Delgado, Ed.) Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México.

Recuperado el 31 de 10 de 2020, de https://www.researchgate.net/publication/305437256_Quimica_y_Farmacologia_de_Iridoides

- Rodríguez Rodríguez Patricia. (2009). "FORMACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO POR INTERFANCIA EN LA EXPRESION DE LA GLUTAMATO-CISTEINA LIGASA. *Universidad de Buenos Aires: Biblioteca Digital* , 10-21.
- Rojas Manzanares María Caridad. (2002). Balance entre los antioxidantes exógenos y endógenos y la peroxidación lipídica enzimática en el hígado y el corazón de cobayas intactos o tratados con Aminotriazol o LPS. *Universidad Complutense de Madrid:Facultad de Ciencias Biológicas*, 44-56.
- Rotellar, J., López, M. A., & P. Foro Arnalot. (2002). Atención a los efectos secundarios de la radioterapia. *MEDIFAM*, 426-435.
- Sakshima Thusoo, S. G. (2014). *Actividad antioxidante del aceite esencial y extractos de raíces de Valeriana jatamansi*. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3997129/>
- Salinas, C. A. (2011). Cáncer de Mama. En *Oncología* (págs. 80,81). México: Tlalpan C.P.
- Sánchez, C. (2013). *Knowing and understanding the cancer cell: Physiopathology of cancer* (Vol. 24). Recuperado el 23 de Noviembre de 2020, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S071686401370659X>
- Sánchez-Moreno , F., Calixto , S., & Larrauri, J. (1999). *Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents*. doi:[https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(99\)00097-6](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(99)00097-6)
- Silvina French, J. I. (2018). *Preparación para el abordaje del cáncer en America Latina: Construyendo sobre los avances recientes*. (ROCHE) Recuperado el 28 de Marzo de 2020, de https://www.dialogoroche.com/content/dam/Argentina/Documentos/WOC2019/PREPARACION_PARA_ABORDAJE_CANCER_AMERICA_LATINA.pdf
- Sociedad Americana contra el Cáncer. (2019). *Cirugia como tratamiento contra el Cáncer*. Obtenido de <https://www.infocancer.org.mx/?c=tratamiento&a=cirugia-tratamiento-contracancer>
- Society, A. C. (2019). *Tipos de cancer*. Obtenido de <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/compreension-de-un-diagnostico-de-cancer-de-seno/tipos-de-cancer-de-seno.html>
- Soto, L. D. (2002). Daño oxidativo, raicales libres y antioixdates . *Revista Cubana Med Milit* , 2(31), 126-133.

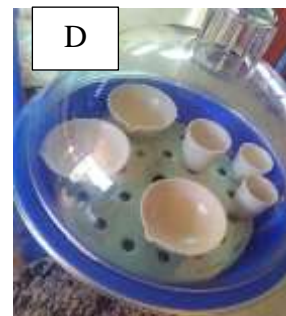
- Troisi, J., Di Fiore, R., & Pulvento, C. (2014). *Saponinas*. doi:10.13140/2.1.1568.5129
- Trujillo Hernandez Cristina. (2019). Estudio de la actividad antioxidante en hierbas y frutos. *Facultad de Ciencias: Departamento de Ciencias Analíticas*, 9-19.
- Velasco, J. P. (2019). *¿Qué es el cancer?* Obtenido de Sociedad Española de Oncología Médica: <https://seom.org/informacion-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer-y-como-se-desarrolla>
- Verónica Pérez, R. H. (2019). *Ecuador: promover la prevencion del cáncer de mama*. Obtenido de <https://www.edicionmedica.ec/secciones/salud-publica/en-ecuador-aun-falta-promover-la-prevencion-del-cancer-de-mama--94883>
- Vicente Sanchez, N. M. (2013). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Revista de Investigación del Sur de Mexico*, 3(20), 161-168.
- Vilaplana Montse. (2007). Antioxidantes presentes en los alimentos. Vitaminas, minerales y suplementos. *Elsevier*, 79-86.
- Wang F, Z. Y. (2017). *Estudios de las relaciones estructura-actividad antioxidante y mecanismo de actividad antioxidante de los valepotriatos iridoides y sus productos de degradación*. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29232391>
- Wang, Y., Jin, L., Yu, S., Shi, Q., Gu, Y., & Kiyota, H. (2010). *Chemical Constituents of Plants from the Genus Valeriana*. Recuperado el 27 de Noviembre de 2020, de <file:///C:/Users/Erover8%20PC/Downloads/perris%20tesis/copocision%20quimica.pdf>
- Yumei Zhang, F. W. (2017). *Estudios de las relaciones estructura-actividad antioxidante y mecanismo de actividad antioxidante de los valepotriatos iridoides y sus productos de degradación*. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5726618/>
- Zamora Pilar. (2020). *Hormonoterapia o tratamiento hormonal*. *Sociedad Española de Oología Médica*.
- Zhu, Z. S. (2019). *F3, una nueva fracción activa de Valeriana jatamansi Jones induce la muerte celular a través del daño del ADN en células de cáncer de mama humano*. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0944711318306378?via%3Dihub>

ANEXOS

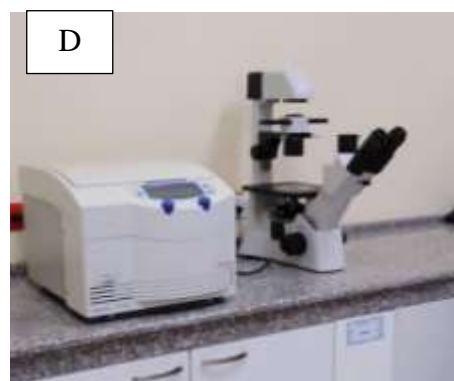
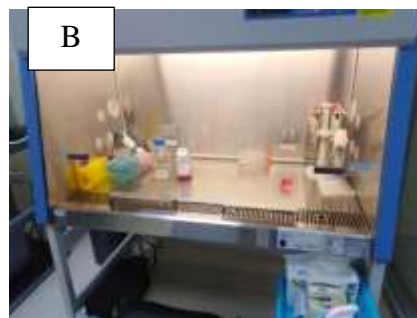
Anexo 1. Fotografías de las Hojas/Tallos y Raíces en el proceso de molienda antes (A, B) y después (C, D) de la *Valeriana microphylla* y *Valeriana plantaginea*



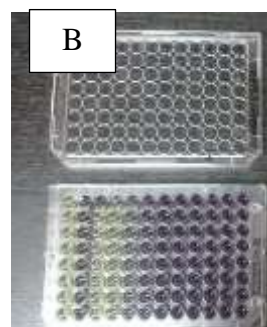
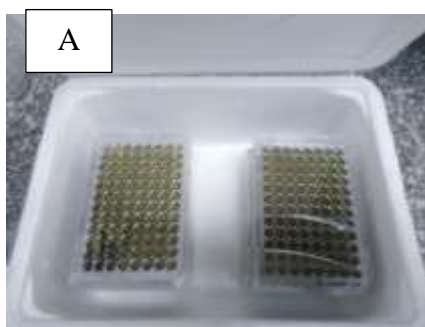
Anexo 2. Fotografías de la preparación del extracto acuoso para el cultivo celular: preparación de extracto (A), filtración (B), evaporación del solvente y determinación de sólidos totales (C), polvo compacto del extracto (D).



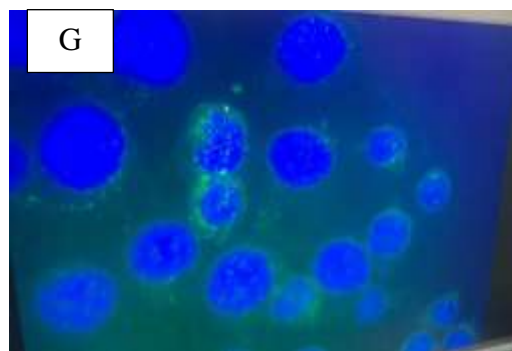
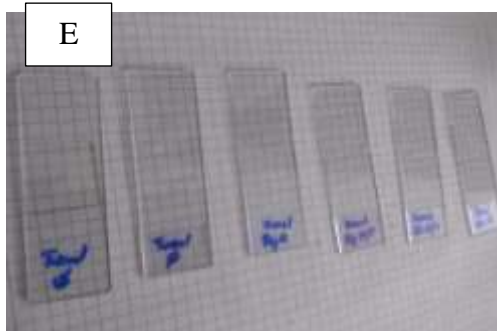
Anexos 3. Fotografías de cultivo celular MCF7: preparación de los reactivos en el Baño María (A), cultivo celular (B), incubación (C), verificación de células viables en el microscopio (D)



Anexo 4. Fotografías de la actividad citotóxica. En placas de 96 pocillos se realizó diluciones seriadas para cada tratamiento.



Anexo 5. Fotografías de las pruebas inmunohistoquímicas en placas de 6 pocillos, para cada tratamiento con su respectiva determinación. Cultivo de células y Aplicación de tratamiento (A); lavado y empleo de reactivos CellROS, MITOSOX, Glutation (B); permeabilizar las placas (C, D, E); Lectura de las placas (F, G)



Anexo 6. Análisis estadístico

Tabla 2. Anova de Capacidad citotóxica: Análisis estadístico entre la media y desviación estándar de los diferentes tratamientos.

	Media	Desviación estándar
<i>Valeriana microphylla</i> Hojas/Tallos	10,8553916	5,59737169
<i>Valeriana microphylla</i> Raíz	15,1530144	2,73080416
<i>Valeriana plantaginea</i> Hojas/Tallos	16,8944563	4,64178781
<i>Valeriana plantaginea</i> Raíz	4,4238542	3,18514626

Tabla 3. Anova Griess: Análisis estadístico entre la media y desviación estándar de los diferentes tratamientos.

	CONTROL	<i>Valeriana microphylla</i> Hojas/Tallos	<i>Valeriana microphylla</i> Raíz	<i>Valeriana plantaginea</i> Hojas/Tallos	<i>Valeriana plantaginea</i> Raíz
Media	175,5608	242,7323	202,009	247,9905	127,457
Desviación estándar	36,775	108,46	60,102	105,08	22,002

Tabla 4. Anova Trolox: análisis estadístico de los tratamientos entre la media y la desviación estándar.

	CONTROL	<i>Valeriana microphylla</i> Hojas/Tallos	<i>Valeriana microphylla</i> Raíz	<i>Valeriana plantaginea</i> Hojas/Tallos	<i>Valeriana plantaginea</i> Raíz
Media	0,1275	0,14133	0,231	0,1596	0,1835
Desviación estándar	0,1202	0,02823	0,1176	0,003	0,01033