



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



Actividad antioxidante y citotóxica *in vitro* de *Valeriana decussata* y *Valeriana rígida* en células cancerígenas

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

El trabajo de titulación forma parte de los proyectos de investigación: “Caracterización morfológica molecular fitoquímica y métodos de propagación en especies silvestres del género valeriana de la provincia de Tungurahua” aprobado con la resolución: 1569-CU-P-2017, dirigido por el PhD. Homero Vargas y “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 PhD. Yenddy Carrero Castillo

Autor: Danny Alexander Guacales Reinosa

Tutor: PhD. Yenddy Nayghit Carrero Castillo

Co-Tutor: PhD. Homero Vargas López

**Ambato - Ecuador
Marzo 2021**

APROBACIÓN DEL TUTOR

Dra. Yenddy Nayghit Carrero Castillo, PhD.

Dr. José Homero Vargas López, PhD.

CERTIFICA

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizamos la presentación de este Trabajo de Titulación bajo la modalidad de 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 de Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 10 de febrero de 2021

Dra. Yenddy Carrero Castillo, PhD.

C.I. 180197804-8

TUTORA

Dr. Homero Vargas López, PhD.

C.I. 175740457-7

COTUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Guacales Reinoso Danny Alexander, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación la modalidad de Proyectos de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniero Bioquímico, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Danny Alexander Guacales Reinoso

C.I. 040178637-1

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad proyecto de investigación el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

Ing. M.Sc. Liliana Patricia Acurio Arcos

C.I. 180406708-8

Presidente del Tribunal

PhD. Núñez Villacís Lorena de los Ángeles

C.I. 180425690-5

PhD. López Hernández Orestes Darío

C.I. 175478486-4

Ambato, 09 de febrero 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 líneas 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 mis derechos de autora.



Danny Alexander Guacales Reinoso

C.I. 040178637-1

AUTOR

DEDICATORIA

*Dedicada primero a Dios por su grandeza,
a mi madre Nelly, a mi padre Armando y a mis
hermanos Natali, Alexandra y Cristian por su
apoyo incondicional.*

*Y a todas las personas que me acompañaron
en este camino.*

AGRADECIMIENTOS

La satisfacción radica en el esfuerzo, no en el logro. El esfuerzo total es una victoria completa (Mahatma Gandhi). Agradecido primero con Dios por haberme permitido tomar las decisiones acertadas y darme la fuerza de perseverancia día a día para culminar esta etapa.

A mis padres Armando Guacales y Nelly Reinoso por inculcar en mí todas las enseñanzas, los valores y la determinación para no rendirme jamás y siempre seguir adelante, los amo infinito.

Dedicado también a mis hermanas Natali y Alexandra, mi hermano Cristian y a mis sobrinitos Mateo y Samuel, con quienes he compartido buenos y malos momentos, pero siempre apoyándonos y haciendo más alegre nuestras vidas, les agradezco de todo corazón, también a Karen por su apoyo y su preocupación que supo brindarme en cada momento. Gracias a todos por demostrarme siempre su amor.

A la Dra. Yenddy Carrero por ser una excelente tutora y persona, por transmitirnos el amor hacia la ciencia y compartirnos sus conocimientos y experiencias, también por la paciencia y dedicación que nos supo brindar en todo este proceso, muchas gracias por nunca dejarnos solos y hacer posible este trabajo.

Al Dr. Homero Vargas por hacerme partícipe de este proyecto y brindarme el apoyo en este proceso.

Agradezco a mis amigos por estar cuando los necesitaba y darme palabras de aliento en los momentos difíciles y sus sonrisas en los momentos de alegrías.

A la Universidad Técnica de Ambato y los docentes de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología quienes han aportado con invaluable conocimientos y han permitido formarme profesionalmente.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	iv
DERECHOS DE AUTOR	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ABSTRACT	xiii
CAPÍTULO I	14
MARCO TEÓRICO	14
1.1 Antecedentes Investigativos	14
1.1.1 El cáncer en el mundo	14
1.1.2 Situación Epidemiológica en Ecuador	14
1.1.3 Carcinogénesis	15
1.1.4 Rol del factor de hipoxia en la carcinogénesis	15
1.1.5 Factores de riesgo	16
1.1.6 Radicales libres (RL)	17
1.1.7 Radicales libres y el cáncer	19
1.1.8 Fisiopatología del cáncer de mama	20
1.1.9 Eventuales tratamientos para el cáncer	21
1.1.10 Sistema de antioxidantes	22
1.1.11 Fitoterapia	23
1.1.12 Valeriana	24
1.1.13 <i>Valeriana decussata</i> y <i>Valeriana rígida</i>	26
1.2 OBJETIVOS	28
1.2.1 Objetivo general	28
1.2.2 Objetivos específicos	28
1.3 Hipótesis	28
1.3.1 Actividad antioxidante	28
1.3.2 Efecto citotóxico	28
Hipótesis nula	28
Hipótesis alternativa	28
1.4 Señalamiento de variables de la hipótesis	28

1.4.1	Variable independiente	28
1.4.2	Variable dependiente	29
	CAPÍTULO II	30
	METODOLOGÍA	30
2.1	MATERIALES	30
2.1.1	Materia Prima	30
2.1.1.1	Tipo de Línea Celular	30
2.1.2	Materiales	30
2.1.3	Equipos	31
2.1.4	Reactivos	32
2.2	MÉTODOS	33
2.2.1	Tipo de Investigación	33
2.2.2	Financiamiento	33
2.2.2	Recolección de Especímenes	33
2.2.2	Pulverización de las muestras	34
2.2.3	Cuantificación de sólidos	34
2.2.4	Preparación del extracto acuoso para el cultivo celular	35
2.2.5	Cuantificación de Proteínas	35
2.2.6	Cultivo celular	35
2.2.6.1	Descongelación Celular	35
2.2.6.2	Cultivo Celular de la línea MCF-7	36
2.2.6.3	Pases Celulares	36
2.2.6.4	Conteo Celular	37
2.2.7	Ensayos MTT (Citotoxicidad)	38
2.2.8	Inmunocitoquímica	38
2.2.9	Determinación de la Capacidad Antioxidante	40
2.2.10	Técnica de TROLOX (Actividad Antioxidante)	40
2.2.11	Técnica GRIESS (Óxido Nítrico)	41
2.2.12	Cuantificación de Óxido Nítrico	42
2.2.13	Análisis estadístico	43
	CAPÍTULO III	44
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
3.1	Análisis y discusión de resultados	44
3.1.1	Análisis fisicoquímico	44
3.1.1.1	Determinación de sólidos totales (ST) a partir de extractos de <i>Valeriana rígida</i> y <i>Valeriana decussata</i> .	44

3.1.2	Actividad citotóxica	45
3.1.3	Inmunocitoquímica	51
3.1.3.1	Factor inductor de hipoxia	51
3.1.4	Actividad antioxidante	53
3.1.4.1	Capacidad antioxidante equivalente TROLOX (TEAC)	53
3.1.4.2	Método de Griess	55
4.1	VERIFICACIÓN DE HIPÓTESIS	56
4.1.1	Actividad antioxidante	56
4.1.2	Efecto citotóxico	57
	Hipótesis alternativa	57
	Hipótesis nula	57
	CAPÍTULO IV	58
	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	58
4.1	Conclusiones	58
4.2	Recomendaciones	58
	BIBLIOGRAFÍA	59
	ANEXOS	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Descripción taxonómica de <i>Valeriana decussata</i> y <i>Valeriana rígida</i>	26
Tabla 2 Concentraciones para la curva estándar	40
Tabla 3 Concentración de sólidos totales extraídos de los diferentes extractos.....	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Características de masa tumoral hipóxica	16
Fig. 2 Producción de ROS mitocondrial	18
Fig. 3 Interacción entre los diversos niveles de ROS en células cancerígenas.....	19
Fig. 4 Principio de cuantificación de nitrito usando la reacción de Griess.....	20
Fig. 5 <i>Valeriana decussata</i> - HOJAS/TALLOS	27
Fig. 6 <i>Valeriana decussata</i> - RAÍZ.....	27
Fig. 7 <i>Valeriana rígida</i> - HOJAS/TALLOS	27
Fig. 8 <i>Valeriana rígida</i> - RAÍZ.....	27
Fig. 9 Ensayo de citotoxicidad del extracto de <i>Valeriana decussata</i> raíz (VD-R) sobre células MCF-7	46
Fig. 10 Ensayo de citotoxicidad del extracto de <i>Valeriana decussata</i> Hojas y Tallos (VD-H/T) sobre células MCF-7	47
Fig. 11 Ensayo de citotoxicidad del extracto de <i>Valeriana rígida</i> raíz (VR-R) sobre células MCF-7	48
Fig. 12 Ensayo de citotoxicidad del extracto de <i>Valeriana rígida</i> hojas y tallos (VR-H/T) sobre células MCF-7	49
Fig. 13 Expresión del factor inductor de hipoxia en células MCF-7 tratadas y control	51
Fig. 14 Expresión de HIF en células MCF-7 magnificación 630X. Las células con expresión de HIF fueron teñidas con Image-iT. y leído con el filtro Texa red (595-615 nm) mediante el software LasX de Leica. Control (A,B,C) y <i>Valeriana rígida</i> raíz (D, E).....	52
Fig. 15 Expresión de HIF en células MCF-7 magnificación 630X. Las células con expresión de HIF fueron teñidas con Image-iT. y leído con el filtro Texa red (595-615 nm) mediante el software LasX de Leica. <i>Valeriana rígida</i> Hoja/Tallos (A, B) y <i>Valeriana decusata</i> raíz (C, D)	53
Fig. 16 Gráfica de la actividad antioxidante mediante el método de Trolox para la determinación de las unidades Trolox.....	53
Fig. 17 Diagrama de actividad antioxidante mediante el método de Griess para la determinación de la concentración de NO (uM).	55

RESUMEN

El cáncer representa un problema de salud a nivel mundial, dejando consigo elevadas tasas de decesos que continúan en aumento, los tratamientos empleados para contrarrestar la enfermedad tienen altos costos y están perdiendo su eficacia debido a que las células cancerosas se hacen cada vez más resistentes; de allí la importancia de buscar nuevas alternativas terapéuticas, a fin de restablecer un nuevo panorama en pro de la búsqueda de fitocompuestos extraídos de plantas, como las especies de valeriana, caracterizadas por su composición de terpenos, ácido valérico, valtratos y aceites esenciales con diversas propiedades antiinflamatorias, anticonvulsivantes y antitumorales. El objetivo de la presente investigación fue la determinación de la actividad antioxidante y citotóxica *in vitro* de extractos obtenidos de *Valeriana decussata* y *Valeriana rígida* en la línea celular de cáncer de mama (MCF-7). Se realizaron estudios de viabilidad celular por el método MTT, ensayos de inmunohistoquímica, determinación de óxido nítrico mediante el método de Griess y la actividad antioxidante con el ensayo TROLOX. Se evidenció la presencia de antioxidantes y compuestos con actividad biológica que actuaron de manera beneficiosa sobre el tipo de línea celular MCF-7.

Palabras Clave: Actividad antioxidante, extractos vegetales, *Valeriana decussata*, *Valeriana rígida*, alternativas terapéuticas, células MCF-7

ABSTRACT

Cancer represents a health problem worldwide, leaving with its high death rates that continue to rise. The treatments used to counteract the disease have high costs and are losing their effectiveness as cancer cells become increasingly resistant; hence the importance of looking for new therapeutic alternatives, in order to reestablish a new panorama in favor of the search for new phytochemicals extracted from plants, such as valerian species, characterized by its composition of terpenes, valeric acid, valtrates and essential oils with various anti-inflammatory, anticonvulsant and anti-tumor properties. The objective of the present investigation was the determination of the antioxidant and cytotoxic activity in vitro of extracts obtained from *Valerian decussata* and *Valerian rigid* in the breast cancer cell line (MCF-7). For this, cell viability studies were carried out using the MTT method, immunohistochemical tests, nitric oxide determination using the Griess method and the antioxidant activity with the TROLOX test. The presence of antioxidants and compounds with biological activity that acted were evidenced. beneficially over the MCF-7 cell line type.

Keywords: Antioxidant activity, plant extracts, *Valeriana decussata*, *rigid Valerian*, therapeutic alternatives, MCF-7 cells

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes Investigativos

1.1.1 El cáncer en el mundo

Una de las enfermedades más antiguas que ha afectado a la humanidad es el cáncer, esta patología es la causante de un gran número de defunciones en pacientes alrededor del mundo. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2018 sólo en América se le atribuyeron de 1,3 millones decesos y 3,7 millones de casos nuevos con una estimación de crecimiento del 32%, destacando una proyección de 5 millones de nuevos casos en el año 2030 debido al envejecimiento de la población y la transición epidemiológica en América Latina y el Caribe (OMS, 2018).

1.1.2 Situación Epidemiológica en Ecuador

Dentro del perfil epidemiológico que la OMS realiza a cada país, en Ecuador se reportaron aproximadamente 28.058 casos de cáncer en el año 2018, con un total de 14.559 defunciones; dichas bajas se han relacionado con diferentes factores implicados en la génesis del cáncer, dentro de ellos el 41,1% corresponde a la radiación UV, 21,2% conciernen a infecciones y un 9,9% se atribuye al consumo de tabaco, el resto de porcentaje se engloba en la obesidad, alcohol, antecedentes familiares y el riesgo ocupacional (OPS/OMS, 2020). Según la International Agency for Reserch on Cancer (IARC), el cáncer que más afecta en hombres es el cáncer de próstata en dónde de cada 100.000 habitantes se reportan 39 casos; y en las mujeres el cáncer predominante es el de mama en dónde por cada 100.000 habitantes se reportan alrededor de 32 casos (International Agency for Research on Cancer, 2018).

En el Ecuador las tendencias pasadas referente al cáncer de mama indicaron que en el 2018 se registraron un total de 2.787 casos, y se ha establecido en proyecciones futuras que para el año 2040 existirían 4.804 casos nuevos; casi un 58% más de casos de cáncer de mama, por lo que es considerada como una de las enfermedades que más atemoriza a las mujeres y una minoría de hombres de contraer dicha afección (Cayon, 2020).

1.1.3 Carcinogénesis

El cáncer inicia en una célula, por lo que se adjudica que tiene su génesis de manera monoclonal, dicha célula no sigue los sistemas de control celular, convirtiendo a células vecinales normales en células anormales con errores a lo largo del proceso de división, induciendo la neoplasia; dañando a tejidos u órganos que existen a su alrededor.

Las células cancerosas generan diversas alteraciones en el ADN, estas modificaciones pueden generar el aumento de la glucólisis, modificar un oncogén que interviene en el metabolismo o en su defecto puede activar la respuesta a la hipoxia y al HIF1- α , además en éste tipo de células, los supresores de tumores que interrumpen el desarrollo de células anormales se inhabilitan como es el caso de p53 que al desactivarse provocando el efecto Warburg el cual obliga a las células a ser dependientes de la glucólisis, desencadenando a que se produzca ATP parcialmente, empleando una cierta porción de azúcares para formar únicamente 2 moléculas de ATP , donde generalmente se producen 36 ATP en células sanas, por lo que las células anormales necesitan más azúcares para generar la energía necesaria para sobrevivir, ocasionando un desequilibrio energético (**Winship Cancer Institute, 2020**).

Warburg en 1931 descubrió que las células cancerosas no completan el proceso de respiración debido a las diversas mutaciones que sufre el ADN, lo que resulta beneficioso para las células cancerosas debido a que los intermediarios obtenidos en la glucólisis como la glucosa 6-fosfato que sirve para la síntesis de glucógeno y ribosa 5-fosfato, dihidroxiacetona fosfato para la síntesis de triacilglicéridos y fosfolípidos. La isoforma embrionaria de piruvato quinasa (PK), que desfosforila el fosfoenolpiruvato (PEP) en piruvato (**Kroemer & Pouyssegur, 2008**) , se expresa en gran medida en los tumores pero está ausente en los tejidos adultos, excepto en los adipocitos, son usados por las células cancerosas para sobrevivir y aumentar en masa, conllevando a que las células anormales sobrevivan y no puedan ser identificadas por el sistema inmunológico para ser destruidas (**Klaunig, 2020**).

1.1.4 Rol del factor de hipoxia en la carcinogénesis

El crecimiento de un tumor depende de una red vascular que abastezca de oxígeno y nutrientes a las células tumorales, pero la masa tumoral crece más rápido que la masa

vascular por lo que se produce un ambiente avascular deficiente de oxígeno es decir hipóxico. Un microambiente hipóxico enmarca un rol crítico en el desarrollo y aumento de los tumores; los tumores de mama alojan zonas de hipoxia en el que las células que se encuentran lejos de un vaso sanguíneo funcional tienen concentraciones de oxígeno significativamente reducida en comparación al tejido mamario normal, las células de cáncer de mama se adaptan a las condiciones hipóxicas aumentando los niveles de factores inducibles por hipoxia (HIF) que induce la expresión de múltiples genes implicados en la angiogénesis, la resistencia al estrés oxidativo y la metástasis, los pacientes con cáncer de mama con niveles aumentados de expresión HIF en biopsias de tumores primarios son más susceptibles a un mayor riesgo de metástasis (Gilkes & Semenza, 2013).

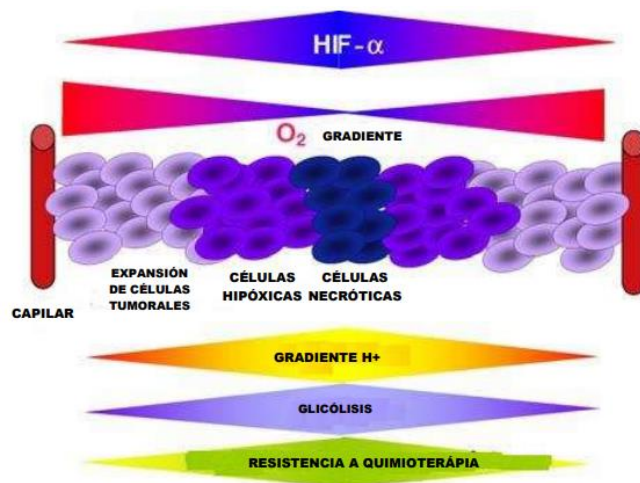


Fig. 1 Características de masa tumoral hipóxica

Fuente: (Brahimi-Horn et al., 2007); *modificado por Guacales, 2020*

1.1.5 Factores de riesgo

Existen ciertos factores de riesgo que están implicados con el desarrollo del cáncer, se estima que cerca del 40% de todos los tipos de cáncer se podrían prevenir evitando ciertas conductas y factores que están implícitos como el consumo de ciertas drogas (tabaco y alcohol), un estilo de vida sedentario, una dieta desequilibrada y la escasa inactividad física son factores claves que contribuyen a la aparición de sustancias pre-oxidantes (Cayon, 2020).

A nivel fisiológico existen otros factores que están relacionados estrechamente con el daño celular como es el caso de los radicales libres (RL), que intervienen en la génesis

de ciertas enfermedades como el cáncer , lo cual ha sido ampliamente avalado por diversos estudios (**Jomova y Valko, 2011**), se ha descrito que a pesar de tener varias funciones celulares específicas logran tornarse tóxicas para las células, afectando a otras estructuras celulares vecinas que mantienen contacto con ellas; tal es el caso de la molécula del oxígeno, que es muy estable en su entorno pero después de participar en las funciones del metabolismo celular puede transformarse en diversas especies reactivas al estímulo inflamatorio, la conducción, reclutamiento y activación de diversas células inmunológicas, incluyendo macrófagos, neutrófilos y células dendríticas que suministran la independencia y acumulación de RL derivados del oxígeno y del nitrógeno; especies que contribuyen a la señalización y regulación de la inflamación y el cáncer (**Carvajal, 2019**).

1.1.6 Radicales libres (RL)

Se puede definir a un radical libre a una molécula que tiene uno o varios electrones desapareados en su último orbital y tiene la capacidad de coexistir de manera independiente; el mismo hecho de contener un electrón extra lo convierte automáticamente inestable y con un grado muy alto de reactividad, por lo que busca electrones de otras moléculas para conseguir su estabilidad, de tal forma que al buscar estabilidad esa molécula, hace que otro átomo pierda la estabilidad y se transforme en un radical libre, desencadenando una serie de cascadas químicas afectando directamente a la célula.

Entre las especies más importantes encontramos a las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las especies reactivas de nitrógeno (RNS), estas moléculas se pueden producir de forma endógena o exógena. Dentro de las fuentes exógenas se pueden incluir la mitocondria, los peroxisomas zonas en las que el dispendio de oxígeno es excesivo (**Phaniendra et al., 2015**).

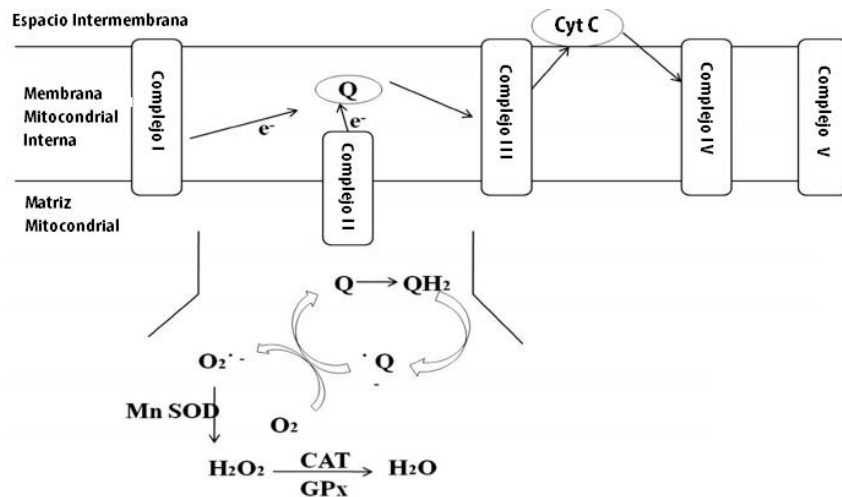


Fig. 2 Producción de ROS mitocondrial

Fuente: (Phaniendra et al., 2015); *modificado por Guacales, 2020*

Los radicales libres de oxígeno (ROS) son producidos en el metabolismo celular en células vivas. Se ha estimado que una persona promedio tiene cerca de 15.000 radicales libres dañinos diariamente en cada célula, en atletas esta cantidad puede aumentar hasta un 50% más; la producción de ROS se genera para responder a funciones biológicas, pero en sí, es el resultado de la vía aerobia. Todos los ROS tienen la capacidad de interactuar con varias moléculas celulares como el ADN generando roturas de cadena, bases. Además estas especies pueden interactuar con proteínas y lípidos, oxidando y produciendo intermediarios que reaccionan con el ADN (**Dreher & Junod, 1996**).

Se ha provisto que una célula humana está expuesta alrededor de 10^5 ataques por RL, entre los cuales encontramos a los radicales hidroxilo y peróxidos. Las constantes alteraciones a las que está expuesto el material genético por el estrés oxidativo abarca el paso inicial de la carcinogénesis involucrada en la mutagénesis. Los efectos epigenéticos sobre la expresión génica pueden conducir a la estimulación de señales de proliferación y crecimiento tumoral. Se ha demostrado que las ROS estimulan las rutas de poli-ADP-ribosilación y proteína quinasa afectando de tal manera las rutas de transducción de señales conducen a que se module la expresión de genes presentes en la promoción y proliferación de tumores (**Ríos-Arrabal et al., 2013**).

El mecanismo químico de Fenton es una de las reacciones involucradas en el daño de ADN, a través de la generación de radicales libres, conociendo como el radical hidroxilo interactúa de manera directa y rápida con los componentes del ADN como

las bases pirimidinas y purinas, produciendo radicales de azúcar centrados en carbono y el radical de alilo de timina que se forma a partir de reacciones de abstracción, los radicales de peróxido se generan cuando se encuentran en un ambiente abundante de oxígeno con la adicción de oxígeno a los radicales aductos de OH (Ríos-Arrabal et al., 2013).

1.1.7 Radicales libres y el cáncer

El aumento de niveles de ROS intracelular al activar las vías de señalización en las células cancerosas, induce que estas células sean más susceptibles que las normales a la muerte celular, en contraste; éstas células dependen mucho más de los sistemas antioxidantes generando una base bioquímica para la planificación de estrategias terapéuticas para la muerte selectiva de células cancerosas; de tal manera que es importante conocer las vías particulares que se ven afectadas por la acción de ROS (Benedetti et al., 2015)

Excesivos niveles de ROS pueden suprimir la actividad antioxidante de la célula y establecer, el punto de partida hacia la muerte celular, en caso opuesto cuando se encuentra una aglomeración de ROS, las células se tornan más sensibles que las normales; siendo afectadas por una gran variedad de inductores de ROS como la hipoxia, defectos metabólicos y oncogenes.

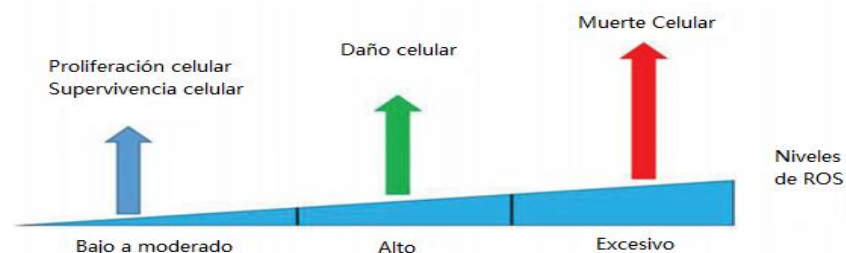


Fig. 3 Interacción entre los diversos niveles de ROS en células cancerígenas

Fuente: (Pourahmad et al., 2016); modificado por Guacales, 2020

A pesar de discernir el papel de los radicales libres en la carcinogénesis, existe controversia al afirmar que los tumores malignos suscitan un estrés oxidativo *in vivo*, varios estudios revelaron la asociación de la reducción de las actividades de las enzimas antioxidantes con el aumento de las enzimas del ADN en el tejido del cáncer de mama, por lo que sugiere que las reacciones de los radicales libres pueden aumentar

en las células malignas *in vivo*, infiriendo que el estrés oxidativo es persistente en diversos cánceres y explica la acción en la activación de los protooncogenes, la inestabilidad genómica la resistencia a la quimioterapia y la metástasis (Hristozov et al., 2001).

Uno de los radicales libres predeterminantes es el óxido nítrico (NO) que es un mediador molecular de diversos procesos fisiológicos como la vasodilatación, inflamación, trombosis, la inmunidad y la neurotransmisión incluyendo varias isoformas que se han encontrado que intervienen en la estimulación o inhibición del cáncer; al parecer estos radicales pueden ser citostáticos o citotóxicos para las células tumorales mientras que la actividad de nivel bajo suele tener una actividad contraria como el crecimiento tumoral. Se han descrito algunos métodos para la cuantificación de NO en diversos tejidos y fluidos biológicos, tal es el caso de la reacción de Griess que permite analizar nitrato por la reducción catalítica a nitrito; en donde el ácido sulfanílico se transforma cuantitativamente en una sal de diazonio por la reacción de nitrito en la solución ácido llevando el siguiente proceso:

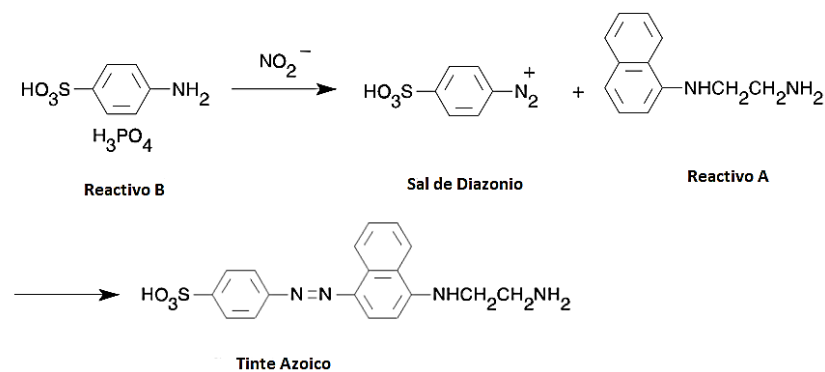


Fig. 4 Principio de cuantificación de nitrito usando la reacción de Griess

Fuente: (Molecular Probes, 2003); *modificado por Guacalés D. 2020*

1.1.8 Fisiopatología del cáncer de mama

La gran mayoría de los cánceres de mama surgen de células epiteliales de revestimiento de la unidad lobular del conducto terminal por debajo de un invasivo aspecto maligno que penetra en la membrana basal. Estos incluyen hiperplasia de tipo habitual, hiperplasia atípica, y carcinoma no invasivo (*in situ*) (Barber et al., 2008). El cáncer de mama se ha clasificado de acuerdo con su morfología y su histología, como son los ductales infiltrantes que alberga un 70% de los tumores de mama, y los

tumores lobulillares infiltrantes que representa un 10% de los casos que se han diagnosticado; en otro grupo existen los de tipo carcinomas tubulares, micropapilares, cribiformes que son menos frecuentes, pero constan de igual manera en la clasificación. A pesar de esto, estudios demuestran que la clasificación del cáncer de mama a nivel molecular es más amplia en donde se puede encontrar el cáncer de subtipo luminal, basal y HER2 que abarcan un punto de partida para el estudio de esta enfermedad (**Hergueta-Redondo et al., 2008**)

1.1.9 Eventuales tratamientos para el cáncer

Los diversos tratamientos convencionales como la quimioterapia son inicialmente efectivos para controlar en cierta medida el crecimiento tumoral, pero los pacientes recaen conforme pasa el tiempo, esto se debe a dos posibles razones, la primera es debido a que las células adquieren resistencia, disminuyendo su sensibilidad, por lo que la proporción relativa de células tumorales residuales son similares antes y después del tratamiento; y la segunda es debido a una subpoblación de células con potencial tumoral propiamente resistente a la terapia haciendo que la proporción relativa de células tumorales residuales aumenten después del tratamiento, lo cual influiría en el éxito o fracaso de las quimioterapias citotóxicas, que a pesar de destruir las células tumorales, la capacidad de células residuales con potencial tumorigénicas, se mantiene persistentes por lo que reaparece el crecimiento del tumor, justificando la necesidad de establecer la combinación de tratamientos que se enfoquen en ambas subpoblaciones para prevenir futuras recaídas o recidivas del tumor (**Li et al., 2008**)

En la actualidad existen múltiples tratamientos generalmente con fundamento químico y físico para el tratamiento del cáncer, los más comunes y usados actualmente son la quimioterapia, radioterapia, inmunoterapias, terapias hormonales, terapias dirigidas y cirugía (**American Cancer Society, 2016**), que conllevan a diversos efectos secundarios muy agresivos en el paciente que afectan su calidad de vida, aunado a una tasa muy baja de recuperación.

El reconocimiento de varias plantas medicinales con compuestos activos quimioterapéuticos están teniendo más acogida, y la investigación en esta línea ha progresado de manera considerable, este tipo de tratamiento denominado fitoterapia se enfoca en el refuerzo de la terapéutica convencional; encaminado a la protección a las células, induciendo la desintoxicación, reduciendo la alteración hormonal y

enzimática, coadyubando a disminuir los efectos secundarios que acarrear los tratamientos físicos, además ayuda a mejorar la función del sistema inmunitario en el organismo, estimulando la secreción de citocinas, interferón, factor de necrosis tumoral y otras moléculas que estimulan el ataque a células anormales (**Lopes et al., 2017**).

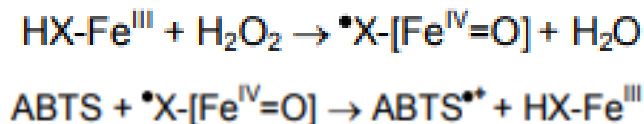
1.1.10 Sistema de antioxidantes

Un antioxidante es una molécula capaz de neutralizar diversas reacciones de los RL inhibiendo el daño que sufren las células por este tipo de ataques, se han determinado dos tipos de sistemas de antioxidantes, los antioxidantes enzimáticos como la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPX) y la catalasa (CAT) son los encargados de reducir los RL en el organismo como el hidroperóxido lipídico y el H₂O₂, previniendo la peroxidación lipídica y conservando la estructura y la funcionalidad de las membranas celulares (**Balasaheb Nimse & Pal, 2015**). Por otra parte, los antioxidantes no enzimáticos como el ácido ascórbico o vitamina C y el glutatión reducido son moléculas que no se encuentran directamente en el organismo, pero se pueden suplementar en la dieta por medio del consumo de frutas o verduras y su principal función es contrarrestar un radical libre por molécula, atacándola en grandes concentraciones como cazadores estequiométricos (**Montero, 1996**).

Los sistemas de los organismos vivos contienen una gran variedad y cantidad de antioxidantes, que bien pueden ser suplementados o ingeridos como fármacos, los cuales corresponden tanto a micro como macromoléculas que están presentes en los sistemas de prevención del estrés oxidativo; de tal manera que la cuantificación de la capacidad antioxidante acumulada en los diferentes tejidos, fluidos corporales y células sometidas a diversos estímulos proporcionan información valiosa en relación con la biología y los mecanismos de acción.

Uno de los principios para cuantificar estos antioxidantes es la formación del radical ferril mioglobina que a partir de la metamioglobina y el peróxido de hidrógeno oxidan al ABTS (2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolína-6-sulfónico) para producir un catión radical, ABTS^{•+}, un cromógeno soluble de color verde que se puede cuantificar espectrofotométricamente a 405 nm.

La siguiente ecuación representa su reacción:



En dónde:

$\text{HX-Fe}^{\text{III}}$ es la metamioglobina y $\bullet\text{X-}[\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}]$ es la ferril mioglobina

Los antioxidantes suprimen la producción del catión de una manera dependiente de la concentración y la intensidad del color disminuye proporcionalmente, el trolox es usado como un antioxidante control o estándar.

1.1.11 Fitoterapia

Las plantas medicinales han abarcado un amplio campo en el ámbito científico y se han definido como sustancias que pueden ser empleadas con fines terapéuticos o como precursores de nuevos fármacos, teniendo un alto impacto desde épocas antiguas, los beneficios de las plantas medicinales se han basado en conocimiento empírico para tratar diversas molestias y éste conocimiento ha ido avanzando conforme ha pasado el tiempo, con el desarrollo de nuevas técnicas y tecnología que ha facilitado la obtención de sustancias con actividad biológica de diversas plantas con amplios beneficios (**Vanini et al., 2011**).

Recientes estudios han reportado que varias especies como: *Cleome gynandra*, *Oplopanax horridus*, *Cydonia oblonga*, *Sisymbrium officinale Scop* *Momordica* contienen extractos con elevada actividad citotóxica que contribuyen a la inhibición del crecimiento tumoral, dando un gran realce a la etnobotánica y la etnofarmacología, optimizando la terapéutica actual. Un ejemplo de un compuesto recientemente descubierto es la prostatina la cual interactúa con el virus del VIH atenuando su acción, también otros compuestos como vincristina, paclitaxel y etopósidos que son compuestos con actividad biológica y considerados posibles terapéuticos frente al cáncer.

El amplio estudio de este tipo de compuestos y su gran demanda han surgido como consecuencia de la necesidad de buscar alternativas que proporcionen ventajas en cuanto al costo-beneficio. Es conocido que los tratamientos antineoplásicos son altamente costosos y escasos, además por el cambio y poca efectividad de estos medicamentos sintéticos han llevado a la desconfianza por parte de la población por

lo que los extractos de las plantas son una opción prometedora para futuros tratamientos (**Loraine et al., 2010**)

1.1.12 Valeriana

El término valeriana fue introducido en por el derivado del latín medieval con la palabra “*valere*” que significa “estar sano y fuerte”; es nativa de Europa y ciertos sectores de Asia, ha sido insertada en España.

Ecuador presenta alrededor de 35 especies dentro del género valeriana de las cuales siete se consideran endémicas, la mayor parte son pequeñas hierbas que crecen en los páramos andinos y otras pocas en los bosques, estas plantas han sido utilizadas en la medicina ancestral para tratar el insomnio y prolongar el sueño; las valerianas están constituidas de aceite esencial, sesquiterpenoides (ácido valerénico), ésteres epoxi iridoides (valepotriatos). La actividad farmacológica del ácido valerénico es espasmolítica y microrrelajante que conjuntamente a otros sesquiterpenos tiene un efecto sedante ligado a la inhibición del catabolismo del ácido γ -aminobutírico que es un importante inhibidor del sistema nervioso central; también se le atribuye actividad antifúngica, antibacteriana e insecticida (**Kutschker, 2011**).

El ácido valérico o ácido pentanoico es un ácido graso de cadena corta que debido a su constitución, consta de una cadena de hidrocarburo hidrófobo con un grupo de ácido carboxílico, por su origen poco hidrófoba de la cadena de alquilo, éste ácido es inmiscible en agua y se utiliza para disolver y mezclar diversos compuestos (**Cruz et al., 2005**).

En 1962 un grupo de científicos lograron analizar la actividad anticonvulsionante del ácido 2-propilpentanoico como solubilizante del metilen-ciano-norkhellina, concluyendo que éste ácido tiene propiedades anticonvulsionantes, validándolo como fármaco antiepiléptico, además el 2-propilpentanoico es usado como supresor de tumores teniendo gran eficacia en la terapéutica en contra del cáncer de colon, próstata y mama, de la misma manera varios ensayos clínicos evalúan combinaciones entre 2-propilpentanoico y otros agentes quimioterapéuticos como la doxorubicina en donde el 16% de los pacientes mostraron respuestas parciales y un 9% enfermedades estables, a pesar de que estos datos constituyen bajos porcentajes, son considerados alentadores

estableciendo una posible vía de investigación hacia el cáncer (**Fuchs-Tarlovsky et al., 2011**).

Los antioxidantes que se pueden encontrar en la actualidad son amplios y poseen una gran variedad de beneficios, entre los que se destacan los antioxidantes de origen vegetal, los cuales aportan al organismo de manera exógena suplementos para su equilibrio. Se han realizado estudios empleando diversos extractos de valerianas como semillas, raíces, extractos, aceites esenciales con efecto en la carcinogénesis como tratamiento preventivo (**Accame, 2001**). *Valeriana officinalis* y *Valeriana jatamansi* han sido el tipo de valeriana en donde más se han concretado los estudios de compuestos de actividad biológica como alternativa terapéutica ante un cierto tipo de enfermedades.

En 2013, Li y colaboradores realizaron un estudio del valtrato extraído de *Valeriana jatamansi* el cual demostró que este extracto tiene una potente y selectiva actividad anticancerígena *in vivo* e *in vitro* causada por apoptosis y progresión del ciclo celular con actividad en genes como p53, concluyendo que la modulación y la señalización de estos genes están involucrados en el mecanismo de acción anticancerosa (**Xiaoguang Li et al., 2013**).

De la misma manera Lin y col en el 2014 estudiaron diez valepotriatos, extraídos de *Valeriana jatamansi*, los cuales revelaron una potente actividad citotóxica y antitumoral contra líneas de cáncer humano, concluyendo que la exposición del valtrato modulaba la expresión de numerosas moléculas implicadas en la progresión del ciclo celular y apoptosis en contra del cáncer de próstata metastásico (**Lin et al., 2015**).

Un ensayo realizado con extractos de valeriana fue el descrito por Tian en 2018 en donde investigaron F3, que es una fracción de *Valeriana jatamansi* Jones el cuál mostró un efecto positivo en relación con el crecimiento celular en el cáncer de mama, determinando que el tipo de concentración al momento de inducir apoptosis era independiente, por lo que concluyeron que no tenía un efecto claro y preciso en la inducción de apoptosis en este tipo de línea celular MCF-10. El daño que presentaba el ADN en contraste a la ruptura de las hélices y la aceleración de activación de γ -H2AX, sugería que era consecuencia de la acumulación de especies reactivas de oxígeno (**Tian et al., 2020**).

Así mismo, se establecieron otros estudios de extractos, en donde se concluyó que los extractos de *Valeriana officinalis* actuaban como moduladores eficientes ante la peroxidación lipídica inducida por diversos agentes pro-oxidantes neurotóxicos, cumpliendo el rol de antioxidante y disminuyendo en gran medida las complicaciones producidas por estrés oxidativo (Sudati et al., 2009).

1.1.13 *Valeriana decussata* y *Valeriana rígida*

Los estudios de las especies *Valeriana decussata* Ruiz & Pavon y *Valeriana rígida* Ruiz & Pavon de la familia *Valerianaceae* son limitados, por lo cual sus efectos benéficos en relación con el cáncer no se conocen. Por esta razón el presente estudio busca determinar la capacidad tanto antioxidante como citotóxica de los extractos de estas especies de *Valeriana decussata* y *Valeriana rígida* frente a células cancerígenas e inferir un posible efecto terapéutico.

Tabla 1 Descripción taxonómica de *Valeriana decussata* y *Valeriana rígida*

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Dipsacales
Familia	<i>Caprifoliacear</i>
Género	Valeriana
Especie	<i>decussata</i> <i>rígida</i>

Fuente: (Ulloa & León, 2015)



Fig. 5 *Valeriana decussata*- HOJAS/TALLOS

Fotografía: Vargas H. (2019)



Fig. 6 *Valeriana decussata*- RAÍZ

Fotografía: Vargas H. (2019)



Fig. 7 *Valeriana rígida*- HOJAS/TALLOS

Fotografía: Vargas H. (2019)



Fig. 8 *Valeriana rígida*- RAÍZ

Fotografía: Vargas H. (2019)

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo general

Determinar la capacidad antioxidante *in vitro* de los extractos de *Valeriana decussata* y *Valeriana rígida* sobre células cancerígenas MFC-7.

1.2.2 Objetivos específicos

- Determinar la capacidad citotóxica de los extractos de *Valeriana decussata* y *Valeriana rígida* en células cancerígenas.
- Estimar la concentración de óxido nítrico y la capacidad antioxidante en cultivo de células MFC-7 tratadas con extractos de *Valeriana decussata* y *Valeriana rígida*.
- Evaluar la expresión del factor inductor de hipoxia en células cancerígenas tratadas con extractos de *Valeriana decussata* y *Valeriana rígida*.
- Correlacionar los resultados obtenidos y establecer un posible potencial antioxidante de los extractos de *Valeriana decussata* y *Valeriana rígida*.

1.3 Hipótesis

1.3.1 Actividad antioxidante

Hipótesis nula

Los extractos de *Valeriana decussata* y *Valeriana rígida* no poseen actividad antioxidante.

Hipótesis alternativa

Los extractos de *Valeriana decussata* y *Valeriana rígida* poseen actividad antioxidante.

1.3.2 Efecto citotóxico

Hipótesis nula

Los extractos de *Valeriana decussata* y *Valeriana rígida* no poseen efecto citotóxico.

Hipótesis alternativa

Los extractos de *Valeriana decussata* y *Valeriana rígida* poseen efecto citotóxico.

1.4 Señalamiento de variables de la hipótesis

1.4.1 Variable independiente

Extractos de *Valeriana decussata* y *Valeriana rígida*

1.4.2 Variable dependiente

Actividad antioxidante

Efecto citotóxico

CAPÍTULO 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 emplearon las hojas/tallos y raíces frescas de dos especies diferentes: *Valeriana decussata* y *Valeriana rígida*, que fueron recolectadas en el cerro Igualata-Quero.

2.1.1.1 Tipo de Línea Celular

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

2.1.2 Materiales

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

- 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.

2.1.3. Equipos

- Microscopio óptico
- Microscopio invertido de contraste
- Plancha de calentamiento
- Microscopio de fluorescencia Leica DMi8
- Balanza analítica
- Vórtex
- Baño maría con agitación
- Cámara de Humedad
- Incubadora con atmósfera de CO₂ 5%
- Cámara de flujo Laminar (Nivel II Bioseguridad)
- Lector de placas Victor X3
- Baño maría

2.1.4 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%
- Agua Estéril
- Reactivo Trypan Blue
- Tritón 100X
- Curva patrón de proteínas (albumina bovina)
- Reactivo Bradford
- Reactivo MTT
- SDS 10%
- Paraformaldehido 4%
- PBS Hank´s
- Tabletas ABTS
- Reactivo de Griess
- Sulfato de cobre
- Tampón de ensayo 10X
- HCL 0,01 M
- Reactivo de Mioglobina
- Buffer de fosfato-citrato
- Solución de parada
- Cloruro de amonio 40X
- Peróxido de hidrogeno 3%
- Solución estándar Trolox
- Solución estándar Griess
- Image-iT™ Green Hypoxia Reagent

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Tipo de Investigación

El tipo de investigación utilizada es experimental, y está orientada a determinar la capacidad antioxidante y citotóxica de *Valeriana rígida* y *Valeriana decussata* en la línea celular de cáncer de mama MCF-7. Se realizaron ensayos de citotoxicidad con los extractos de valeriana, así mismo, se evaluó el rol del factor inductor de hipoxia, con el objetivo de investigar posibles nuevos agentes con actividad biológica como terapéutica ante el cáncer y su respuesta ante los diferentes procesos biológicos.

2.2.2 Financiamiento

El trabajo de titulación es financiado por los proyectos 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 PhD. Yenddy Carrero Castillo
- “Caracterización morfológica molecular fitoquímica y métodos de propagación en especies silvestres del género valeriana de la provincia de Tungurahua”, dirigido por el PhD. Homero Vargas

2.2.2 Recolección de Especímenes

Las diferentes especies de valerianas se recolectaron en la provincia de Tungurahua, cantón Quero dentro del cerro Igualata, bajo la respectiva autorización emitida por la DIRECCIÓN PROVINCIAL DEL AMBIENTE TUNGURAHUA N°06-2018-IC-FLO-FAU-DPAT-VS. Se evaluaron las características organolépticas como, estructura de los órganos de las plantas (raíz, tallos y hojas), el olor, y coloración de las especies *Valeriana decussata* y *Valeriana rígida*, las cuales se tomaron en cuenta para realizar y continuar con el trabajo de investigación. Todos los análisis, se efectuaron en los laboratorios de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología en donde se realizó el tratamiento de la extracción de los compuestos

con actividad de las dos especies de valerianas (*Valeriana decussata* y *Valeriana rígida*).

2.2.2 Pulverización de las muestras

Para su procesamiento, se dividió el material en dos secciones: las hojas/tallos y en otra las raíces de cada especie de valeriana; ya separadas, se realizó un lavado con agua destilada y se colocó en la estufa a 60°C de 24 a 48 h para la desecación y deshidratación. Una vez seco el material se realizó la trituration del material con ayuda de un molino manual, una vez triturado, se realizó el pesaje en una balanza analítica, la cantidad que se pulverizó de las dos especies y sus diferentes secciones se almacenaron en fundas tetrapack para mantenerlas a una temperatura óptima (temperatura ambiente).

2.2.3 Cuantificación de sólidos

El material vegetal pulverizado se colocó en un matraz Erlenmeyer de 2 litros con agua destilada en una relación 1:20. Posteriormente, se empleó una estufa de calentamiento por un lapso de 30 minutos en ebullición, transcurrido este tiempo, se dejó enfriar para envasar los extractos en tubos de 15ml. Los extractos se filtraron mediante gravedad con papel cualitativo Whatman 1 y se almacenaron en tubos de ensayo a 25°C.

Seguidamente, se emplearon capsulas de porcelana que fueron lavadas y secadas en una estufa a una temperatura de 105°C, después las cápsulas fueron colocadas en un desecador para eliminar la humedad por un lapso de 2 h, una vez pasado el tiempo se realizó el pesaje con ayuda de una en la balanza analítica, se colocó en las cápsulas un volumen de 25ml de las muestras y se colocaron en la estufa a una temperatura de 95°C por 1 h para la evaporación de las muestras; seguidamente; se elevó la temperatura a 102°C por 12 horas. Una vez finalizado el tiempo, se retiraron las capsulas de la estufa y se colocaron en un desecador hasta que se bajaran su temperatura, finalmente, se pesaron y todos los datos fueron anotados para obtener el valor del sólido de cada una de las porcelanas.

Para el cálculo de los valores de solidos totales se empleó la siguiente formula:

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

Dónde:

ST: Solidos Totales en mg/L

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

B: Peso inicial de la capsula tarada en gramos

V: Volumen de muestra desecada en litros

2.2.4 Preparación del extracto acuoso para el cultivo celular

Para este proceso se hizo el uso del material vegetal pulverizado y se obtuvieron los dos extractos acuosos, uno de hojas /tallos y el otro de raíces de cada especie de valerianas. Con un vórtex se realizó la resuspensión del material vegetal seco de las muestras en PBS 1X estéril (relación 1:20, después con ayuda de un filtro (0,22 μm) se eliminaron impurezas, en tubos falcón estéril. Finalmente se conservaron estos extractos sellados con parafilm a una temperatura de -70°C ,

2.2.5 Cuantificación de Proteínas

Para la cuantificación de proteínas totales se empleó un método colorimétrico. El método Bradford permite la cuantificación de las proteínas; por lo que previamente se preparó una curva patrón de proteínas (albumina bovina) a concentraciones: 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50 y 1.75 mg/ml. Posteriormente, en una placa de 96 pocillos se adicionaron 5 μl de curva patrón de proteínas y/o 5 μl del extracto de Valeriana, 5 μl de PBS 1X; y se adicionó 150 μl del reactivo Bradford, evitando la luz al ser un reactivo fotosensible. Transcurrido el tiempo, se prosiguió a la incubación por 5 min y con el equipo Victor X3 (PerkinElmer, USA) se hizo la lectura de las placas a una longitud de onda de 570 nm.

2.2.6 Cultivo celular

2.2.6.1 Descongelación Celular

Las células MCF-7 se encontraban en almacenamiento en un criovial con medio DMEN enriquecido con FBS (10%) y DMS (10%) a -80°C , se colocaron en baño maría, el cual fue calentado previamente con el medio DMEN suplementado a temperatura de 37°C . En un tubo falcón de 15ml se colocó 5ml de medio DMEN

suplementado y se puso todo el contenido de células MCF-7 del criovial. Posteriormente se realizó una centrifugación de la suspensión durante 5 min a 500 rpm, una vez finalizada, se eliminó el sobrenadante y el pellet se usó para una resuspensión con 2ml de medio DMEN suplementado. El contenido final se ubicó en una frasca Roux con 12ml de medio de cultivo y se llevó a incubación a condiciones estándar por un lapso de 24 h para obtener la confluencia entre adecuada (70-80%).

2.2.6.2 Cultivo Celular de la línea MCF-7

Se emplearon líneas celulares MCF7 derivadas de adenocarcinoma del pecho (cáncer de mama), colocadas en una frasca de Roux de 75ml con medio DMEN (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), para evitar contaminantes se añadió 1 % de Penicilina/Estreptomicina y 1% de glutamina, y posterior se llevó a incubación en condiciones de (atmósfera de 37°C y 5% CO₂) para el respectivo crecimiento celular.

2.2.6.3 Pases Celulares

Una vez que el crecimiento y la confluencia celular llegó al 70-80%, se prosiguió a los respectivos pases celulares en nuevas frascas Roux de 75ml, para lograr que las células se mantuviesen viables. Para esto en el baño maría a temperatura de 37° C se calentaron tripsina, medio DMEN y PBS 1X; las frascas con cultivo celular (MCF-7) se retiraron de la incubadora, se eliminó el medio y se realizaron lavados con 8ml de PBS 1X y se prosiguió a su agitación, posteriormente se eliminó el contenido; se adiciono 1ml tripsina para despegar la monocapa de las células de la frasca y se incubo a 37°C por un lapso de 5-6 min a condiciones del 5% de CO₂ y atmósfera húmeda, finalizado ese tiempo se inactivo con ayuda de 5ml de medio DMEN suplementado. Se dividió en frascas, con un volumen final igual y se le adicionaron 12ml de medio DMEN suplementado; por último, se incubo en una atmósfera de 37°C y 5% CO₂ para su respectivo crecimiento celular.

2.2.6.4 Conteo Celular

Una vez obtenida la confluencia adecuada (70-80% de confluencia) de células viables, de cada una de las frascas que se encontraban en incubación, se prosiguió a preparar el baño maría con PBS 1X, Tripsina y Medio de cultivo DMEN a 37°C. Primeramente, se eliminó el contenido de las frascas y se adicionó 8ml de PBS, al colocar ese volumen se realizó un agitación durante 1 min para obtener un buen lavado, posteriormente se descartó el PBS de la frasca y se adicionó 1ml de tripsina-EDTA (0,25%), se llevó a incubación durante 5 min a 37°C y 5% de CO₂. Finalizado el tiempo se verificó que las células se encontraron completamente dispersas; y se adicionó 2ml de medio de cultivo para inhabilitar la función de la tripsina, luego se colocó la suspensión en un tubo falcón y se llevó a centrifugación por 5 min a 500 rpm. Posteriormente se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 2 ml de medio de cultivo DMEN suplementado, luego se llevó a centrifugación bajo con las mismas condiciones y se descartó el sobrenadante, al pellet se le adicionó 2ml de PBS 1X y se centrifugó. Finalmente, se descartó el sobrenadante y se adicionaron 2 ml de medio de cultivo al pellet final (solución de células MCF-7) y con ayuda del vórtex se agitó la solución.

Se empleó el reactivo Trypan Blue en una relación 1:1, para realizar la cuantificación y viabilidad celular, el colorante tiñó a las células muertas debido a que este tipo de células ya no tiene la membrana en un estado óptimo por lo que éste reactivo fácilmente las tiñe dejando visible a las células viables que van a ser usadas para los ensayos, en el cual se colocaron 100 µl del reactivo Trypan Blue con 100 µl de la solución de células MCF-7 (solución final) que fueron colocadas previamente en un tubo eppendorf. Para el conteo se empleó una cámara de Neubauer a la cual se le colocaron 10 µl de la solución final en los cuadrantes correspondientes para realizar el conteo en un microscopio óptico (objetivo 10X). Por último, se anotaron los resultados del conteo y aplicó la siguiente fórmula:

$$Nt \cdot 2 \cdot 10000 = \# \text{ células/ml; donde}$$

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

2.2.7 Ensayos MTT (Citotoxicidad)

El ensayo MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-di-feniltetrazol) proporciona información acerca de la dosis óptima y el IC50 a emplear de los extractos de las dos especies. Para la realización de experimento, se cultivaron células MCF-7 en placas de 96 pocillos a una densidad de 10.000 células/pocillo; luego, se adicionaron 100 µl del medio DMEN (suplementado) en cada uno de los pocillos para dejar que las células crecieran por un periodo de 24h. Una vez transcurrido el tiempo de cultivo se realizaron dos lavados consecutivos con el buffer PBS 1X, se añadieron los 4 diferentes tratamientos en las respectivas diluciones seriadas en base logarítmica 10, dejando en incubación por un lapso de 24 h en condiciones estándares. Se prosiguió a retirar el contenido total de los pocillos para nuevamente realizar dos lavados con PBS 1X, se continuó con la adición de 10 µl de MTT (5mg MTT/ml PBS 1X) en todos los pocillos, además de 100 µl de medio de cultivo DMEN sin rojo fenol para incubar durante 2 horas. Posteriormente, se colocó 100 µl de HCL (0,01 M) y 100 µl de SDS (10%), y se dejó en la incubadora durante 2 horas en condiciones estándares. Finalmente, se prosiguió a la lectura con ayuda del lector de microplacas Víctor X3 (PerkinElmer, USA) a 570nm. Con los resultados obtenidos se realizaron los cálculos respectivos.

2.2.8 Inmunocitoquímica

Preparación de la solución madre del reactivo de hipoxia Image-iT

Se disolvió el polvo liofilizado total contenido en el vial en 1,40 ml de DMSO obteniendo una solución a concentración de 1 mM, una vez disuelto, se prosiguió a agitar durante 3 minutos y fue almacenado a una temperatura de -20°C.

A partir de la solución madre se realizó el cálculo para obtener una solución de concentración final de 5 µM, la cual es la concentración óptima para aplicar en el ensayo según las instrucciones de la casa comercial

Ensayo del Factor Inductor de Hipoxia

Se sembraron en una placa de 6 pocillos de células MCF-7 a una densidad de 50.000 cel. por pocillo sobre un cubreobjeto en medio DMEN suplementado, se llevó a incubación durante 24 h. Transcurrido este tiempo se descartó el contenido de los pocillos y se prosiguió a realizar dos lavados con PBS 1X; se adicionaron los tratamientos en función del valor de la concentración de proteínas obtenidos por el método Bradford y la dosis optima del ensayo de citotoxicidad de acuerdo al volumen final (2ml), se llevó a incubación por un lapso de 24 h. posteriormente se descartó el medio de cada pocillo y se adicionó Paraformaldehido 4% (PFA) por un tiempo de 15 min, se eliminó el PFA y se prosiguió a realizar dos lavados con 1000 µl PBS 1X y se descartó la solución, finalmente se adicionaron 1000 µl de PBS 1X y se sellaron con papel parafilm la placas para almacenarlo a 4°C.

Para el ensayo, la placa se preparó en un ambiente protegido de la luz debido a que el reactivo contiene un fluorocromo, de tal manera que, se retiró el PBS 1X depositado de cada pocillo para posterior agregar 250 µl de la solución de tritón 100x con glicina para la permeabilización de la membrana y regular el pH, se dejó reposar durante 5 minutos en baño maría con agitación, se retiró y se realizaron dos lavados con PBS1X a baño maría y agitación, una vez descartado el PBS1X, se agregó 100 µl del reactivo de hipoxia Image-iT con una concentración final de 5 µM a cada pocillo y se incubo a baño maría durante 30 min en cámara húmeda y agitación , una vez transcurrido el tiempo se retiró la placa, se descartó el sobrenadante y se prosiguió a extraer los cubreobjetos con mucho cuidado y dejarlos reposar en una hoja de papel filtro para que se secaran a temperatura ambiente; se colocó papel aluminio sobre las laminillas para aislarlas por completo de la luz por un lapso de 24 h. Una vez transcurrido el tiempo se realizó el montaje con medio de montaje Acqueous mounting y se sellaron los bordes para ser leídas en el microscopio invertido de fluorescencia Leica DMi8 empleando el filtro TEXA red con un espectro de excitación y emisión de 595-615 nm.

2.2.9 Determinación de la Capacidad Antioxidante

Se utilizaron los sobrenadantes del cultivo celular obtenidos en el método de Inmunocitoquímica y se determinó la capacidad antioxidante total por medio de la técnica de TROLOX.

2.2.10 Técnica de TROLOX (Actividad Antioxidante)

Siguiendo las instrucciones del Kit comercial Trolox SIGMA-ALDRICH (Antioxidant Assay Kit) inicialmente se realizó una curva estándar empleando concentraciones en un rango (0-0,42 mM) de la siguiente manera:

Tabla 2 Concentraciones para la curva estándar

	Solución de Trabajo Trolox (1,5mM) (μ l)	Tampón de ensayo 1X (μ l)	Concentración Trolox en el estándar (mM)
1	0	500	0
2	5	495	0,015
3	15	485	0,045
4	35	465	0,105
5	70	430	0,21
6	100	360	0,42

Una vez obtenida la curva estándar, se preparó la solución de trabajo de sustrato ABTS mezclando 25 μ l de la solución de peróxido de hidrógeno al 3% y 10 ml de solución sustrato ABTS, se dejó reposar durante 20-30 minutos. Después en una placa de fondo plano de 96 pocillos se adicionaron 10 μ l de sobrenadante, 20 μ l de solución de trabajo de mioglobina y 150 μ l de la solución de trabajo de sustrato ABTS en cada pocillo y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionó 100 μ l de solución de parada (calentada previamente) a cada pocillo y se mezcló suavemente, luego mediante el uso del equipo Víctor X3 (PerkinElmer, USA) se realizó la lectura a 405 nm.

2.2.11 Técnica GRIESS (Óxido Nítrico)

Preparación del Reactivo Griess

Para la preparación del reactivo Griess se tomaron volúmenes a partes iguales de N-(1-naftil) etilendiamina diclorhidrato (Componente A) y el ácido sulfaníico (Componente B). Al ser un ensayo sensible a la luz, todo el proceso de preparación de componentes se realizó en oscuridad, preservando las propiedades del reactivo.

Elaboración de las soluciones activadoras de Cadmio

- *Cloruro de Amonio*

Para obtener la solución concentrada de cloruro de amonio, se pesaron 31,5 gramos de cloruro de amonio, disueltos en 250 ml de agua destilada, con agitación constante, una vez homogeneizada la solución se colocó en un frasco de vidrio estéril. A partir de esta solución concentrada de cloruro de amonio fue preparada la solución diluida de cloruro de amonio. Para esta obtención se mezcló 12,5 ml de esta solución concentrada de cloruro de amonio en una probeta y se aforó a 500 ml con agua destilada y se depositó en un frasco de vidrio estéril. Estas soluciones fueron ajustadas hasta un pH de 8.5 con NaOH y conservadas en refrigeración a 2 a 6°C.

- *Sulfato de cobre 2%*

Se realizó el pesaje de 5 gramos de sulfato de cobre en un vaso precipitado y se adicionó en 250 ml de agua destilada; se hizo una agitación constante durante 10 min en un frasco estéril y se la almacenó en un refrigerador para su conservación.

- *Ácido Clorhídrico (HCL 2N)*

Se realizó la extracción del ácido concentrado en la cámara de extracción de gases en donde se preparó una solución con 14,07 ml de HCL 37% y 70,93 ml de agua destilada en un frasco de vidrio estéril obteniendo así la concentración de trabajo. Esta solución se la mantuvo a temperatura ambiente.

- **Activación de Cadmio de trabajo**

Se usaron 50 gramos de perlas de cadmio, las cuales fueron pesadas en una balanza analítica, una vez obtenido el peso se lo depositó en un tubo de tipo Falcon de 45 ml y para su primer lavado se utilizó ácido clorhídrico 2N con la cantidad suficiente para cubrir las perlas por completo, se agitó fuertemente, después se descartó el ácido y se añadió agua destilada hasta cubrir por completo las perlas, y se agitó, y se desechó el agua por decantación, posteriormente se colocó el sulfato de cobre hasta cubrir completamente las perlas, y se agitó hasta que la solución de tonalidad azul cambie a una tonalidad más transparente, se desechó el sulfato de cobre por decantación y se adicionó agua destilada hasta cubrir por completo las perlas y se decantó, después se agregó el cloruro de amonio diluido, se agitó fuertemente y se eliminó por decantación, se procedió a almacenar las perlas protegiéndolas del aire.

2.2.12 Cuantificación de Óxido Nítrico

Se codificaron los tubos para cada uno de los tratamientos y se colocó 2 perlas previamente activadas con 240 μ l de muestra, luego se mantuvieron en constante homogenización con ayuda de un vórtex durante 30 minutos.

Para la curva de calibración se prepararon disoluciones seriadas con el estándar el kit (nitrito de sodio 1 – 100 μ M) de la siguiente manera:

$$1 = \frac{1\mu M * 200 \mu l}{1000 \mu M} = 0,2\mu l \text{ de estándar} + 199,8 \mu l \text{ agua destilada}$$

$$10 = \frac{10\mu M * 170 \mu l}{1000 \mu M} = 1,7 \mu l \text{ de estándar} + 168,3 \mu l \text{ agua destilada}$$

$$20 = \frac{20\mu M * 170 \mu l}{1000 \mu M} = 3,4\mu l \text{ de estándar} + 166,6 \mu l \text{ agua destilada}$$

$$30 = \frac{30\mu M * 170 \mu l}{1000 \mu M} = 5,1 \mu l \text{ de estándar} + 164,9 \mu l \text{ agua destilada}$$

$$40 = \frac{40\mu M * 170 \mu l}{1000 \mu M} = 6,8 \mu l \text{ de estándar} + 163,2 \mu l \text{ agua destilada}$$

$$50 = \frac{50\mu M * 170 \mu l}{1000 \mu M} = 8,5 \mu l \text{ de estándar} + 161,5 \mu l \text{ agua destilada}$$

$$60 = \frac{60\mu M * 170 \mu l}{1000 \mu M} = 10,2\mu l \text{ de estándar} + 159,8 \mu l \text{ agua destilada}$$

$$70 = \frac{70\mu M * 170 \mu l}{1000 \mu M} = 11,9 \mu l \text{ de estándar} + 158,1 \mu l \text{ agua destilada}$$

$$80 = \frac{80\mu M * 170 \mu l}{1000 \mu M} = 13,6 \mu l \text{ de estándar} + 156,4 \mu l \text{ agua destilada}$$

$$90 = \frac{90\mu M * 170 \mu l}{1000 \mu M} = 15,3 \mu l \text{ de estándar} + 154,7 \mu l \text{ agua destilada}$$

$$100 = \frac{100\mu M * 170 \mu l}{1000 \mu M} = 17 \mu l \text{ de estándar} + 153 \mu l \text{ agua destilada}$$

Cuando finalizó el tiempo de incubación de las muestras tratadas con las perlas, se realizó el ensayo en una placa de fondo plano de 96 pocillos, en dónde a cada pocillo se le colocó 150 μ l de la muestra, 130 μ l de agua destilada y 20 μ l del reactivo de Griess; mientras que para la curva estándar en el rango 1-100 μ M se colocaron 130 μ l de agua destilada, 150 μ l de las disoluciones preparadas previamente y 20 μ l del reactivo de Griess; después se preparó el blanco con la adición de 280 μ l de agua destilada y 20 μ l del reactivo de Griess. La microplaca se mantuvo en incubación por un lapso de 30 min a temperatura ambiente sin la presencia de la luz. Finalmente, la placa fue leída con ayuda del espectrofotómetro Víctor X3 (PerkinElmer, USA) a 570 nm.

2.2.13 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el paquete estadístico GraphPad Prism Versión 8.0 y GraphPad InStat 5 con el cual se obtuvieron los análisis de varianza (ANOVA) y post test de Tukey para los diferentes ensayos realizados, y las imágenes obtenidas por microscopía se analizaron mediante el programa LASX de Leica Microsystem. Se tomó además los índices de confianza del 95% y valor $p < 0,05$ como significativo.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis y discusión de resultados

3.1.1 Análisis fisicoquímico

3.1.1.1 Determinación de sólidos totales (ST) a partir de extractos de *Valeriana rígida* y *Valeriana decussata*.

Se realizó la preparación de los extractos acuosos con PBS en relación (1:20) a base de las raíces, hojas y tallos pulverizados de las plantas de *Valeriana decussata* y *Valeriana rígida*. En la siguiente tabla 3 se presentan las concentraciones de sólidos totales de cada muestra.

Tabla 3 Concentración de sólidos totales extraídos de los diferentes extractos.

Muestra	Volumen de muestra (ml)	Concentración de Sólidos Totales (%p/v)	Rendimiento (%)
VD- H/T	25	6,64	13,28
VD -R	25	6,8	13,6
VR- H/T	25	8,92	17,84
VR-R	25	12,64	25,28

Descripción: **VD H/T:** *Valeriana decusata* Hojas y Tallos; **VD-R:** *Valeriana decusata* Raíz; **VR- H/T:** *Valeriana rígida* Hojas y Tallos; **VR-R:** *Valeriana rígida* Raíz.

El rango de los rendimientos de los sólidos totales (ST) se encontraron entre un 25,28% a un 13,28%. Del extracto VR-R se obtuvo 25,28% de rendimiento, siendo el más alto de las especies estudiadas; mientras que en VR-H/T se obtuvo un rendimiento del 17,84%. El menor rendimiento se presentó en hojas y tallos VD-H/T con un 13,28% y en VD-R con un 17,84%. Observando que los rendimientos obtenidos de cada una de las muestras analizadas podrían contener una cantidad significativa de compuestos con actividad biológica, sin embargo, se requieren otros ensayos bioquímicos.

El rendimiento obtenido de los sólidos totales de los extractos de las valerianas fueron valores bajos con un rango de 13,28% y 25,28%; con respecto a otros tipos de extractos de plantas en dónde se evidenció un porcentaje de hasta un 74,35% el cual se considera elevado (**Ochoa Pacheco et al., 2013**). Se han realizado diversos estudios en relación a los factores que pueden influir en el rendimiento de la extracción de compuestos activos en plantas y uno de ellos es la naturaleza del solvente en donde indica que; al utilizar un solvente de naturaleza polar sobre un compuesto alifático no existe la suficiente afinidad para la extracción de los compuestos con actividad biológica como es el caso de sesquiterpenos, valepotriatos, ácido valérico, etc., que son compuestos alifáticos (C15) (**Tafurth, 2000**). Sin embargo el uso de solventes polares como el agua es una de las mejores opciones cuando se requiere extraer los principios activos de plantas como la valeriana; en el proceso de infusión se somete a la valeriana a un solvente de una temperatura igual a la de ebullición del agua durante un cierto lapso y después se deja enfriar a temperatura ambiente para que de tal forma los compuestos activos sean extraídos y aprovechados de la mejor manera, éste método es muy aplicado debido a que es una de las formas más comunes en las que se consumen estas plantas para tratar diversas enfermedades (**Carrión & García, 2010**).

Otra razón de la diferencia de rendimientos entre los extractos de ambas especies puede deberse principalmente al proceso por el cual fueron sometidas las dos extracciones. Tanto en los extractos de raíz y fueron sometidas a cambios de temperatura muy elevada por lo que según (**Mostacero, 2005**) todos los procesos los cuales sean sometidos a variaciones de temperatura, son susceptibles a cambios en su estructura, dependiendo de cada compuesto con actividad biológica y las valerianas al contener una gran variedad de compuestos activos como valepotriatos, valtrato/isovaltrato, se ve afectada su estructura química por esta variable (**Naranjo, 2010**).

3.1.2 Actividad citotóxica

Para la determinación de la citotoxicidad de los extractos de *Valeriana rígida* y *Valeriana decussata* se realizaron ensayos MTT en diluciones seriadas en base logarítmica desde 1×10^0 hasta 1×10^{-8} . Los resultados obtenidos se muestran en las gráficas que evidencian las variaciones de la densidad óptica en función de las diferentes concentraciones de los extractos.

Es importante señalar que los ensayos se realizaron por duplicado, en dónde; ambos extractos tuvieron un comportamiento similar, mostrando una variedad de datos, logrando de tal manera establecer el IC₅₀ alrededor de la dilución logarítmica de 10⁻³, al analizar el valor IC₅₀ obtenido mediante el método estadístico, este mostró un rango muy amplio por lo cual se decidió tomar en cuenta esta concentración.

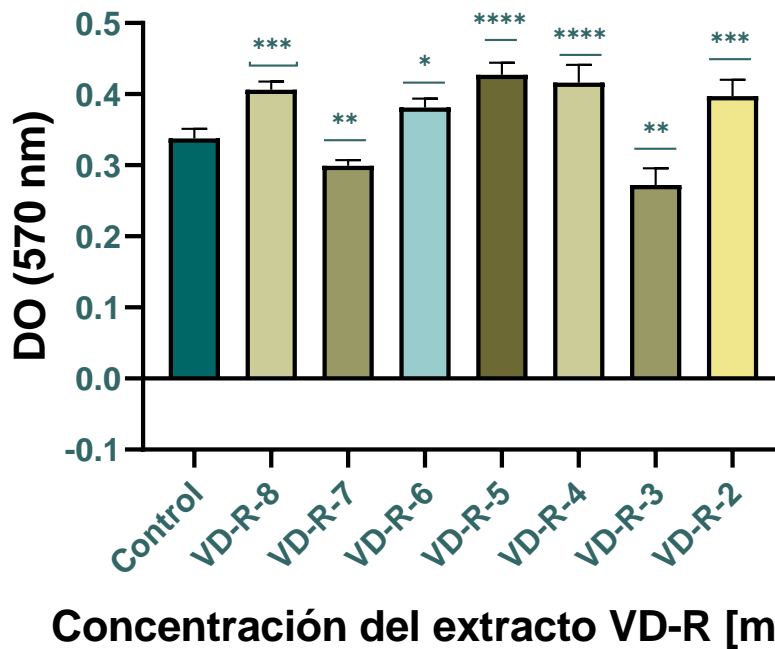


Fig. 9 Ensayo de citotoxicidad del extracto de *Valeriana decussata* raíz (VD-R) sobre células MCF-7

Descripción: Medias y desviaciones estándar ($\bar{x} \pm DS$) obtenidas a partir de la DO (Densidad Óptica) (~cantidad de células vivas) en función de la concentración celular de diluciones seriadas del extracto VD-R en la proliferación de células MCF-7; el control está compuesto de células MCF-7 sin el extracto. La prueba ANOVA ayudó a obtener la significancia estadística (VD-R: F:41,17, P:< 0.0001; grados de libertad = 7 para tratamientos y 24 para residuales) seguido de la prueba de Tukey ($\alpha= 0,05$, *P=<0.05; **P=<0.01; ***P<0.001; ****P<0,0001).

En la figura 9 se observa que las células al someterlas a los extractos si presentan diferencias significativas en relación con el control, mientras que en la proliferación celular no se evidencia un decremento en la significancia de las muestras por el efecto de los extractos.

A pesar de no encontrar significancia con respecto a la proliferación, se puede comparar la dilución logarítmica 10⁻³ con el control, la cual obtuvo un valor de significancia **P=<0.01 y una media de 0,2725 muy debajo de la media del control (0,338), mostrando que a esta concentración se logró la mayor inhibición de la proliferación celular.

Las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-8} con un $p < 0,0001$ (****) muestran las concentraciones en donde se obtuvo la proliferación celular más alta. Por lo que; cuando se va disminuyendo la concentración del extracto la proliferación va aumentando. En la dilución 10^{-2} en el extracto VD-R se evidencia un aumento de la proliferación celular independiente de la concentración con un $p < 0,0001$ (***).

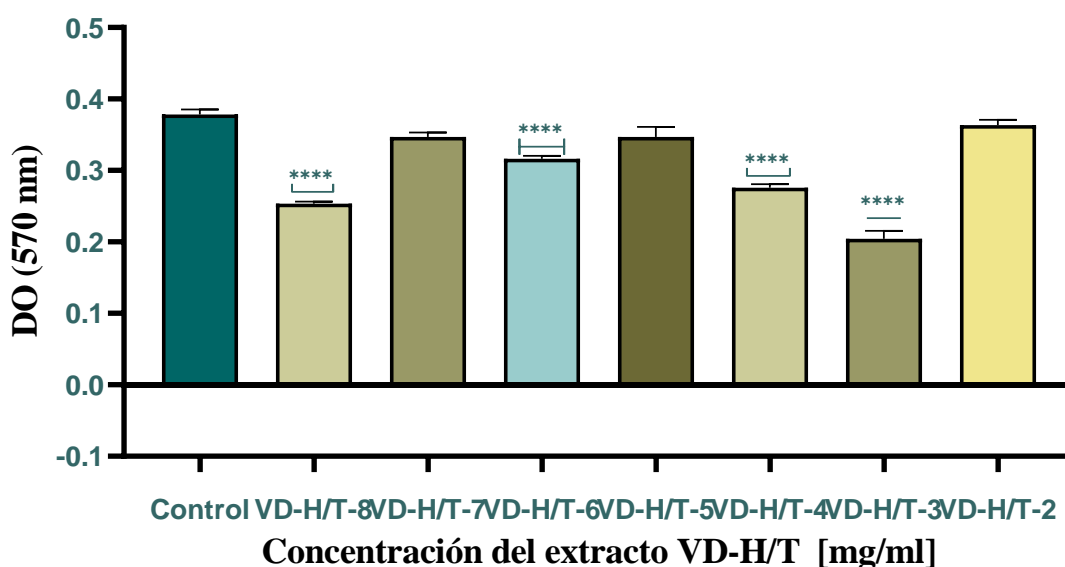


Fig. 10 Ensayo de citotoxicidad del extracto de *Valeriana decussata* Hojas y Tallos (VD-H/T) sobre células MCF-7

Descripción: Medias y desviaciones estándar ($\bar{x} \pm DS$) obtenidas a partir de la densidad óptica (~cantidad de células vivas) en relación con la concentración celular de diluciones seriadas del extracto DHT en la proliferación de células MCF-7; el control contiene células MCF-7 en ausencia de extracto. Se realizó una prueba ANOVA para determinar la significancia estadística (D-H/T: F:57,59, $P < 0,0001$; grados de libertad = 7 para tratamientos y 24 para residuales) seguido de la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$, **** $P < 0,0001$).

En la figura 10 se puede observar que las diluciones logarítmicas del extracto VD-H/T sí muestran una diferencia significativa en cuanto a la disminución de la proliferación celular. Comparando el valor de la media del control (0,37825) con cada una de las diluciones, se muestra que los valores más bajos estuvieron presentes en las diluciones logarítmicas 10^{-3} y 10^{-8} con medias de 0,2042 y 0,2535 respectivamente; lo cual, es un indicativo que la proliferación celular disminuye haciendo a las diluciones dependientes de la concentración del extracto. De tal forma que los niveles de significancia fueron menores en estas muestras (**** $P < 0,0001$); además de muestras que no mostraron una diferencia significativa ($P > 0,05$).

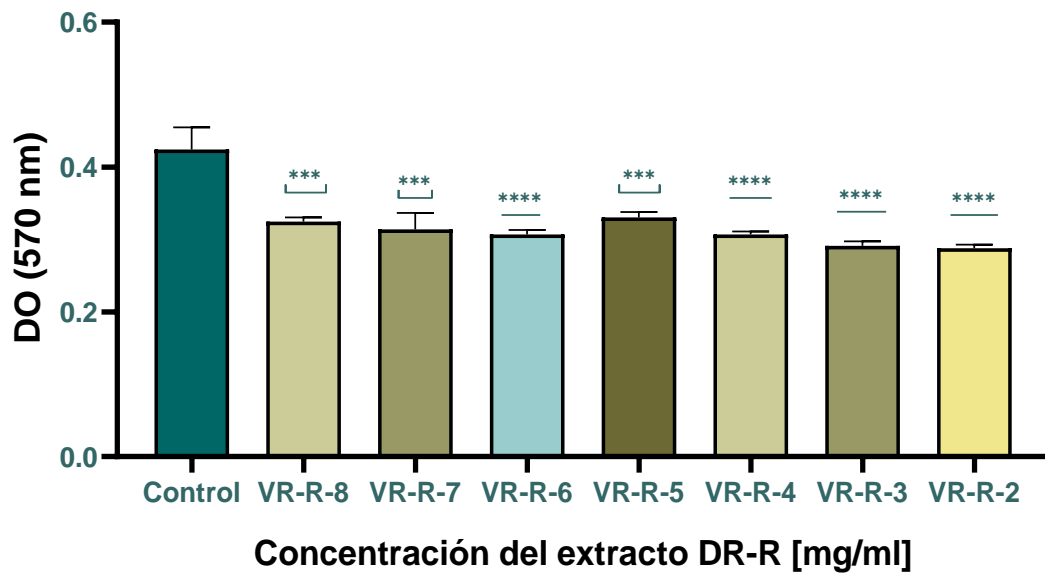


Fig. 11 Ensayo de citotoxicidad del extracto de *Valeriana rígida raíz* (VR-R) sobre células MCF-7

Descripción: Medias y desviaciones estándar ($\bar{x} \pm DS$) obtenidas a partir de la densidad óptica (~cantidad de células vivas) en función de la concentración celular de diluciones seriadas del extracto RR en la proliferación de células MCF-7; el control contiene células MCF-7 en ausencia de extracto. Se realizó una prueba ANOVA para determinar la significancia estadística (VR-R: F:9,022, P:< 0.0001; grados de libertad = 7 para tratamientos y 24 para residuales) seguido de la prueba de Tukey ($\alpha= 0,05$, ***P<0,001; ****P<0,0001).

Al comparar las células control y las células tratadas con extracto de VR-R (Fig11); se muestra que existe una disminución significativa en la proliferación celular, obteniendo una significancia de ****P<0,0001; ***P<0,001 para las diferentes diluciones logarítmicas del extracto. Además, se evidenció que la dilución logarítmica 10^{-2} presentó una disminución muy baja con respecto a la media del control (0,424) mientras que la media de la dilución fue de 0,288, mostrando que el extracto actúa cuando se encuentra en mayor concentración disminuyendo la proliferación al estar menos diluida; únicamente en la dilución logarítmica 10^{-5} no presentó una disminución progresiva, pero de igual manera hubo una disminución respecto a la media del control.

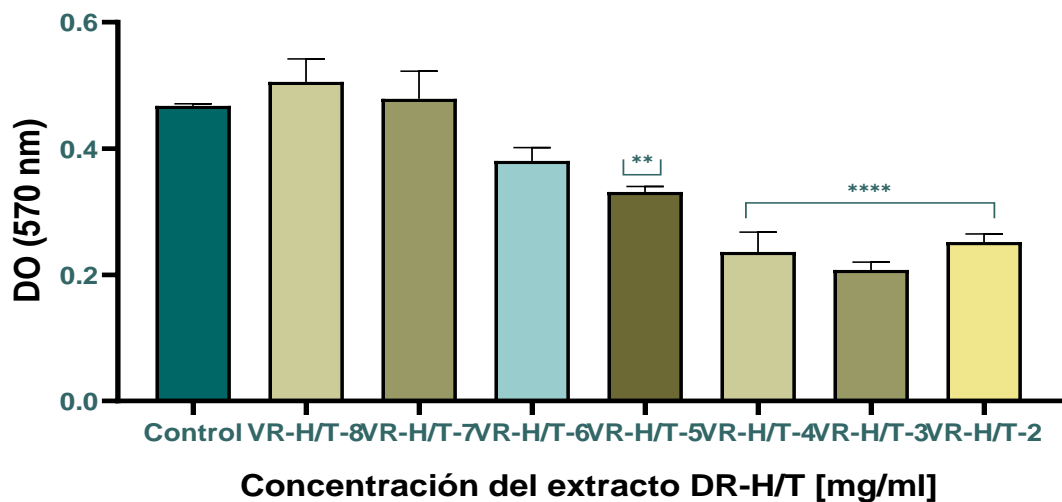


Fig. 12 Ensayo de citotoxicidad del extracto de Valeriana rígida hojas y tallos (VR-H/T) sobre células MCF-7

Descripción: Medias y desviaciones estándar ($\bar{x} \pm DS$) obtenidas a partir de la densidad óptica (~cantidad de células vivas) en función de la concentración celular de diluciones seriadas del extracto DR-H/T en la proliferación de células MCF-7; el control contiene células MCF-7 sin la presencia del extracto. Se realizó una prueba ANOVA para determinar la significancia estadística (DR-H/T: F: 22,15, P:< 0.0001; grados de libertad = 7 para tratamientos y 24 para residuales) seguido de la prueba de Tukey ($\alpha= 0,05$, **P<0,05; ****P<0,0001).

En la figura 12 se obtuvieron valores muy significativos ****p<0,0001 con las células tratadas frente al control, evidenciando una disminución en la proliferación celular. A pesar de no tener una disminución consecutiva, se observa que en la dilución 10^{-2} (****P<0,0001) existe la menor proliferación celular debido a que es la dilución más concentrada, además; se observa que el resto de las diluciones mantienen una proliferación independiente de la concentración, conllevando a que no existiera una relación en las diluciones seriadas, pero mostrando un indicador de que estas diluciones si mantienen la proliferación celular. Las diluciones logarítmicas 10^{-8} y 10^{-7} mostraron medias superiores a la media control 0,5055, 0,4787 respectivamente y no presentaron diferencia significativa (P>0.05) en relación con el control.

También se evidenció que la dilución 10^{-3} presentó la mayor inhibición de células MCF-7 con una media de 0,20755 muy por debajo de la media del control (0,4675).

Los resultados de las figuras del ensayo MTT mostraron las medias, desviaciones

estándar y los niveles de significancia a partir de las variaciones en la DO (densidad óptica) en función de la concentración de los extractos de valeriana.

En la mayoría de los casos se evidenció la disminución de la proliferación celular pese a que las diversas diluciones no mantienen un orden en relación con la concentración de los extractos, determinando así, que los extractos disminuyen e inducen la proliferación celular y la actividad citotóxica en este tipo de línea celular (MCF-7). Dado que se obtuvo una gran heterogeneidad en los valores de las gráficas, hay una gran relación de la actividad citotóxica en referencia a la concentración de los extractos de ambas especies tanto de *Valeriana rígida* y *Valeriana decussata* evidenciando en gran medida que los tratamientos tienen funcionabilidad sobre la línea celular MCF-7, en el caso de la inhibición de la proliferación celular óptima fue determinada en la dilución logarítmica 10^{-3} en dónde la mayor parte de los extractos de VD-R, (**P<0,001), VR-R (****P<0,0001) y VR-H/T (****P<0,0001) fueron parte de esta inhibición.

Los resultados más sobresalientes de las dos especies se encontraron en los extractos obtenidos a partir de hojas y tallos de las valerianas, debido a que las concentraciones en las que se obtuvo mayor concentración de los extractos fueron de estas secciones de la planta, como lo menciona (**Pérez-Alonso & Jiménez, 2011**), los órganos como tallo, hojas de plantas obtenidas de páramos albergan la mayor cantidad de metabolitos y son usados como principal fuente para la extracción de fitocompuestos.

3.1.3 Inmunocitoquímica

3.1.3.1 Factor inductor de hipoxia

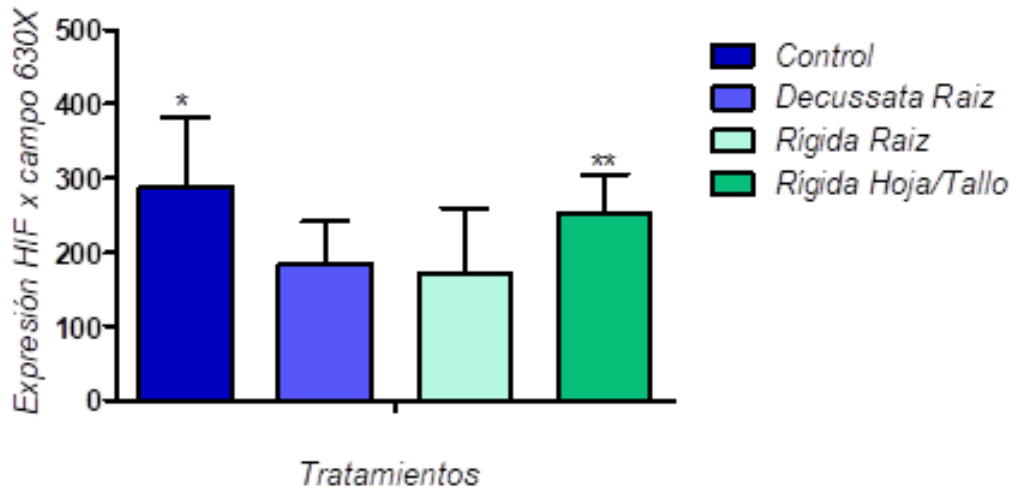


Fig. 13 Expresión del factor inductor de hipoxia en células MCF-7 tratadas y control

Descripción: * $p < 0,001$ Control vs VD-R (*Valeriana decussata* Raíz) Y VR-R (*Valeriana rígida* Raíz); ** $p < 0,01$ VR-H/T (*Valeriana rígida* Hojas y Tallos) vs VD-R (*Valeriana decussata* Raíz) Y VR-R (*Valeriana rígida* Raíz).

En la fig. 13 se observa la expresión del factor inductor de hipoxia (HIF) en células tratadas con los extractos de *Valeriana decussata* y *Valeriana rígida*, en donde se evidencia que éstos tratamientos disminuyen en cierta medida la expresión del HIF con respecto al control, pudiendo inferir así que, al someter las células a los tratamientos, su microambiente puede cambiar en su beneficio, aumentando la captación de oxígeno por parte de las células, lo cual podría ser beneficioso para contrarrestar el daño celular inducido por hipoxia que es típico en células cancerígenas. De tal manera que los tratamientos que mostraron mejores resultados fueron el de *Valeriana rígida* raíz, y *Valeriana decussata* Raíz, mostrando disminución del HIF siendo positivo en este tipo de línea celular que, aunado a otros factores, podrían ser coadyuvantes en la eliminación y mejoramiento del microambiente celular. En el caso de la *Valeriana decussata* Hojas y Tallos su expresión fue nula y escasa.

Como lo menciona (Liu et al., 2015) el HIF cumple algunos aspectos importantes dentro del cáncer de mama como la angiogénesis, metástasis, mantenimiento de células madre etc, Por lo que la presencia de su expresión en el cáncer de mama es crucial para su avance, infiriendo que una disminución de su expresión a través de extractos de plantas resultaría importante, ya que permitiría optimizar el flujo de oxígeno en este tipo de; la expresión de este factor inductor se basa en la capacidad de

hacer daño celular a nivel de membrana, cuando las células se encuentran en ambientes hipóxicos, varían de acuerdo a los niveles de oxígeno que se encuentra presente, en donde los extractos de valerianas disminuyen la expresión en las células MCF-7, se han realizado diversos estudios con compuestos de plantas como el caso de los flavonoides que inhibieron la expresión del HIF en ambientes hipóxicos (Movafagh et al., 2015). A pesar de que el HIF regula la expresión de genes en condiciones hipóxicas, además aportando en la homeóstasis del oxígeno, un oncogén importante generado como producto del gen supresor tumoral es el TP53 de la proteína p53, que inhibe la actividad de HIF-1 α , por lo que un estudio que muestre disminución de este factor con ayuda de extractos de origen vegetal es muy importancia en la carcinogénesis.

La figura 14 y 15 muestran la expresión del HIF en células MCF-7 tratadas con extractos de valeriana y control mediante microscopia de fluorescencia en células marcadas con Image-iT. No se obtuvo expresión del factor en células tratadas con *Valeriana decussata* Hojas y Tallos

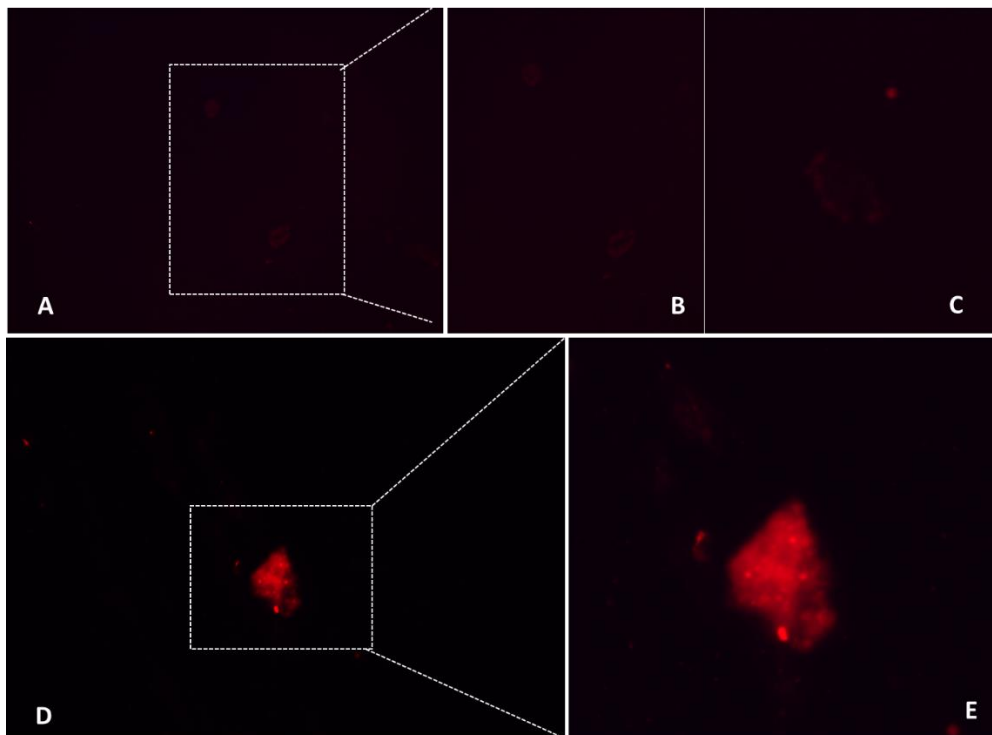


Fig. 14 Expresión de HIF en células MCF-7 magnificación 630X. Las células con expresión de HIF fueron teñidas con Image-iT, y leído con el filtro Texa red (595-615 nm) mediante el software LasX de Leica. Control (A,B,C) y Valeriana rígida raíz (D, E).

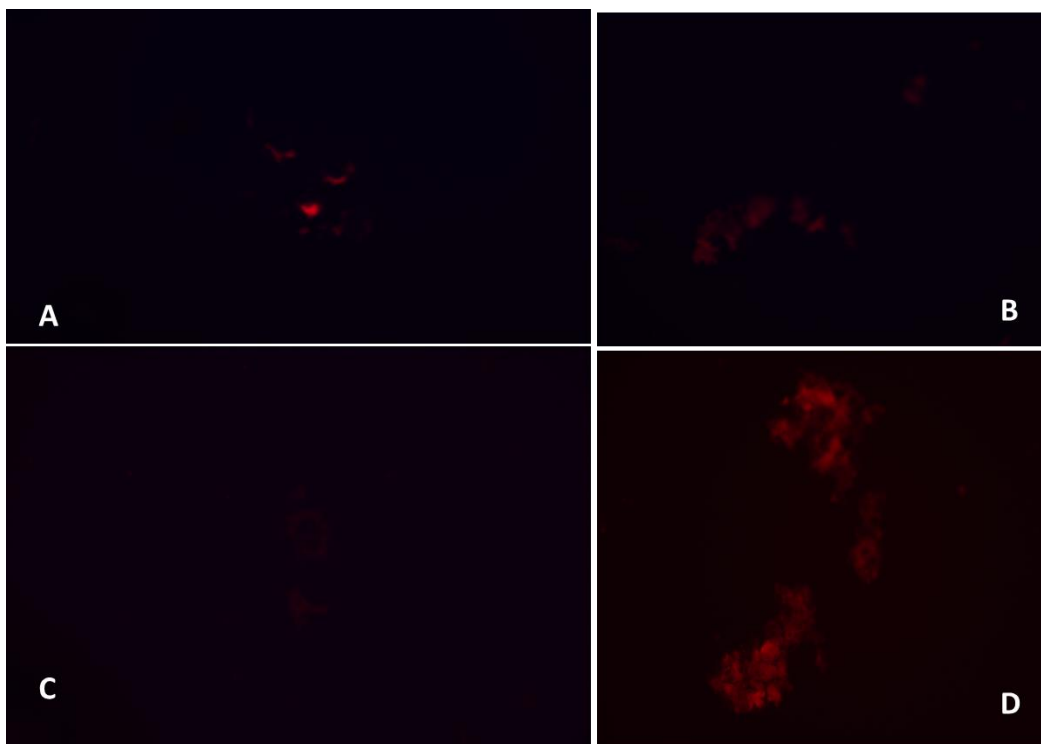


Fig. 15 Expresión de HIF en células MCF-7 magnificación 630X. Las células con expresión de HIF fueron teñidas con Image-iT, y leído con el filtro Texa red (595-615 nm) mediante el software LasX de Leica. Valeriana rígida Hoja/Tallos (A, B) y Valeriana decusata raíz (C, D)

3.1.4 Actividad antioxidante

3.1.4.1 Capacidad antioxidante equivalente TROLOX (TEAC)

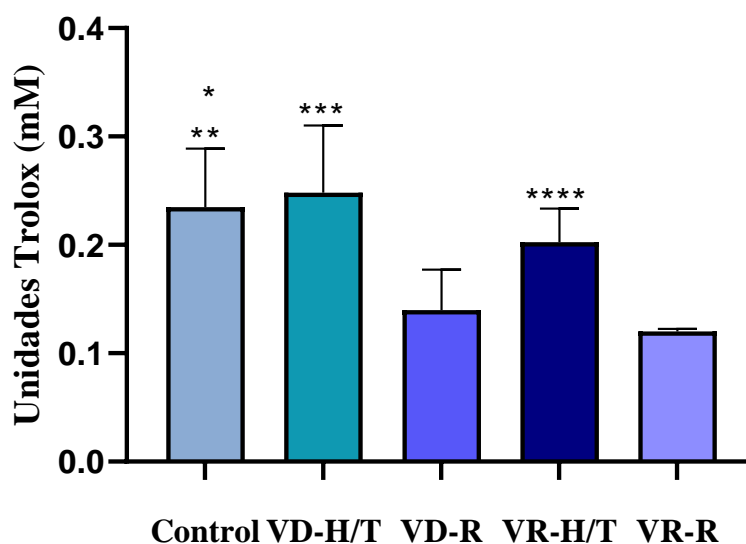


Fig. 16 Gráfica de la actividad antioxidante mediante el método de Trolox para la determinación de las unidades Trolox.

Descripción: * $p > 0,01$ control vs VD-R (*Valeriana decussata* Raíz); ** $p > 0,001$ control vs VR-R (*Valeriana rígida* Raíz); *** $p > 0,01$ VD-H/T (*Valeriana decussata* Hojas/Tallos) vs VD-R *Valeriana decussata* raíz; *** $p > 0,001$ VD-H/T *Valeriana decussata* Hojas/Tallos vs VR-R (*Valeriana rígida* Raíz); **** $p > 0,05$ VR-H/T (*Valeriana rígida* Hojas /Tallos) vs VR-R (*Valeriana rígida* Raíz).

El catión radical ABTS • + es el cromóforo de coloración verde que va a permitir la determinación de la capacidad de los extractos para suprimir la producción del catión radical por lo que la intensidad del coloración va a ser dependiente de la concentración, por lo que se puede visualizar en la fig. 16 que en base al control con una media de 0,235 en relación a las unidades equivalentes de TROLOX y las muestras de VD-H/T (0,2481), VD-R (0,139), VR-H/T (0,2025) y VR-R (0,120) hace relación a la presencia de diversos compuestos con capacidad antioxidante y en el extracto que mayor cantidad se observa en relación al control (TROLOX), es el extracto VD-H/T; que según ((**Rodríguez Aguirre et al., 2016**), mencionaron que la familia de las valerianas presentan aceites esenciales, terpenos y otros compuestos con elevados niveles de actividad antioxidante que a pesar de no realizar un estudio fitoquímico a profundidad se evidencia que poseen compuestos con esta capacidad y correlacionando con los niveles de NO obtenidos con el método de Griess en donde se apreciaban bajos niveles de concentración de NO, puede explicarse que al encontrar la presencia de sustancias antioxidantes permite que la producción de radicales no solo del Nitrógeno sino también dependientes del oxígeno sea menor, evidenciando la actividad antioxidante en este tipo de extractos.

En las demás muestras se visualiza que a pesar de no mostrar una diferencia significativo con respecto al control, muestras niveles bajos de antioxidantes que no reaccionaron con el radical catión ABTS•+, eso puede ser debido que en el tratamiento, afectó alguna variable en el tratamiento de extracción como la temperatura, solvente, etc que afectó la concentración y por tanto disminuya los compuestos con capacidad antioxidante o no estén presente en una cantidad aceptable para reflejar niveles más elevados pero determinando que existe la presencia de compuestos pero con baja actividad.

3.1.4.2 Método de Griess

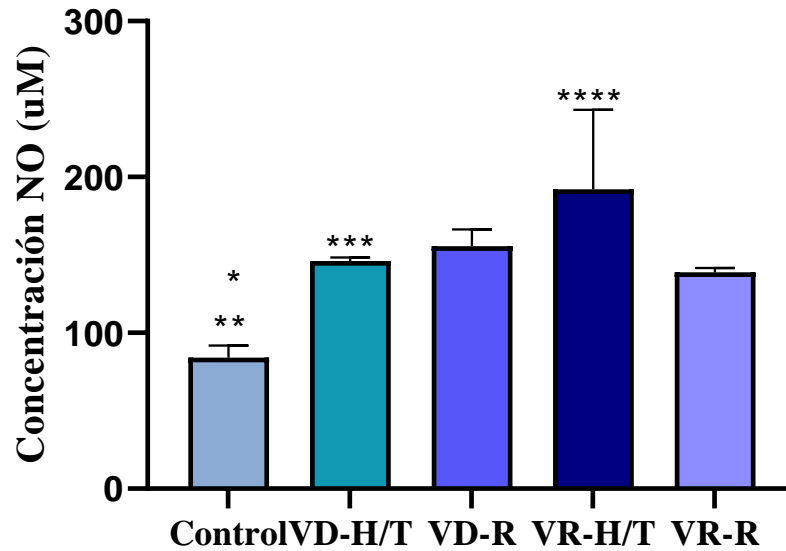


Fig. 17 Diagrama de actividad antioxidante mediante el método de Griess para la determinación de la concentración de NO (uM).

Descripción: * $p > 0,01$ Control vs VD-H/T (*Valeriana decussata* Hojas/Tallos) y VR-R (*Valeriana rígida* Raíz); ** $p > 0,001$ Control vs VD-R (*Valeriana decussata* Raíz) y VR-H/T (*Valeriana rígida* Hojas y Tallos); *** $p > 0,05$ VD-H/T (*Valeriana decussata* Hojas/ Tallos) vs VR-H/T (*Valeriana rígida* Hojas/Tallos); **** $p > 0,01$ VR-H/T (*Valeriana rígida* Hojas/Tallos) vs VR-R (*Valeriana rígida* Raíz).

La fig. 17 muestra la relación de la cantidad de NO μM con respecto a los extractos expuestos, en todos los tratamientos se puede evidenciar que los niveles de NO son superiores a la media del control (84,1601) mientras que las medias de VD-H/T con medias de (146,008), VD-R (155,606), VR-H/T (192,0535) Y VR-R (138,86), según (Hernández Espinosa et al., 2019) cuando existe microambientes con reducciones parciales de O_2 se generan radicales libres que como el anión superóxido o el óxido nítrico que al reaccionar con otras moléculas se generan mayor cantidad de radicales libre; cómo se puede acotar del ensayo de HIF al encontrar niveles de oxígeno parciales, también se puede encontrar mayor cantidad de radicales como es el caso de *Valeriana rígida* Hojas y Tallos que presentaba niveles de expresión no tan bajos por lo que al poseer una cantidad considerable de moléculas O_2 que pueden reaccionar la lectura también será elevada ya que se involucran varios factores como la presencia de hidroxilo que interfieren en este tipo de lecturas, es por esto que en la mayoría de los tratamientos tienen niveles superiores a los del control evidenciando la formación de óxido nítrico en los tratamientos, sin embargo la relación de concentración en grupos

determina que el mejor tratamiento que logra la disminución de la formación NO es el tratamiento *Valeriana rígida* Raíz que fue la que mejor se acopló al ensayo, seguido del tratamiento de *Valeriana decussata* Hojas/Tallos debido a la baja producción de NO de acuerdo a su concentración.

El NO puede tener varias vías de accionamiento en bajas concentraciones (1-100nM), actúa como una molécula de señalización que favorece el potencial metastásico de células tumorales, mientras que a altas concentraciones (400-1000nM), induce apoptosis (Vanini et al., 2011), en la fig 17 se observa como las concentraciones encontradas de NO son muy elevadas en relación al control por lo que se determina que estos extractos promueven la aparición de. Además las concentraciones del NO en el organismo se encuentra entre 10 nM a 1 µM en donde su vida media en disolución acuosa varía entre 3.8 a 6.2s por lo que es muy difícil su cuantificación en este tipo de sistemas, pero al ser extraído directamente y convertidos en extractos es oxidado por lo que la durabilidad y la vida media del NO puede alcanzar un largo periodo de estabilidad por lo que la aplicabilidad del tratamiento es adecuado en los procesos *in vitro*. (Tenorio et al., 2005).

4.1 VERIFICACIÓN DE HIPÓTESIS

4.1.1 Actividad antioxidante

Hipótesis alternativa

Los extractos de *Valeriana decussata* y *Valeriana rígida* poseen actividad antioxidante, por lo que se acepta la hipótesis alternativa al obtener las suficientes evidencias experimentales mediante los ensayos de método de Griess y ensayo de capacidad antioxidante (TROLOX), en donde se encuentra evidencia que los tratamientos tienen capacidad antioxidante disminuyendo la formación de radicales como el NO ayudando de tal manera a la señalización de rutas que inhiben la capacidad de las células cancerígenas.

Hipótesis nula

Los extractos de *Valeriana decussata* y *Valeriana rígida* no poseen actividad antioxidante se rechaza

4.1.2 Efecto citotóxico

Hipótesis alternativa

Los extractos de *Valeriana decussata* y *Valeriana rígida* poseen efecto citotóxico *in vitro*, demostrando en los resultados que se inhibió la proliferación celular con datos heterogéneos por lo que la concentración, por lo que se acepta la hipótesis alternativa.

Hipótesis nula

Los extractos de *Valeriana decussata* y *Valeriana rígida* no poseen efecto citotóxico se rechaza.

CAPÍTULO IV CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- Se logró determinar la capacidad antioxidante *in vitro* de los extractos de *Valeriana decussata* y *Valeriana rígida* sobre células cancerígenas MFC-7, encontrando que el tratamiento de *Valeriana decussata* Hojas/Tallos obtuvo mejores resultados de actividad antioxidante frente a la línea celular MCF-7.
- Se determinó la capacidad citotóxica de los extractos de *Valeriana decussata* y *Valeriana rígida* en células cancerígenas, evidenciando que los tratamientos tienen un efecto importante sobre este tipo de células.
- Por medio del ensayo de Griess se logró estimar la concentración de óxido nítrico producido en las células tratadas con los extractos, definiendo así que el tratamiento que menor cantidad de NO expresó fue *Valeriana rígida* Raíz ayudando a disminuir la formación de RL sobre células MFC-7.
- Se evaluó la expresión del factor inductor de hipoxia (HIF) en células cancerígenas tratadas con extractos de *Valeriana decussata* y *Valeriana rígida*, determinando que todos los tratamientos disminuyeron la expresión del factor inductor de hipoxia con relación a la concentración de cada tratamiento.
- Se logró correlacionar los resultados obtenidos y se estableció que los extractos de *Valeriana decussata* y *Valeriana rígida* podrían representar a futuro coadyuvantes en la terapéutica frente a células cancerígenas, sin embargo, se requiere un mayor número de estudios.

4.2 Recomendaciones

- Realizar un estudio fitoquímico y de caracterización de *Valeriana decussata* y *Valeriana rígida*, para poder establecer las concentraciones reales de los compuestos con actividad biológica por métodos más específicos como HPLC.
- Realizar estudios en otro tipo de líneas celulares o modelo animal verificando que influencia tienen estas especies de *Valeriana* para lograr contrarrestar las variaciones de los resultados obtenidos.
- Realizar un estudio de otras especies reactivas que pueden expresarse al momento de aplicar los tratamientos en este tipo de línea celular.

BIBLIOGRAFÍA

- Accame, M. E. C. (2001). *Valeriana officinalis. Fitoquímica, farmacología y terapéutica*. 6.
- American Cancer Society. (2016). *Tratamiento del cáncer de seno*.
<https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/tratamiento.html>
- Balasaheb Nimse, S., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, 5(35), 27986-28006.
<https://doi.org/10.1039/C4RA13315C>
- Barber, M. D., Thomas, J. St. J., & Dixon, J. M. (2008). *Breast cancer an atlas of investigation and management*. Clinical Publishing.
<http://search.proquest.com/publication/54745>
- Benedetti, S., Nuvoli, B., Catalani, S., & Galati, R. (2015). Reactive oxygen species a double-edged sword for mesothelioma. *Oncotarget*, 6.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.4253>
- Brahimi-Horn, M. C., Chiche, J., & Pouysségur, J. (2007). Hypoxia and cancer. *Journal of Molecular Medicine*, 85(12), 1301-1307.
<https://doi.org/10.1007/s00109-007-0281-3>
- Carrión, A., & García, C. (2010). *PREPARACIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES: DETERMINACIÓN DE EFICIENCIA DE METÓDICA*.
<https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:Y37p6bPXw-gJ:https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/2483/1/tq1005.pdf+&cd=1&hl=es-419&ct=clnk&gl=ec>
- Carvajal, C. (2019). Especies reactivas del oxígeno: Formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1), 91-100.

- Cayon, A. (2020a, enero 24). *OPS/OMS / Día Mundial contra el Cáncer 2020*: Pan American Health Organization / World Health Organization. https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=15687:world-cancer-day-2020-i-am-and-i-will&Itemid=39809&lang=es
- Cayon, A. (2020b, febrero 6). *OPS/OMS / Perfiles de país sobre cáncer, 2020*. Pan American Health Organization / World Health Organization. https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=15716:country-cancer-profiles-2020&Itemid=72576&lang=es
- Cruz, A., Cruz, S., Gaitan, I., & Cáceres, A. (2005). Evaluación de la actividad biocida e identificación química de valepotriatos en cuatro especies reconocidas popularmente en Guatemala como Valeriana. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia*, 3(1), 9.
- Dreher, D., & Junod, A. F. (1996). Role of oxygen free radicals in cancer development. *European Journal of Cancer*, 32(1), 30-38. [https://doi.org/10.1016/0959-8049\(95\)00531-5](https://doi.org/10.1016/0959-8049(95)00531-5)
- Fuchs-Tarlovsky, T., Bejarano, M., Gutiérrez, M., Casillas, J., López, J., & Ceballos, G. (2011). Efecto de la suplementación con antioxidantes sobre el estrés oxidativo y la calidad de vida durante el tratamiento oncológico en pacientes con cáncer cérvico uterino. *NUTRICION HOSPITALARIA*, 4, 819-826. <https://doi.org/10.3305/nh.2011.26.4.4894>
- Gilkes, D. M., & Semenza, G. (2013). Role of hypoxia-inducible factors in breast cancer metastasis. *Future oncology (London, England)*, 9(11), 1623-1636. <https://doi.org/10.2217/fon.13.92>

- Hergueta-Redondo, M., Palacios, J., Cano, A., & Moreno-Bueno, G. (2008). “New” molecular taxonomy in breast cancer. *Clinical and Translational Oncology*, 10(12), 777-785. <https://doi.org/10.1007/s12094-008-0290-x>
- Hernández Espinosa, D. R., Barrera Morín, V., Briz Tena, O., González Herrera, E. A., Laguna Maldonado, K. D., Jardinez Díaz, A. S., Sánchez Olivares, M., & Matuz Mares, D. (2019). El papel de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en algunas enfermedades neurodegenerativas. *Revista de la Facultad de Medicina*, 62(3), 6-19. <https://doi.org/10.22201/fm.24484865e.2019.62.3.03>
- Hristozov, D., Gadjeva, V., Vlaykova, T., & Dimitrov, G. (2001). *Evaluation of Oxidative Stress in Patients with Cancer*. 6.
- International Agency for Research on Cancer. (2018). *Breast Cancer Awareness*. <https://iarc.fr/featured-news/breast-cancer-awareness-month-2020/>
- Jomova, K., & Valko, M. (2011). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 283(2-3), 65-87. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.03.001>
- Klaunig, J. (2020). *Carcinogenesis* (pp. 97-110). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813602-7.00008-9>
- Kroemer, G., & Pouyssegur, J. (2008). Tumor cell metabolism: Cancer’s Achilles’ heel. *Cancer Cell*, 13(6), 472-482. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.05.005>
- Kutschker, A. (2011). Revisión del género Valeriana (Valerianaceae) en Sudamérica austral. *Gayana. Botánica*, 68(2), 244-296. <https://doi.org/10.4067/S0717-66432011000200016>
- Li, X., Lewis, M. T., Huang, J., Gutierrez, C., Osborne, C. K., Wu, M.-F., Hilsenbeck, S. G., Pavlick, A., Zhang, X., Chamness, G. C., Wong, H., Rosen, J., & Chang,

- J. C. (2008). Intrinsic Resistance of Tumorigenic Breast Cancer Cells to Chemotherapy. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 100(9), 672-679. <https://doi.org/10.1093/jnci/djn123>
- Li, Xiaoguang, Chen, T., Lin, S., Zhao, J., Chen, P., Ba, Q., Guo, H., Liu, Y., Li, J., Chu, R., Shan, L., Zhang, W., & Wang, H. (2013). Valeriana jatamansi Constituent IVHD-valtrate As a Novel Therapeutic Agent to Human Ovarian Cancer: In vitro and in vivo Activities and Mechanisms. *Current Cancer Drug Targets*, 13(4), 472-483.
- Lin, S., Fu, P., Chen, T., Ye, J., Su, Y.-Q., Yang, X.-W., Zhang, Z.-X., & Zhang, W.-D. (2015). Minor Valepotriates from Valeriana jatamansi and Their Cytotoxicity against Metastatic Prostate Cancer Cells. *Planta Medica*, 81(1), 56-61. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1383369>
- Liu, Z., Semenza, G. L., & Zhang, H. (2015). *Factor 1 inducible por hipoxia y metástasis de cáncer de mama*. 12.
- Lopes, C. M., Dourado, A., & Oliveira, R. (2017). Phytotherapy and Nutritional Supplements on Breast Cancer. *BioMed Research International*, 2017, 1-42. <https://doi.org/10.1155/2017/7207983>
- Loraine, S., Mendoza, A., & Loraine, S. (2010). *Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México*. 11.
- Molecular Probes. (2003). *Griess Reagent Kit for Nitrite Determination*. 3.
- Montero, M. (1996). Los Radicales Libres y las Defensas Antioxidantes. Revisión. *Anales de la Facultad de Medicina*, 57(4), 278-281.
- Mostacero, J. (2005). *Características edafoclimática y fitogeográficas de las plantas* [Universidad Nacional de Trujillo].

https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/08/910778/caracteristicas-edafoclimaticas-y-fitogeograficas-de-las-planta_q3nqJ1S.pdf

- Movafagh, S., Crook, S., & Vo, K. (2015). Regulation of Hypoxia-Inducible Factor-1a by Reactive Oxygen Species: New Developments in an Old Debate. *Journal of Cellular Biochemistry*, 116(5), 696-703. <https://doi.org/10.1002/jcb.25074>
- Naranjo, P. (2010). *Etnomedicina y Etnobotánica: Avances en la Investigación*.
- Ochoa Pacheco, A., Marin Moran, J., Rivero Breff, D., & Aguilera Saborít, E. M. (2013). Caracterización física, físico-química y química de extractos totales de hojas frescas de *Petiveria alliacea* L. con acción antimicrobiana. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 44(1), 52-59.
- OMS. (2018). *Cáncer*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- OPS/OMS. (2020). *Cancer Country Profile 2020*. https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=4-cancer-country-profiles-2020&alias=51546-ecuador-country-profile-2020&Itemid=270&lang=es
- Pérez-Alonso, N., & Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. *Bioteología Vegetal*, 11(4), Article 4. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/255>
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11-26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
- Pourahmad, J., Salimi, A., & Seydi, E. (2016). Role of Oxygen Free Radicals in Cancer Development and Treatment. En R. Ahmad (Ed.), *Free Radicals and Diseases*. InTech. <https://doi.org/10.5772/64787>

- Ríos-Arrabal, S., Artacho-Cordón, F., León, J., Román-Marinetto, E., del Mar Salinas-Asensio, M., Calvente, I., & Núñez, M. I. (2013). Involvement of free radicals in breast cancer. *SpringerPlus*, 2(1), 404. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-404>
- Rodríguez Aguirre, O. E., Andrade Barreiro, W. A., Andrade Barreiro, W. A., Diaz Lopez, F. E., & Diaz Lopez, F. E. (2016). Actividad antioxidante de extractos de hojas de *Bocconia frutescens* L. (Papaveraceae). *Revista de Tecnología*, 14(2). <https://doi.org/10.18270/rt.v14i2.1868>
- Sudati, J. H., Fachinetto, R., Pereira, R. P., Boligon, A. A., Athayde, M. L., Soares, F. A., de Vargas Barbosa, N. B., & Rocha, J. B. T. (2009). In vitro Antioxidant Activity of *Valeriana officinalis* Against Different Neurotoxic Agents. *Neurochemical Research*, 34(8), 1372-1379. <https://doi.org/10.1007/s11064-009-9917-8>
- Tafurth, O. (2000). *Factores que influyen en el rendimiento y eficiencias para la extracción de aceites de palmiste.*
- Tenorio, L., Valle, M., & Pastelín, H. (2005). *57936106.pdf*. 36, 31-41.
- Tian, S., Wang, Z., Wu, Z., Wei, Y., Yang, B., & Lou, S. (2020). Valtrate from *Valeriana jatamansi* Jones induces apoptosis and inhibits migration of human breast cancer cells in vitro. *Natural Product Research*, 34(18), 2660-2663. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1548454>
- Ulloa, C., & León, M. (2015). *TAXONOMÍA – CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE ESPECIES VEGETALES*. <https://taxonomiabioblog.ups.edu.ec/valeriana-taxonomia/>

Vanini, M., Barbieri, R. L., Heck, R. M., & Schwartz, E. (2011). Uso de plantas medicinales por pacientes oncológicos y familiares en un centro de radioterapia. *Enfermería Global*, 10(21), 0-0.

Winship Cancer Institute. (2020). *Metabolism*. CancerQuest.

<https://www.cancerquest.org/cancer-biology/cancer-metabolism>

ANEXOS

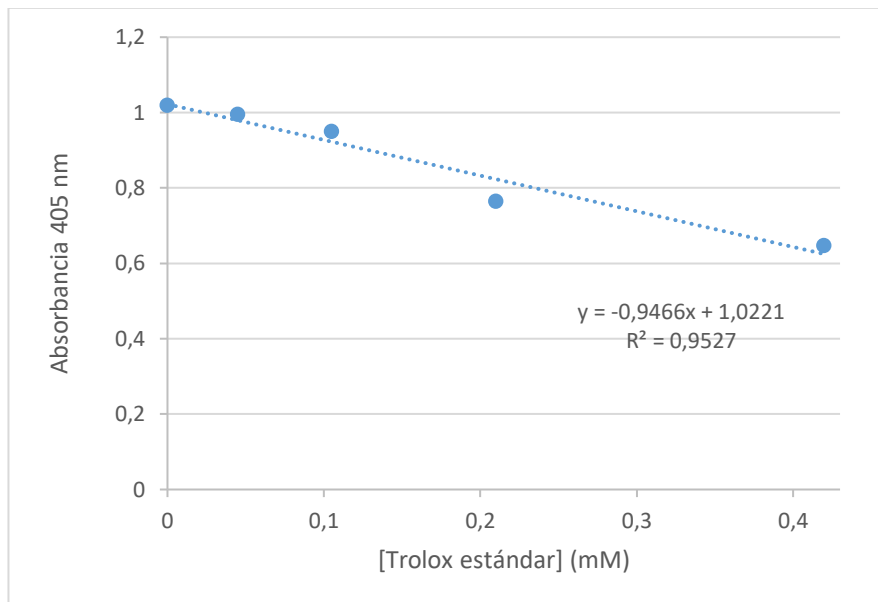
Anexo 1 Anova del método de TROLOX (capacidad antioxidante): Análisis estadístico entre la media y desviación estándar de los diferentes tratamientos

Tratamientos	Media	Desviación estándar
Control	0,235	0,05371
Valeriana decussata Hojas/Tallos	0,24816066767	0,06192
Valeriana decussata Raíz	0,13983333333	0,03750
Valeriana rígida Hojas/Tallos	0,2025	0,03095
Valeriana rígida raíz	0,12033333333	0,002251

Anexo3 Anova del método de Griess (óxido Nítrico): Análisis estadístico entre la media y desviación estándar de los diferentes tratamientos

Tratamientos	Media	Desviación estándar
Control	84,160166	7,753
Valeriana decussata Hojas/Tallos	146,008	2,439
Valeriana decussata Raíz	155,6066	10,775
Valeriana rígida raíz	138,8603	2,710
Valeriana rígida Hojas/Tallos	192,0535	50,948

Anexo 4 Curva Estándar de TROLOX

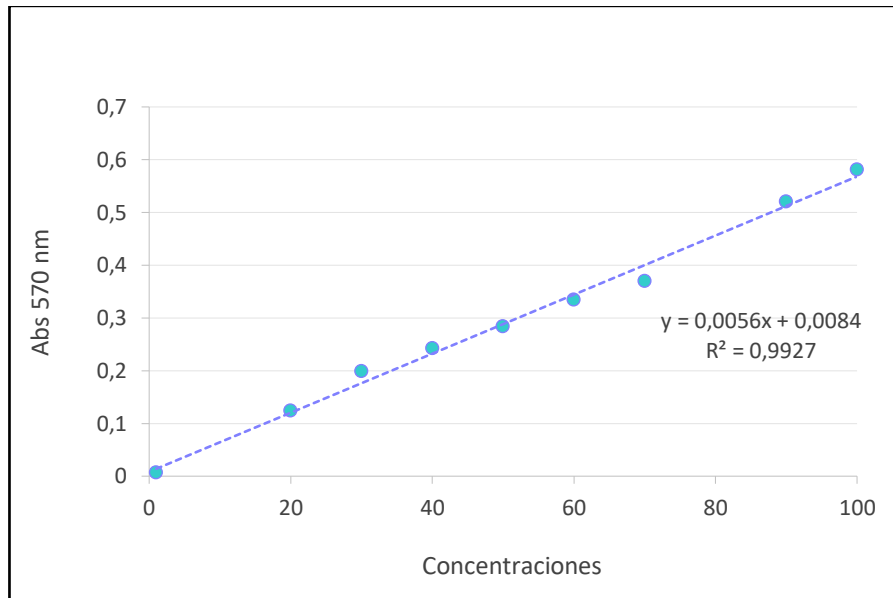


Anexo 5 Resultados de las absorbancias para el método Griess Primera lectura

Primera lectura	Abs 405	[] mM Trolox	[] promedio
Control Danny	0,848	0,184	0,186
Decussata H/T	0,842	0,190	0,192
Decussata Raíz	0,858	0,173	0,174
Rígida H/T	0,858	0,173	0,174
Rígida Raíz	0,910	0,118	0,120

Segunda lectura	Abs 405 nm	[] mM Trolox
Control	0,752	0,286
Decussata H/T	0,731	0,307
Decussata Raíz	0,925	0,102
Rígida H/T	0,800	0,234
Rígida Raíz	0,905	0,123

Anexo 6 Curva estándar de Griess



Anexo 7 Lecturas de las concentraciones de NO

Primer ensayo	Concentración Promedio	Concentración primera lectura	Concentración segunda lectura
Blanco	5,107	5,107	5,107
Control	91,236	91,413	91,060
Decussata H/T	144,520	144,799	144,242
Decussata Raíz	145,841	146,644	145,039
Rígida H/T	145,551	145,822	145,280
Rígida Raíz	137,589	138,371	136,807

Anexo 8 Cultivo celular- Confluencia celular



Anexo 9 Método de Griess



Anexo 10 Actividad Antioxidante por el Método de TROLOX

