

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



ANÁLISIS DEL EFECTO CITOTÓXICO *in vitro* DE EXTRACTOS DE *Acalypha monostachya* SOBRE LÍNEAS CELULARES TUMORALES HUMANAS

Por:

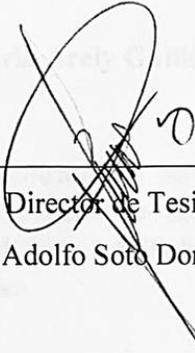
Q.B.P. GLORIA ARELY GUILLÉN MELÉNDEZ

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Orientación
en Morfología.**

Junio, 2021

ANÁLISIS DEL EFECTO CITOTÓXICO *in vitro* DE EXTRACTOS DE *Acalypha monostachya* SOBRE LÍNEAS CELULARES TUMORALES HUMANAS.

Aprobación de tesis:



Director de Tesis

Dr. C. Adolfo Soto Domínguez



Co-Directora de Tesis

Dra. C. María de Jesús Loera Arias



Comisión de Tesis

Dra. C. Sheila Adela Villa Cedillo



Subdirector de Estudios de Posgrado

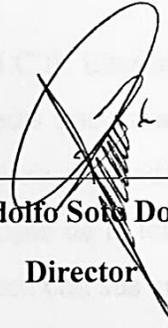
Dr. med. Felipe Arturo Martínez Morales

“Análisis del efecto citotóxico *in vitro* de extractos de *Acalypha monostachya* sobre líneas celulares tumorales humanas”

Presentado por

Q.B.P. Gloria Arely Guillén Meléndez

Este trabajo se realizó en los Laboratorios de Biología Celular y Molecular del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Adolfo Soto Domínguez y la co-dirección de la Dra. María de Jesús Loera Arias.



Dr. C. Adolfo Soto Domínguez

Director



Dr. C. María de Jesús Loera Arias

Co-Director

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Sra. Gloria Meléndez Jaime y Sr. Armando Guillén Aguilar, que me brindaron su apoyo y amor en los buenos y malos momentos presentes durante la realización de este proyecto, que con sus palabras y acciones me inspiraron a seguir y no rendirme, de igual manera a toda mi familia.

A las personas que contribuyeron a la realización de este trabajo, que incluyen a mi comisión de tesis: A mi director, el Dr. Adolfo Soto Domínguez, a la Dra. María de Jesús Loera Arias y a la Dra. Sheila Adela Villa Cedillo por brindarme el apoyo necesario, por la paciencia, enseñanzas y resolución de toda duda en el desarrollo del proyecto. Así mismo al Dr. Raymundo Alejandro Pérez Hernández, al Dr. Uziel Castillo Velázquez y al Dr. Andrés Eduardo Estrada Castellón por sus valiosas aportaciones a lo largo de la investigación.

A mis compañeros de maestría, el M.C.P. Emmanuel González y los Q.C.B. Vanessa Gutiérrez y Carlos Cruz por tantas cosas que pasamos juntos antes de que empezara la pandemia, juntos siempre supimos cómo salir adelante. A mis amigos que estuvieron presentes durante buena parte del proceso de la tesis, mis roomies los M.C.P. Ulises de León y Ana Duarte y a Christian Gómez con sus críticas sobre todo constructivas, horas de buen chismecito y como siempre, las risas nunca faltaron. Así mismo a todos mis compañeros del Departamento de Histología, que siempre estuvieron dispuestos a ayudarme en cualquier cosa.

Fue una etapa muy importante, en la que gracias a todos los altibajos que se presentaron durante estos dos años, no sabría de lo que soy capaz y no sabría qué cosas son realmente importantes en la vida y de lo que quiero para el futuro. Siempre se puede salir adelante incluso en tiempos de pandemia, esto es el claro ejemplo. Perseverancia. Gracias de todo corazón a todos los que estuvieron presentes.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, a la Facultad de Medicina, UANL, Departamento de Histología y a la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, Departamento de Química, Laboratorio de Química Analítica y Facultad de Ciencias Forestales.

AGRADECIMIENTO AL CONACYT

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haberme otorgado una beca para realizar mis estudios de Maestría. Gracias por brindarme el apoyo económico, registrado con el número de beca 1006252.

RESUMEN

Q.B.P. Gloria Arely Guillén Meléndez
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Fecha de titulación: Junio 2021

Título del estudio: Análisis del efecto citotóxico *in vitro* de extractos de *Acalypha monostachya* sobre líneas celulares tumorales humanas.

**Candidata para obtener el grado de Maestría
en Ciencias con Orientación en Morfología.**

Número de páginas: 79

Área de estudio: Morfología

Propósito y Método del Estudio.

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo, por lo que, en la actualidad, continúa la búsqueda de alternativas a los tratamientos comúnmente utilizados contra el cáncer. Entre las alternativas que se han estado desarrollando en los últimos años, se encuentra el uso de plantas medicinales como agentes terapéuticos. *Acalypha monostachya* (*A. monostachya*) es una planta utilizada en la medicina tradicional como tratamiento contra el cáncer, sin embargo, su efecto no se encuentra validado científicamente, por lo que se realizó este estudio en el que se obtuvieron 3 extractos de *A. monostachya* con el propósito de analizar el efecto citotóxico *in vitro* que poseen sobre líneas celulares tumorales humanas (cáncer de mama y cáncer cérvico-uterino). Se les realizó un tamizaje fitoquímico parcial para obtener resultados preliminares de los grupos de compuestos presentes en la planta, posteriormente se evaluó su efecto citotóxico y se analizó la viabilidad y cambios morfológicos en las células tratadas, se compararon los resultados con células no tratadas y con una línea celular control no tumoral.

Conclusiones y contribuciones.

Se obtuvieron los extractos acuoso, metanólico y hexánico de *A. monostachya*, y se detectó la presencia de compuestos fenólicos de tipo flavonoide, a los cuales se les atribuye efecto antineoplásico. Se observó una toxicidad selectiva hacia las células tumorales humanas dependiente de tiempo y de concentración, siendo los extractos metanólico y hexánico los que presentaron mayor efecto citotóxico a las concentraciones mínimas utilizadas, comparados con el extracto acuoso que mostró este efecto a las concentraciones más altas. Se demostró que los 3 extractos inducen cambios morfológicos significativos en las células tumorales. Además de la toxicidad selectiva, se observaron más cambios morfológicos en las células HeLa al ser expuestas a los extractos, en comparación con las células MDA-MB-231. En conclusión, se demostró el efecto citotóxico de los extractos en las células tumorales. Los datos obtenidos representan la base de una investigación que se orienta a obtener una alternativa a los tratamientos que son utilizados en la actualidad contra el cáncer.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	3
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	6
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1 CÁNCER	8
1.1.1 Epidemiología	8
1.1.2 Tratamiento	8
1.2 MEDICINA TRADICIONAL	9
1.2.1 Género <i>Acalypha</i>	9
1.2.2 <i>Acalypha monostachya</i>	11
1.2.3 Actividad citotóxica y anticáncer del género <i>Acalypha</i>	11
2. JUSTIFICACIÓN	14
3. HIPÓTESIS DE TRABAJO	15
4. OBJETIVO GENERAL	15
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
6. MATERIALES Y MÉTODOS	16
6.1 MATERIALES	16
6.1.1. Equipos utilizados	16
6.1.2. Reactivos y materiales de laboratorio utilizados.....	16
6.2 MÉTODOS	18
6.2.1 Material vegetal.....	18
6.2.2 Colecta del material vegetal	18
6.2.3 Obtención del extracto	18
6.2.4 Caracterización parcial (Tamizaje fitoquímico parcial).....	19

6.2.5 Líneas celulares	22
6.2.6 Preparación de las soluciones de trabajo.....	23
6.2.7 Ensayo de citotoxicidad con MTT	24
6.2.8 Ensayo de marcaje de núcleos con DAPI	24
6.2.9 Análisis morfológico.....	25
6.2.10 Análisis estadístico.....	26
7. RESULTADOS.....	27
7.1 Identificación taxonómica de la planta en estudio	27
7.2 Rendimiento de los extractos	27
7.3 Caracterización parcial (análisis fitoquímico cualitativo).....	28
7.4 Los extractos de <i>A. monostachya</i> inducen cambios morfológicos en cultivo de células tumorales humanas.....	32
7.5 Los extractos de <i>A. monostachya</i> inducen cambios en la morfología nuclear de células tumorales humanas.....	40
7.6 Los extractos de <i>A. monostachya</i> disminuyen el porcentaje de viabilidad relativa en células tumorales humanas.....	51
7.7 Las células tumorales humanas presentan más alteraciones morfológicas y nucleares frente a la exposición a los extractos de <i>A. monostachya</i>	55
8. DISCUSIÓN	58
9. CONCLUSIONES	63
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
ANEXOS	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 *Acalypha monostachya*

Figura 1.2 Actividad anticáncer de *Acalypha indica* mediante el ensayo de resazurina (Saansera et al., 2012).

Figura 1.3 Porcentaje de citotoxicidad del extracto acuoso y metanólico de *Acalypha fruticosa* en células MDA-MB-231 y Hep3B (Rajkumar, 2010).

Figura 1.4 Efecto antiproliferativo del extracto metanólico de *Acalypha californica* en líneas celulares.

Figura 7.1 *Acalypha monostachya* en el sitio de colecta.

Figura 7.2 Tamizaje fitoquímico parcial de los extractos crudos de la parte aérea de *A. monostachya*.

Figura 7.3 Tamizaje fitoquímico parcial de los extractos crudos de la parte aérea de *A. monostachya*.

Figura 7.4 Células tratadas por 12 h con 10 µg/ml de extractos de *A. monostachya*.

Figura 7.5 Células tratadas por 12 h con 500 µg/ml de extractos de *A. monostachya*.

Figura 7.6 Células tratadas por 24 h con 10 µg/ml de extractos de *A. monostachya*.

Figura 7.7 Células tratadas por 24 h con 500 µg/ml de extractos de *A. monostachya*.

Figura 7.8 Células tratadas por 48 h con 10 µg/ml de extractos de *A. monostachya*.

Figura 7.9 Células tratadas por 48 h con 500 µg/ml de extractos de *A. monostachya*.

Figura 7.10 Células tratadas por 72 h con 10 µg/ml de extractos de *A. monostachya*.

Figura 7.11 Células tratadas por 72 h con 500 µg/ml de extractos de *A. monostachya*.

Figura 7.12 Marcaje de núcleos con DAPI en células tratadas por 12 h. con 10 µg/ml de extractos de *A. monostachya*.

Figura 7.13 Marcaje de núcleos con DAPI en células tratadas por 12 h. con 500 µg/ml de extractos de *A. monostachya*.

Figura 7.14 Marcaje de núcleos con DAPI en células tratadas por 24 h. con 10 µg/ml de extractos de *A. monostachya*.

Figura 7.15 Marcaje de núcleos con DAPI en células tratadas por 24 h. con 500 µg/ml de extractos de *A. monostachya*.

Figura 7.16 Análisis cuantitativo de marcaje de núcleos con DAPI en células tratadas por 12 y 24 h con extractos de *A. monostachya*

Figura 7.17 Marcaje de núcleos con DAPI en células tratadas por 48 h. con 10 µg/ml de extractos de *A. monostachya*.

Figura 7.18 Marcaje de núcleos con DAPI en células tratadas por 48 h. con 500 µg/ml de extractos de *A. monostachya*.

Figura 7.19 Marcaje de núcleos con DAPI en células tratadas por 72 h. con 10 µg/ml de extractos de *A. monostachya*.

Figura 7.20 Marcaje de núcleos con DAPI en células tratadas por 72 h. con 500 µg/ml de extractos de *A. monostachya*.

Figura 7.21 Análisis cuantitativo de marcaje de núcleos con DAPI en células tratadas por 12 y 24 h con extractos de *A. monostachya*

Figura 7.22 Comportamiento celular frente a diferentes concentraciones de extractos de *A. monostachya*, mediante marcaje de núcleos con DAPI.

Figura 7.23 Análisis de citotoxicidad por ensayo de MTT en células tratadas por 12 y 24 h con extractos de *A. monostachya*.

Figura 7.24 Análisis de citotoxicidad por ensayo de MTT en células tratadas por 48 y 72 h con extractos de *A. monostachya*.

Figura 7.25 Comportamiento celular frente a diferentes concentraciones de extractos de *A. monostachya*, mediante ensayo de MTT.

Figura 7.26 Evaluación de cambios morfológicos en cortes semifinos teñidos con azul de toluidina obtenidos a partir de células tratadas por 24 h con extractos de *A. monostachya*.

Figura 7.27 Evaluación de cambios morfológicos en cortes semifinos teñidos con azul de toluidina obtenidos a partir de células tratadas por 24 h con extractos de *A. monostachya*.

Figura 7.28 No. de células con alteraciones morfológicas relacionadas con muerte celular después de la exposición a tratamientos con extractos de *A. monostachya*.

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

μg : Microgramos

μl : Microlitros

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ATCC: America Type Culture Collection

$\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$: Nitrato de bismuto

CH_2O : Formaldehído

CH_3COOH : Ácido acético glacial

CO_2 : Dióxido de carbono

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DE: Desviación estándar

DMSO: Dimetilsulfóxido

EA: Extracto acuoso

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

EH: Extracto hexánico

EM: Extracto metanólico

FCB: Facultad de Ciencias Biológicas

FeCl_3 : Cloruro de fierro

h: horas

H_2SO_4 : Ácido sulfúrico

HCl: Ácido clorhídrico

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

KI: Yoduro de potasio

KMnO₄: Permanganato de potasio

min: minutos

ml: Mililitros

MnO₂: Dióxido de manganeso

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

NaOH: Hidróxido de sodio

NIH: Instituto Nacional del Cáncer

nm: Nanómetros

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBS: Tampón fosfato salino

RPM: Revoluciones por minuto

seg: segundos

TA: Temperatura ambiente

TBST: Solución Salina Tamponada con Tris y Tween 20

TGF α : Factor de crecimiento transformante alfa

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CÁNCER

1.1.1 Epidemiología

De acuerdo con el Instituto Nacional del Cáncer (NIH, por sus siglas en inglés) (2015), el cáncer se define como: “Nombre de las enfermedades en las que hay células anormales que se multiplican sin control y pueden invadir los tejidos cercanos”. Por otra parte, la OMS (2021) lo define como: “Un proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células que puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo.”

En el 2020, se presentaron 19, 292,789 de casos de cáncer en el mundo de los cuales, 9,958, 133 representaron muertes por esta patología. Entre los tipos de cáncer más comunes a nivel mundial, se encuentran el cáncer de mama, el cáncer de pulmón, el cáncer colorrectal y el cáncer de próstata con una incidencia de 11.7%, 11.4%, 10%, 7.3% y una mortalidad de 18%, 6.9%, 9.4% y 3.8% respectivamente (Globocan, 2020).

En América Latina y el Caribe la incidencia de cáncer en ambos sexos en el año 2020 fue de 1; 470, 274 casos y una mortalidad de 713, 414 siendo los tipos de cáncer más comunes, el cáncer de próstata, de mama, colorrectal y pulmón, con una incidencia de 14.6%, 14.3%, 9.2% y 6.6% respectivamente (Globocan, 2020).

En México, se presentaron 195, 499 nuevos casos y 90, 222 muertes hasta el año 2020, de los cuales el más común es el cáncer de mama que representa el 15.3% de los casos, seguido del cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides y cáncer cérvico-uterino con un 13.7%, 7.6%, 5.7% y 4.8% de incidencia, respectivamente (Globocan, 2020).

1.1.2 Tratamiento

Existen múltiples tratamientos para el cáncer dependiendo del tipo y de la etapa en la que se encuentre el cáncer. Los métodos más comunes son la cirugía, la radioterapia, la quimioterapia, inmunoterapia, terapia dirigida, terapia hormonal, trasplante de células madre y medicina de precisión (NIH, 2020).

1.2 MEDICINA TRADICIONAL

Desde hace siglos, el humano ha dependido de los recursos vegetales que brinda la naturaleza para sus necesidades básicas como la producción de alimentos, fabricación de ropa, fragancias, ornamentos y entre las tantas aplicaciones que se les dan, el uso medicinal. Estos conocimientos se han transmitido de generación en generación y los conocimientos han evolucionado a base de observaciones, experiencia y experimentos de prueba y error. Una de las ventajas que posee el uso de plantas medicinales es la disponibilidad, además de que son culturalmente aceptables, las cuales son utilizadas comúnmente por las poblaciones indígenas por estas cualidades (Karunamoorthi et al., 2012). La OMS define la medicina tradicional como: “Todo el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales”, la cual utiliza distintas partes de las plantas o la planta completa con el fin de tratar enfermedades (OMS, 2021).

1.2.1 Género *Acalypha*

Acalypha es el cuarto género más grande de la familia Euphorbiaceae con aproximadamente 450 a 570 especies. Muchas de estas especies son utilizadas como plantas medicinales principalmente en África y en Las islas Mascareñas. Comúnmente es utilizada la planta completa incluyendo las hojas, tallos y raíces como remedios tradicionales (Seebaluck et al., 2015).

Las hojas de las especies de *Acalypha* son suculentas con tallos de savia, las cuales tienden a caerse con la edad. Son alternas, pecioladas o subsésiles y poseen una lámina entera, crenada o dentada. Las flores estaminadas tienen de 4 a 8 estambres y anteras vermiformes. Las flores pistiladas son a menudo prominentemente brácteas con 3 sépalos, 3 carpelos y 1 óvulo por carpelo y estilos divididos. Varias especies de *Acalypha* comparten la característica de las flores y los frutos pistilados alomórficos (Soladoye et al., 2008).



Figura 1.1 *Acalypha monostachya*

La mayoría de las especies de *Acalypha* se usan como plantas medicinales en África Occidental y Oriental, especialmente en Nigeria. Cada parte de la planta, incluidas la hoja, el tallo y las raíces, se utilizan para hacer mezclas y decocciones para tratar diversos padecimientos. Especies de *Acalypha* como *A. wilkesiana* Müll. Arg., *A. communis* Müll. Arg. y *A. indica* L se utilizan en medicina popular como diuréticos, antihelmínticos y para problemas respiratorios como bronquitis, asma y neumonía (Emeka et al., 2012). *A. wilkesiana*, *A. indica* y *A. hispida* Burm.f. son especies comunes que se encuentran en Mauricio (Gurib-Fakim y Guého, 1996). La población local de Mauricio utiliza hojas y plantas enteras de *A. indica* contra infecciones de la piel como sarna y dermatitis. *A. wilkesiana* se usa para controlar la diabetes, la disentería y el asma. *A. integrifolia* se usa como astringente, purgante y para eliminar las lombrices intestinales, así como para curar diversas infecciones de la piel (Gurib y Guého, 1996; Gurib Fakim y Brendler, 2004).

1.2.2 *Acalypha monostachya*

Esta especie es una hierba perenne que se encuentra desde el suroeste de los Estados Unidos hasta México. Es utilizada como planta medicinal por los habitantes de San Rafael y Zapotitlán Salinas, Puebla, México contra erupciones cutáneas, heridas y diarrea. En el norte de México, se localiza en Bustamante, Nuevo León y es comúnmente llamada “Hierba del Cáncer” y se utiliza como infusión al hervir las hojas e inflorescencias, también es utilizada en conjunto con *Bougainvillea glabra* para el tratamiento de cólicos y tumores externos (Estrada et al., 2018).

Se ha descrito un estudio en el que el extracto metanólico de *A. monostachya* mostró actividades antimicrobianas y antioxidantes, así como toxicidad contra *A. salina* (Canales et al., 2011). Maiti et al. (2016) evaluaron la presencia de micro y macronutrientes en *A. monostachya* y concluyeron que contiene grandes cantidades de Mg^{+2} , Fe^{+3} y Zn^{+2} recomendando analizar su potencial antioxidante.

Macías et al. (2009) realizaron un tamizaje fitoquímico, así como pruebas de efecto antimicrobiano obteniendo como resultado que el extracto acuoso de *A. monostachya* contiene carbohidratos y flavonoides, y actividad antimicrobiana contra *Pseudomonas aureginosa* y *Staphylococcus aureus*. En el caso del extracto etanólico se obtuvo positividad para flavonoides y terpenos y actividad antimicrobiana contra las bacterias mencionadas anteriormente y contra *Escherichia coli*.

1.2.3 Actividad citotóxica y anticáncer del género *Acalypha*

Sanseera et al. (2012) evaluaron la actividad anticáncer de los extractos metanólico, hexánico y de cloroformo de *A. indica*. Estos extractos no fueron citotóxicos para células Vero y presentaron actividad anticáncer contra células NCIH187. Así mismo, se purificó L-quebrachitol del extracto, el cual fue caracterizado por RMN.

Table 2. Anticancer activities of the methanol extract of *A. indica* L.

Cancer cell lines	IC ₅₀ (µg/mL)		
	Methanol extract	Ellipticine	Doxorubicin
KB-oral cavity cancer	Inactive	0.62	0.16
MCF7-breast cancer	Inactive	-	0.85
NCI-H187-small cell lung cancer	25.00	0.88	0.05

Note: Ellipticine and doxorubicin were used as positive controls; 0.5% DMSO was used as negative control. IC₅₀ > 50 = Inactive.

Figura 1.2 Actividad anticáncer de *Acalypha indica* mediante el ensayo de resazurina (Saansera et al., 2012).

Rajkumar et al. (2010) demostraron un moderado efecto citotóxico del extracto acuoso de *A. fruticosa* que inhibió la proliferación de células MDA-MB-435S y Hep3B, además de que se presentó protección del DNA contra daño oxidativo inducido con H₂O₂.

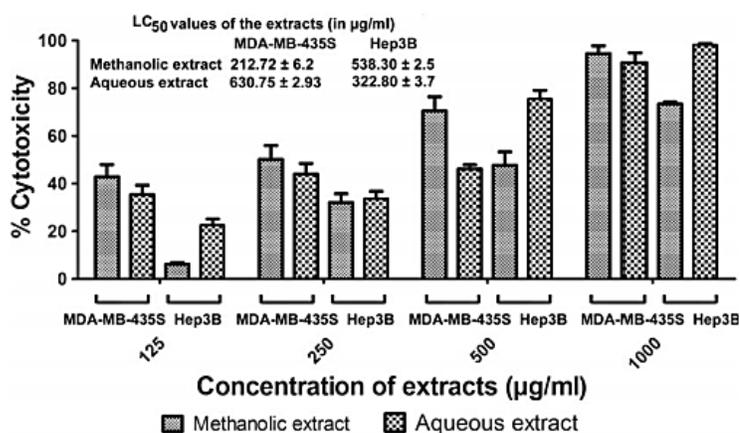


Figura 1.3 Porcentaje de citotoxicidad del extracto acuoso y metanólico de *Acalypha fruticosa* en células MDA-MB-231 y Hep3B (Rajkumar, 2010).

Lim et al. (2011) demostraron un efecto anti-proliferativo significativo de *A. wilkesiana* en células U87MG, A549 y MCR5 con su extracto de acetato de etilo. Así mismo realizaron un estudio morfológico con la tinción de rutina Hematoxilina y Eosina confirmando daño por apoptosis y al DNA. Chu (2014) evaluó el efecto de inhibición de crecimiento en células de MDA-MB-468 y MCR5 utilizando extracto etanólico de *A. wilkesiana*. Abubakar et al. (2018) demostraron potentes efectos antiproliferativos en células A549 y U87MG utilizando extracto de acetato de etilo combinado con tratamientos de β, γ y δ tocotrienoles de *A. wilkesiana*. El-Raey et al. (2016) realizaron estudios para

demostrar actividad citotóxica en células HepG2 y MCF7 utilizando extracto etanólico y fracciones de *A. wilkesiana* mostrando un 75.8% y 87.1% de inhibición, respectivamente. De igual manera se obtuvo actividad antioxidante realizando la prueba de DPPH.

Rascón-Valenzuela et al. (2015) demostró la actividad anti-proliferativa del extracto metanólico y fracciones de *A. californica* en células RAW 264.7. La fracción hexánica en particular, inhibió RAW 264.7, HeLa y L929. Esta fracción fue analizada mediante cromatografía de exclusión molecular obteniendo terpenos y esteroides y su fracción residual contiene taninos. Por HPLC se demostró la presencia del compuesto β -sitosterol y sigmasterol.

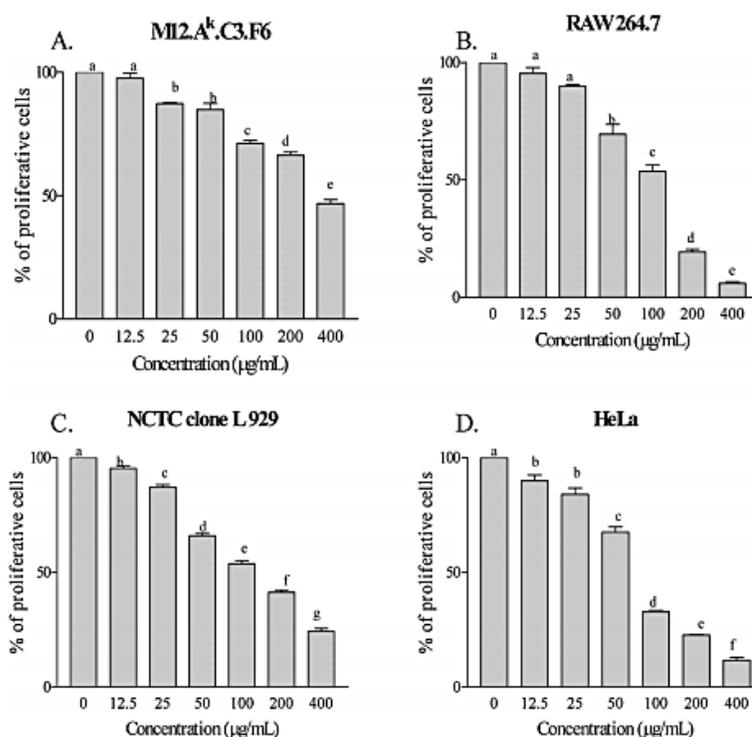


Figura 1.4 Efecto antiproliferativo del extracto metanólico de *Acalypha californica* en líneas celulares. Ensayos de proliferación MTT en células M12.Ak.C3.F6 (A), RAW 264.7 (B), NCTC clone L 929 (C) y HeLa (D) tratadas con diferentes concentraciones del extracto por 48 horas.

2. JUSTIFICACIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo, millones de pacientes son diagnosticados cada año y un gran porcentaje muere a causa de esta enfermedad, por lo que la investigación en el campo de nuevas terapias que presenten mayor eficacia está en continuo desarrollo.

En la actualidad, el uso de plantas medicinales como agentes terapéuticos se encuentra ampliamente extendido. *Acalypha monostachya* es una planta utilizada en la medicina tradicional como tratamiento contra el cáncer, sin embargo, su efecto no se encuentra validado científicamente. Por esta razón, es de nuestro interés analizar si esta planta posee un efecto antineoplásico sobre líneas celulares tumorales humanas, específicamente sobre 2 de los tipos de cáncer más frecuentes que afectan a las mujeres, en México y en el mundo, el cáncer de mama y cáncer cérvico-uterino.

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Los extractos de *Acalypha monostachya* poseen efecto citotóxico sobre células tumorales humanas.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto citotóxico de extractos de *Acalypha monostachya* en células tumorales humanas.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar los extractos acuoso, metanólico y hexánico de *Acalypha monostachya*.
2. Determinar si los extractos acuoso, metanólico y hexánico de *Acalypha monostachya* muestran un efecto citotóxico en células tumorales humanas *in vitro*.
3. Analizar si los extractos acuoso, metanólico y hexánico de *Acalypha monostachya* inducen cambios morfológicos en células tumorales humanas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 MATERIALES

6.1.1. Equipos utilizados

- Cámara Infinity
- Centrifuga refrigerada para tubos cónicos
- Horno estufa
- Lector de microplacas para absorbancia iMark™
- Microscopio de fluorescencia, Leica DM1000
- Microscopio de luz, Nikon Eclipse 50i
- Molino manual para grano, Victoria
- Rotavapor, Yamato Scientific CO. LTD. RE 200
- Ultra-micrótomo

6.1.2. Reactivos y materiales de laboratorio utilizados

- 2-4-dinitrofenilhidracina
- 3-Propanol (Isopropanol), CTR Scientific®
- Acetona grado reactivo, CTR Scientific®
- Ácido acético glacial (CH₃COOH)
- Ácido clorhídrico concentrado (HCl) CTR Scientific®
- Ácido pícrico (C₆H₃N₃O₇), CTR Scientific®
- Ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄), CTR Scientific®
- Agua destilada
- Alcohol etílico (etanol), grado reactivo, CTR Scientific®
- Alfa-naftol
- Antibiótico/Antimicótico (100X): estreptomicina, anfotericina B y penicilina, Gibco®
- Azul de toluidina, Electron Microscopy Sciences®
- Azul tripano, Corning®
- Bicarbonato de sodio (NaHCO₃), CTR Scientific®

- Cloroformo, CTR Scientific[®]
- Cloruro de hierro (FeCl₃), CTR Scientific[®]
- DAPI
- Dimetilsulfóxido grado reactivo, Sigma-Aldrich[®]
- Filtro para jeringa de 0.22 μm de tamaño de poro, Corning[®]
- Formaldehído (CH₂O), CTR Scientific[®]
- Glutaraldehído 2.5%, Ted Pella Inc.[®]
- Hidróxido de sodio (NaOH)
- L-Glutamina, Gibco[®]
- Medio para cultivo celular, Advanced DMEM 1X, Gibco[®]
- Medio para cultivo celular, DMEM 1X, Gibco[®]
- Metanol, CTR Scientific[®]
- MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio], Sigma-Aldrich[®]
- n-Hexano, CTR Scientific[®]
- Nitrato de bismuto ((Bi(NO₃)₃))
- Nitrato de uranilo, Hoffman – Penther & Bosworth[®]
- Nonidet-P40, Probiotek[®]
- PBS 1X
- Permanganato de potasio (KMnO₄)
- Pissetas
- Resina Epóxica (Resin embeded-812, EMS[®])
- Suero fetal bovino para cultivo celular, Corning[®]
- TBST 1X
- Tetraóxido de osmio, Electron Microscopy Sciences[®]
- Tripsina 1X, Corning[®]
- Tubos Eppendorff 600 μl, 1.5 ml
- Tubos Falcon 15 ml y 50 ml, Corning[®]
- Yoduro de potasio (KI), CTR Scientific[®]

6.2 MÉTODOS

6.2.1 Material vegetal

Se utilizó la parte aérea de la planta *Acalypha monostachya* que comprende los tallos, hojas e inflorescencias.

Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Euphorbiales

Familia: Euphorbiaceae

Género: *Acalypha*

Especie: *monostachya*

6.2.2 Colecta del material vegetal

El sitio de colecta del material vegetal se llevó a cabo en la localidad de Zona Loma Larga Oriente ubicada en el municipio de San Pedro Garza García, Nuevo León (25°39'21.9''N, -100°20'07.3.14'' W) en el mes de noviembre. Posteriormente la planta fue identificada por el Dr. C. Marco Guzmán Lucio, se le asignó un No. de voucher y se almacenó un ejemplar en el herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

6.2.3 Obtención del extracto

El material vegetal fue secado a la sombra y a temperatura ambiente (TA) por 3 días y después triturado utilizando un molino manual para grano (Victoria). La extracción del material vegetal se llevó a cabo mediante maceración a TA (23 ± 2 °C) con agitación constante a 200 RPM durante 24 h en un matraz Erlenmeyer de 250 ml utilizando 20 g de planta y 400 ml de disolvente (agua destilada, metanol absoluto y n-hexano). Los extractos metanólico (EM) y hexánico (EH) fueron filtrados y concentrados mediante presión

reducida (150 mbar) en un rotavapor (Yamato Scientific CO. LTD. RE-200) a 45 °C por 35 minutos.

Para la obtención del extracto acuoso (EA) se realizó una infusión colocando el triturado de planta en el matraz, posteriormente se agregó el agua destilada a punto de ebullición y se agitó por 1 hora. Después de este tiempo, fue filtrado, esterilizado con un filtro para jeringa Corning® con un tamaño de poro de 0.22 µm y posteriormente fue sometido a evaporación en una incubadora por 3 días a 40 °C. Una vez eliminado el disolvente en su totalidad, se procedió a obtener el rendimiento del extracto utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento (\%p/p)} = \frac{PE}{PI} \times 100$$

Donde:

PE: Peso del extracto obtenido

PI: Peso inicial del material vegetal

Finalmente, los extractos se almacenaron en frascos de vidrio y protegidos de la luz a 4°C.

6.2.4 Caracterización parcial (Tamizaje fitoquímico parcial)

Una de las primeras etapas en la investigación de las plantas medicinales, es la realización de una caracterización parcial, también llamada tamizaje fitoquímico, que consiste en mezclar el material vegetal con solventes adecuados, para la extracción y determinación cualitativa de compuestos presentes en la planta, principalmente del grupo de metabolitos secundarios. Esto, con el fin de proporcionar información que oriente la investigación a el fraccionamiento y/o aislamiento de los compuestos bioactivos (Mendoza y Escamilla, 2018).

Para esto, se llevaron a cabo reacciones colorimétricas y de precipitación. Los resultados se representaron mediante cruces relacionando la intensidad de la reacción observada con la presencia del compuesto vegetal: (-) = ausente, (+) = presente, (++) = abundante y (+++) = muy abundante.

6.2.4.1 Instauraciones (Prueba del KMnO_4)

Se disolvieron de 1-2 mg de los extractos en 1 ml de agua, acetona o metanol y se le agregaron gota a gota una solución de KMnO_4 al 2% en agua. La prueba se consideró positiva al observarse decoloración o formación de precipitado de color café, resultado de la formación de MnO_2 .

6.2.4.2 Grupo carbonilo (Prueba de la 2-4 dinitrofenilhidrazina)

Una muestra de 5 mg del extracto se disolvió en 1 ml de etanol y se le añadió 1 ml de una solución saturada de 2-4 dinitrofenilhidracina en HCl 6N. La formación de un precipitado de color amarillo o naranja indicó la presencia del grupo carbonilo.

6.2.4.3 Oxidrilos fenólicos (taninos vegetales) (Prueba del FeCl_3)

Se disolvieron 1-2 mg del extracto en 1 ml de agua o etanol y después se agregaron gotas de FeCl_3 al 2.5% en agua. La aparición de un precipitado rojo, azul-violeta o verde se consideró positivo.

6.2.4.4 Esteroides y terpenos (Prueba de Salkowski)

Se disolvió 1-2 mg de cada extracto en 1 ml de cloroformo y posteriormente se le agregó 1 ml de H_2SO_4 . Se consideró un resultado positivo para esteroides y metilesteroides, al formarse un anillo rojo-marrón en la interfase.

6.2.4.5 Carbohidratos

6.2.4.5.1 Prueba de Molish

A 1-2 mg del extracto, se le agregó gota a gota el reactivo de Molish (alfa-naftol al 1 % en etanol), luego, 1 ml de H₂SO₄ por las paredes del tubo. La prueba se consideró positiva cuando se formó un anillo coloreado de color púrpura en la interfase.

6.2.4.5.2 Prueba de las cumarinas

Se disolvieron 1-2 mg del extracto en etanol y se le agregó gota a gota el reactivo NaOH al 10 %. La prueba se consideró positiva en el caso de presentar una coloración amarilla que desaparece al acidificar la solución.

6.2.4.5.3 Prueba de las lactonas

Se disolvieron de 1-2 mg del extracto y se agregó 1 ml de una solución alcohólica de NaOH al 10 %. La prueba se consideró positiva al presentarse un viraje a color amarillo o anaranjado que se pierde o desaparece al agregar unas gotas de HCl, lo que indicó la presencia de un anillo lactónico.

6.2.4.6 Sesquiterpenlactonas (Prueba de Baljet)

A 2-3 mg del extracto disueltos en etanol, se le agregaron 3-4 gotas de la solución mezcla, siendo positiva si se tornó de color naranja a roja oscura. La solución mezcla 1:1 consistió en una solución A que contiene: C₆H₃N₃O₇ al 1% en etanol y una B de NaOH al 10 %.

6.2.4.7 Flavonoides (Prueba del H₂SO₄)

Una pequeña cantidad del extracto se disolvió en H₂SO₄ y un resultado positivo indicó coloración amarilla para flavonoides, naranja-guinda para flavonas, rojo-azuloso para chalconas y rojo-púrpura para quinonas.

6.2.4.8 Alcaloides (Prueba de Dragendorff)

Se usó la modificación de Munier y Macheboeuf (Kikugawa, 1967) para la determinación de alcaloides. Para ello se prepararon dos soluciones, la solución A con 0.85 g de Bi(NO₃)₃, los cuales se mezclaron con 10 ml de CH₃COOH y 40 ml de agua y Solución B

con 8 g de KI disuelto en 20 ml de agua. El reactivo se preparó mezclando 5 ml de “A”, 4 ml de “B” y 100 ml de agua, la prueba se consideró positiva en caso de presentar coloraciones rojo-naranja, persistentes por 24 h.

6.2.4.9 Saponinas

6.2.4.9.1 Prueba del NaHCO_3

La sal se preparó al 10 % en agua. Se disolvieron de 1-2 mg del extracto en agua o etanol y se le agregaron de 2-3 gotas de H_2SO_4 concentrado. Se agitó ligeramente, y se agregaron 2-3 gotas de la solución de NaHCO_3 . La aparición de burbujas y su permanencia por más de 1 min indicaron la presencia de saponinas.

6.2.4.9.2 Prueba de Salkowski para saponinas

Se disolvieron de 1-2 mg del extracto en 1 ml de cloroformo y se les añadió 1 ml de H_2SO_4 . La prueba se consideró positiva en caso de la aparición de color rojo.

6.2.4.10 Aromaticidad (Prueba del H_2SO_4 - CH_2O)

Se preparó una mezcla de 1 ml de H_2SO_4 concentrado con una gota de CH_2O (formaldehído). Se disolvieron de 1-5 mg del extracto disuelto en un disolvente no aromático (etanol) y se añadieron unas gotas de la mezcla anterior y al aparecer un color rojo-violeta, la prueba se consideró positiva.

6.2.5 Líneas celulares

6.2.5.1 Línea celular Vero

Células derivadas de riñón de mono verde adulto (*Cercopithecus aethiops*) (ATCC: CCL-81). Son células adherentes y de morfología epitelial. Las células se incubaron en medio Advanced DMEM, 1x suplementado con 4% v/v de suero fetal bovino inactivado, 1% v/v de penicilina/estreptomicina y 1% de L-glutamina.

6.2.5.2 Línea celular HeLa

Células derivadas de adenocarcinoma de cérvix humano (ATCC: CCL-2) de un paciente femenino de 31 años y de raza negra. Son células adherentes, de morfología epitelial y positiva para queratina. Se ha reportado que contienen secuencias del virus del papiloma humano 18 (Popescu et al., 1987). Así como también expresan niveles bajos de p53 y niveles normales de pRB (Hoppe y Butz, 1993). Las células se incubaron en medio Advanced DMEM 1X suplementado con 4% v/v de suero fetal bovino inactivado, 1% de penicilina/estreptomicina y 1% de L-glutamina.

6.2.5.3 Línea celular MDA-MB-231

Células derivadas de adenocarcinoma mamario humano de un paciente femenino de 51 años y de raza caucásica (ATCC: CRM-HTB-26). Son células adherentes, de morfología epitelial y expresan el oncogén WNT7B. Expresan el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento transformante alfa (TGF α) (Mur et al., 1998) Las células se incubaron en medio DMEM 1x suplementado con 10% v/v de suero fetal bovino inactivado, piruvato 1x, 1% v/v de penicilina/estreptomicina y 1% de L-glutamina.

Todas las líneas celulares se incubaron a 37°C en una atmósfera con CO₂ al 5%.

6.2.6 Preparación de las soluciones de trabajo.

A partir de los extractos crudos, se prepararon las soluciones madre de 10 mg/ml, disolviendo en tubos Eppendorff de 1.5 ml dicha cantidad de extracto en 50 μ l de DMSO (dimetilsulfóxido) 100% y se añadieron 950 μ l de medio de cultivo con el fin de que la concentración de DMSO fuera de 5%. Posteriormente se prepararon las soluciones de trabajo de 1 mg/ml realizando una dilución 1:10 de la solución madre, con lo que se obtuvo una concentración de DMSO de 0.5%, que, de acuerdo con Chen y Thibeault (2013) es la concentración mínima a la cual no resulta tóxico. Posteriormente a partir de las soluciones de trabajo se prepararon las diluciones a concentraciones de 0, 10, 50, 100, 300 y 500 μ g/ml.

6.2.7 Ensayo de citotoxicidad con MTT

La función mitocondrial puede evaluarse en función de la actividad de las reductasas que se encuentran en el orgánulo, relacionándose directamente con la viabilidad celular. El ensayo de MTT [bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio] se puede utilizar para medir dicha actividad. Este compuesto es una sal de tetrazolio de color amarillo la cual se reduce a formazán, por la acción de las enzimas mitocondriales en especial el succinato deshidrogenasa, dando como resultado un producto de color morado-azul el cual se puede evaluar por espectrofotometría (van Tonder, 2015).

Para este ensayo, se incubaron por 24 h, 5×10^4 células por pozo (n=7) en una placa de 96 pozos para permitir su adhesión. Posteriormente, se aplicaron los tratamientos de cada extracto a concentraciones de 10, 50, 100, 300 y 500 $\mu\text{g/ml}$, diluidos en 100 μl de medio de cultivo. Como control negativo se utilizó medio de cultivo celular como vehículo. Se analizaron los resultados a las 12, 24, 40 y 72 h. Después, 2 h antes de terminar los tiempos de incubación correspondientes, se utilizó un microscopio invertido Southern Precision Instrument para tomar 6 fotomicrografías representativas, una por cada concentración, a un aumento total de 40X, para observar el efecto de los extractos en la morfología celular. Posteriormente se añadieron 15 μl de MTT (3 mg/ml) a cada pozo y se incubaron las células por 2 h a 37°C, luego se retiró el medio y se añadió el reactivo revelador de MTT (HCl 4 mM, 0.040% NP40 en isopropanol), se agitó la placa a 125 RPM durante 10 minutos y se realizó un análisis de absorbancia a 590 nm con filtro de referencia de 620 nm, en un lector de microplacas iMark™. El valor de absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de células metabólicamente activas, que es una medida indirecta de la viabilidad celular.

6.2.8 Ensayo de marcaje de núcleos con DAPI

Con el fin de relacionar los resultados obtenidos en el ensayo de MTT, el uso del colorante fluorescente DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol) al unirse a los ácidos nucleicos de las células adheridas, nos permitió estimar la cantidad de células viables relacionada con la adherencia celular. Para esto, se realizaron cultivos en placas de 96 pozos a las mismas

condiciones ($n = 8$) y tratamientos del ensayo MTT. Al terminar los tiempos de incubación, se retiró el medio, se realizaron 2 lavados de 200 μ l con PBS 1X y posteriormente las células se fijaron con metanol/acetona a una proporción de 1:1 por 20 minutos a 4°C. Después se retiró el fijador, se realizaron nuevamente 2 lavados con PBS 1X y se agregaron 100 μ l de DAPI (100 ng/ml) por 15 minutos a TA en oscuridad. Al finalizar este periodo, se retiró el exceso de DAPI y la placa fue secada y observada a microscopía de fluorescencia. Se tomaron 8 micrografías por concentración, a un aumento total de 100X, las cuales se evaluaron con el software Image J® versión 1.51, calculando el porcentaje de área cubierta por las células adheridas en cada uno de los pozos.

6.2.9 Análisis morfológico

Para evaluar la presencia de cambios morfológicos en las células a causa de la exposición a los extractos de *A. monostachya*, se sembraron 1×10^6 células en platos de 60 mm y se incubaron por 24 h para permitir su adherencia. Posteriormente se les aplicaron los tratamientos de 0, 10 y 50 μ g/ml de EM y EH y 0, 300 y 500 μ g/ml de EA, diluidos en medio de cultivo, siendo un total de 3 ml por plato y se incubaron por 24 y 48 h.

Al concluir el tiempo de incubación las células se cosecharon utilizando tripsina al 0.25%, se realizaron 2 lavados con PBS 1X (pH 7.4) y posteriormente se fijaron con glutaraldehído al 2.5% amortiguado en buffer de cacodilatos 0.1 M (pH 7.4) durante 24 h. Seguido, Las células se lavaron 2 veces con buffer de cacodilatos por 5 min centrifugando a 14,000 RMP, se decantaron y se realizó una post-fijación con OsO_4 al 2% durante 12 h, nuevamente se lavaron y se continuó con una deshidratación en gradiente de acetonas (30%, 50%, 70%, 90% y 100%) por 5 min y se embebieron en resina epóxica de dureza media por 72 h a 60 °C.

Al obtener los bloques, se realizaron cortes semi-finos de 350 nm de espesor por ultramicrotomía y posterior tinción con azul de toluidina al 1% por 30 seg – 1 min.

Se contaron 100 células por corte analizando la presencia de cambios en la morfología nuclear, condensación de la cromatina y vacuolización en el citoplasma para obtener el porcentaje de células positivas en cada tratamiento.

6.2.10 Análisis estadístico

6.2.10.1 Estadística descriptiva

Las variables cuantitativas se resumieron mediante el cálculo de la media y como medida de dispersión, la desviación estándar (DE).

6.2.10.2 Estadística inferencial

Se aplicó la prueba de normalidad de Kolmogórov-Smirnov para evaluar la distribución de los datos, teniendo que todas las variables tuvieron una distribución normal. Posteriormente se realizó una prueba ANOVA para evaluar la presencia de diferencias entre los grupos.

7. RESULTADOS

7.1 Identificación taxonómica de la planta en estudio

La planta fue identificada como *Acalypha monostachya*, por el Dr. Marco Guzmán Lucio de la Facultad de Ciencias Biológicas (FCB) de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

A. monostachya se identificó como una hierba perenne, de aproximadamente 10 a 40 cm de altura con tallos numerosos y ramificados con láminas del mismo largo y ancho que los peciolo (0.5 a 2.5 de largo). Posee inflorescencias masculinas y femeninas de color rojo en la misma planta, las masculinas terminales y las femeninas axilares o terminales (Figura 7.1).



Figura 7.1 *Acalypha monostachya* en el sitio de colecta. Se observa la parte aérea que comprende tallos, hojas y sus características inflorescencias de color rojo.

7.2 Rendimiento de los extractos

Los rendimientos obtenidos de los extractos EA, EM y EH mediante el método de maceración fueron de 9.8%, 10.7% y 2.2% p/p, respectivamente. Los tres extractos presentaron una consistencia pastosa y color verde-marrón de aspecto translúcido, siendo el EM el de mayor intensidad en la coloración, así mismo, el olor predominante en los extractos fue el del solvente utilizado.

7.3 Caracterización parcial (análisis fitoquímico cualitativo)

Los resultados obtenidos en el análisis fitoquímico para cada uno de los extractos se compararon con un control negativo, compuesto por el solvente utilizado en cada prueba y posteriormente se añadieron los reactivos correspondientes, esto sin la presencia de ningún extracto crudo. Seguido, mediante un análisis semicuantitativo basado en reacciones colorimétricas y de precipitación, se determinó la presencia de distintos grupos de metabolitos secundarios. Los resultados se representaron de forma semicuantitativa con cruces de acuerdo con la intensidad observada en cada reacción (Figuras 7.2 y 7.3).

Los extractos EA, EM y EH obtenidos de la parte aérea de *A. monostachya* mostraron la presencia de metabolitos secundarios, entre los que se encuentran las insaturaciones, detectadas mediante la prueba del KMnO_4 . Los resultados revelaron que el EA presentó mayor contenido de éstas, al observarse una reacción más rápida y uniforme comparada con EM y EH. La reacción es caracterizada por la formación de un precipitado de color café al momento de agregar el KMnO_4 .

Para la detección de compuestos fenólicos, se realizó la prueba de FeCl_3 , la cual fue positiva para los tres extractos al evidenciar una tonalidad verde intensa en el caso de EM, seguido del EA y el EH en el cual el viraje fue el de menor intensidad, asociándose con escasa presencia de fenoles. Mediante la prueba de Salkowski se detectaron esteroides y terpenos en EM y EH al presentarse el característico anillo marrón en la interfase, este anillo no se observó al analizar el EA, lo que indica que estos compuestos no están presentes (Figura 7.2).

Los tres extractos mostraron un resultado positivo para la presencia de cumarinas y lactonas mediante la prueba del NaOH , siendo abundantes en EM y EA observándose tonalidades de amarillo/naranja más intensas en comparación con EH. Sesquiterpenlactonas y glicósidos fueron detectados mediante la prueba de Baljet, resultando positivo solamente en EM y EA. No ocurrió ninguna reacción al analizar EH con esta prueba.

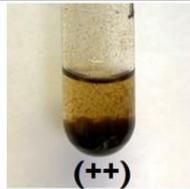
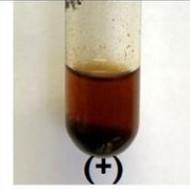
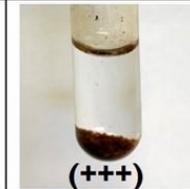
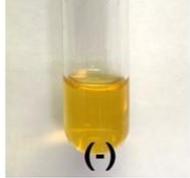
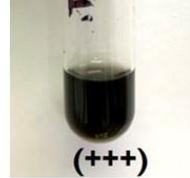
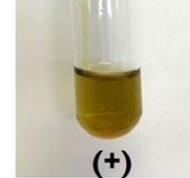
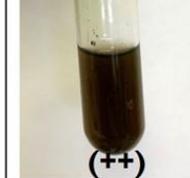
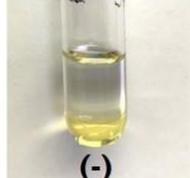
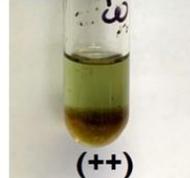
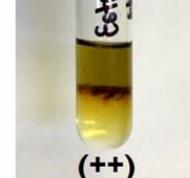
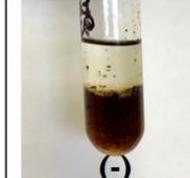
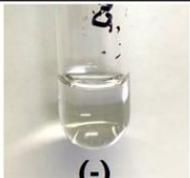
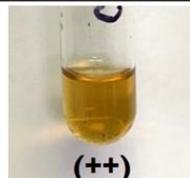
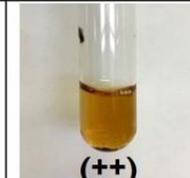
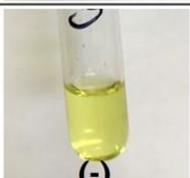
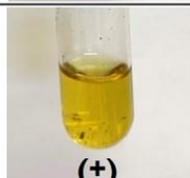
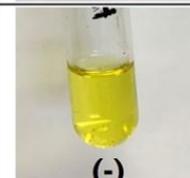
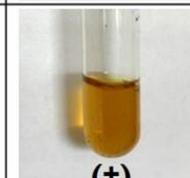
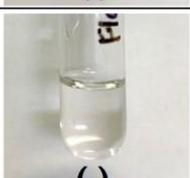
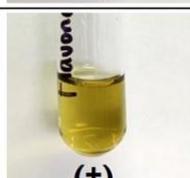
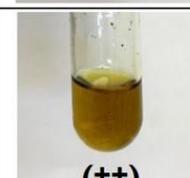
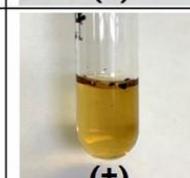
Metabolito/Prueba	Control	EM	EH	EA
Insaturaciones / Prueba del KMnO_4	 (-)	 (++)	 (+)	 (+++)
C. Fenólicos / Prueba FeCl_3	 (-)	 (+++)	 (+)	 (++)
Esteroides y terpenos / Salkowski	 (-)	 (++)	 (++)	 (-)
Cumarinas y Lactonas / Prueba de NaOH	 (-)	 (++)	 (+)	 (++)
Sesquiterpenlactonas y glicósidos / Baljet	 (-)	 (+)	 (-)	 (+)
Flavonoides / Prueba H_2SO_4	 (-)	 (+)	 (++)	 (+)

Figura 7.2 Tamizaje fitoquímico parcial de los extractos crudos de la parte aérea de *A. monostachya*. La primera columna (izquierda a derecha) indica el nombre del metabolito secundario y de la prueba para realizar la detección. La siguiente columna muestra los tubos con el control negativo, seguido de los resultados obtenidos en los tres extractos. **EA** = Extracto acuoso, **EM** = Extracto metanólico, **EH** = Extracto Hexánico. (-) = Ausente, (+) = Presente, (++) = Abundante, (+++) = Muy abundante.

La prueba del H_2SO_4 , detectó flavonoides en EH, el cual mostró un contenido abundante de estos compuestos y una presencia escasa en EM y EA. La formación de un precipitado color rojo en EA indicó la presencia de alcaloides al realizar la prueba de Dragendorff. Los resultados de la prueba de espuma muestran que el contenido de saponinas fue muy abundante en EA al formarse una capa de aproximadamente 1 cm de espesor (flechas color azul) y la persistencia de ésta por más de 1 min, por otro lado, EM y EH mostraron abundante presencia de saponinas (Figura 7.3).

Los tres extractos mostraron la presencia de compuestos aromáticos muy abundantes en EM y EH, en el caso de EA, mostró escasa presencia de este tipo de compuestos. Se observaron tonalidades de amarillo en la prueba para la detección del grupo carbonilo, lo que indica un resultado positivo para los tres extractos siendo abundante en EA y escasa presencia en EM y EH. Por último, también se obtuvieron resultados positivos en la prueba de Molish para la detección de carbohidratos, al formarse un anillo color púrpura en la interfase, en este caso, en EA fueron muy abundantes, seguido del EM y EH (Figura 7.3).

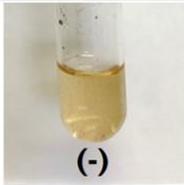
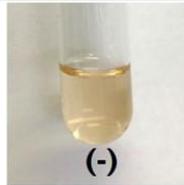
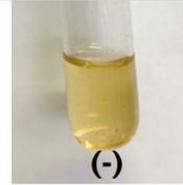
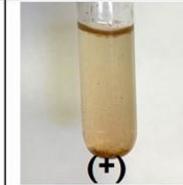
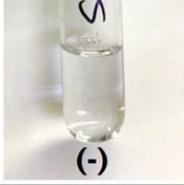
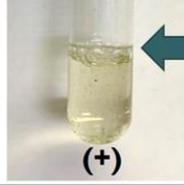
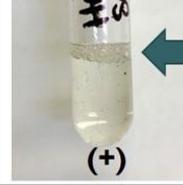
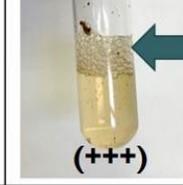
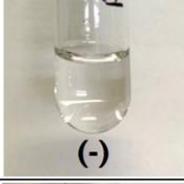
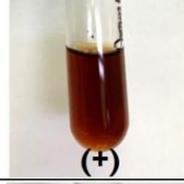
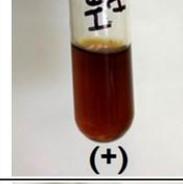
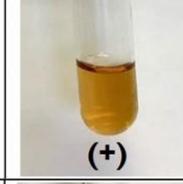
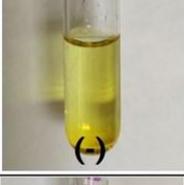
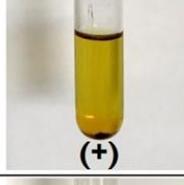
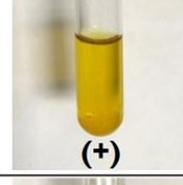
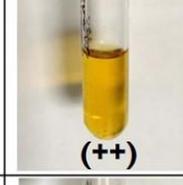
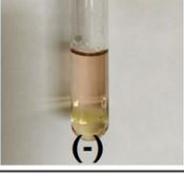
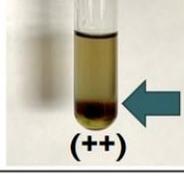
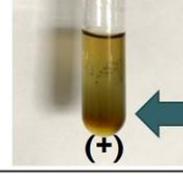
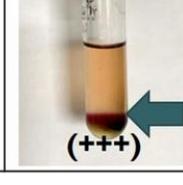
Metabolito/Prueba	Control	EM	EH	EA
Alcaloides / Dragendorff	 (-)	 (-)	 (-)	 (+)
Saponinas / Prueba NaHCO ₃	 (-)	 (+) ←	 (+) ←	 (+++)
Aromaticidad / H ₂ SO ₄ - CH ₂ O	 (-)	 (+)	 (+)	 (+)
Grupo carbonilo / 2-4 dinitrofenilhidracina	 (-)	 (+)	 (+)	 (++)
Carbohidratos / Prueba de Molish	 (-)	 (++) ←	 (+) ←	 (+++)

Figura 7.3 Tamizaje fitoquímico parcial de los extractos crudos de la parte aérea de *A. monostachya*. La primera columna (izquierda a derecha) indica el nombre del metabolito secundario y de la prueba para realizar la detección. La siguiente columna muestra los tubos con el control negativo, seguido de los resultados en los tres extractos. Las flechas azules indican la formación de una capa de espuma (saponinas) y del característico anillo púrpura en la prueba de Molish. **EA** = Extracto acuoso, **EM** = Extracto metanólico, **EH** = Extracto Hexánico. (-) = Ausente, (+) = Presente, (++) = Abundante, (+++) = Muy abundante.

7.4 Los extractos de *A. monostachya* inducen cambios morfológicos en cultivo de células tumorales humanas.

Con el objetivo de determinar la presencia de un efecto citotóxico de los extractos en las células tumorales y no tumorales, se realizaron observaciones a microscopía óptica después de aplicar los tratamientos a concentraciones de 0, 10, 50, 100, 300 y 500 $\mu\text{g/ml}$ durante 12, 24, 48 y 72 h.

Las figuras 7.4 y 7.5 muestran fotomicrografías de campo claro de los cultivos celulares de Vero, HeLa y MDA-MB-231 después de la exposición a la concentración más baja (10 $\mu\text{g/ml}$) y más alta (500 $\mu\text{g/ml}$) de los extractos durante 12 h.

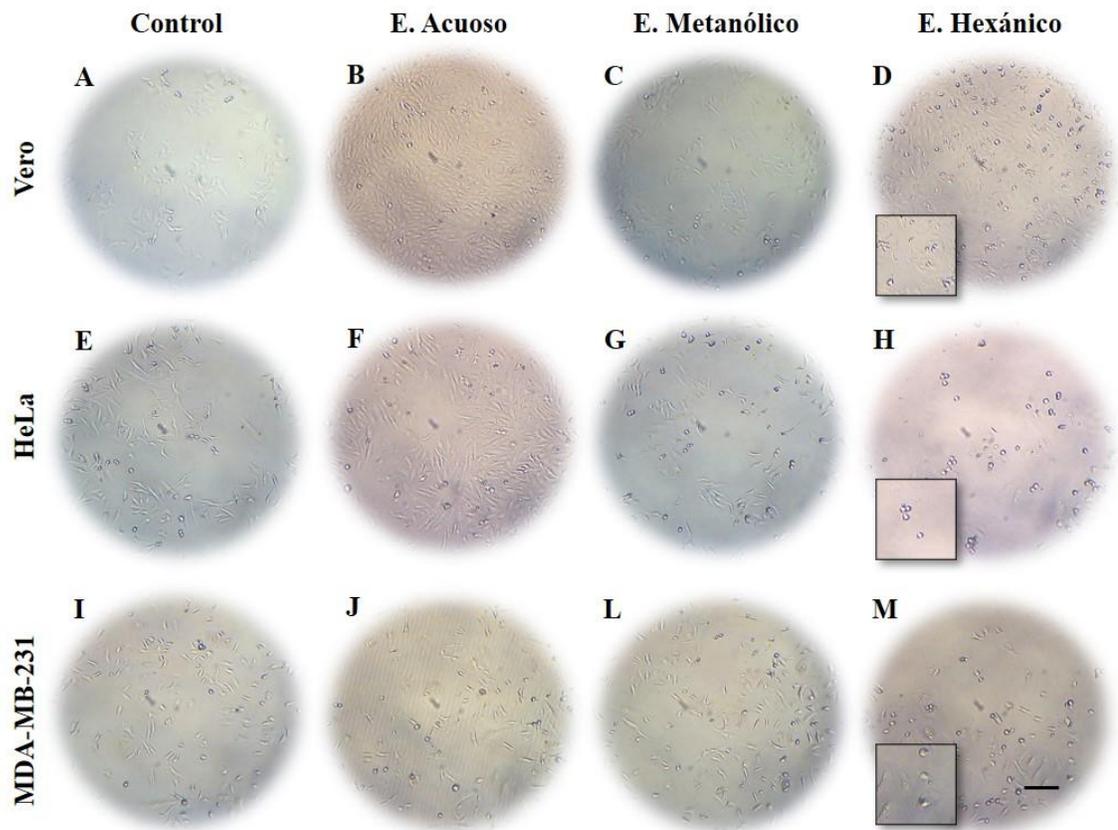


Figura 7.4 Células tratadas por 12 h con 10 $\mu\text{g/ml}$ de extractos de *A. monostachya*. Se administraron los extractos en células Vero, HeLa y MDA-MB-231. Se presenta una columna con las 3 líneas celulares tratadas con el vehículo (A, E e I), con EA (B, F y J), con EM (C, G y L) y con EH (D, H y M). Se aprecia que escasas células tumorales tratadas con EH han adquirido forma redondeada. Barra de escala = 300 μm .

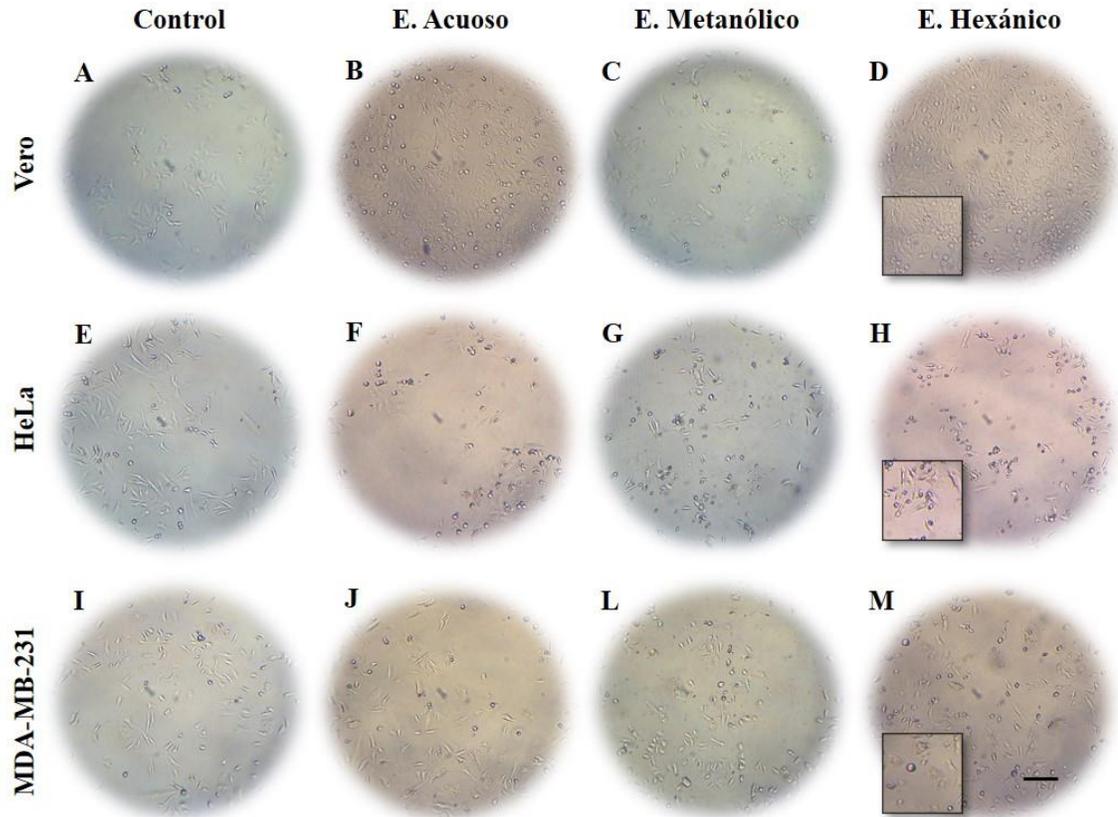


Figura 7.5 Células tratadas por 12 h con 500 $\mu\text{g/ml}$ de extractos de *A. monostachya*. Se administraron los extractos en células Vero, HeLa y MDA-MB-231. Se presenta una columna con las 3 líneas celulares tratadas con el vehículo (A, E e I), con EA (B, F y J), con EM (C, G y L) y con EH (D, H y M). Se aprecia que las células tumorales tratadas con EA, EM y EH han adquirido forma redondeada y una disminución en la confluencia comparando con la mínima concentración utilizada. Barra de escala = 300 μm .

Se presentaron cambios dependientes de concentración por la exposición a los tres extractos, principalmente en las células tumorales, siendo más sensibles las células HeLa (Figura 7.4 y 7.5, F, G y H) comparado con las MDA-MB-231 (Figura 7.4 y 7.5, J, L y M). Estos cambios fueron acentuados en las células tratadas con EH, seguidos de las tratadas con EM y EA.

Por otro lado, se observa disminución en la confluencia al tratar las células tumorales con la concentración más alta (500 $\mu\text{g/ml}$), principalmente de EH, lo cual sugiere un efecto citotóxico y anti-proliferativo; así mismo se apreciaron cambios morfológicos que se describen como pérdida de su forma típica ahusada, adquiriendo una forma redondeada causada por la pérdida de adherencia, que a su vez se relaciona con estrés y con muerte celular (Figura 7.5, B, C y D).

Estos resultados se comparan con las células control, las cuales fueron tratadas con el vehículo, en estas, no se presentaron los cambios antes mencionados. En las células no tumorales Vero se observó ligera disminución en la confluencia a la concentración de 500 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 7.5, B, C y D).

Las figuras 7.6 y 7.7 muestran el efecto de la exposición a la concentración más baja y alta de los extractos en los cultivos celulares después de 24 h. Se observaron cambios similares a los observados a las 12 h. En este caso, se presentó una ligera disminución en la confluencia celular a partir de la exposición a 10 $\mu\text{g/ml}$ de EH (Figura 7.6 y 7.7, H y M).

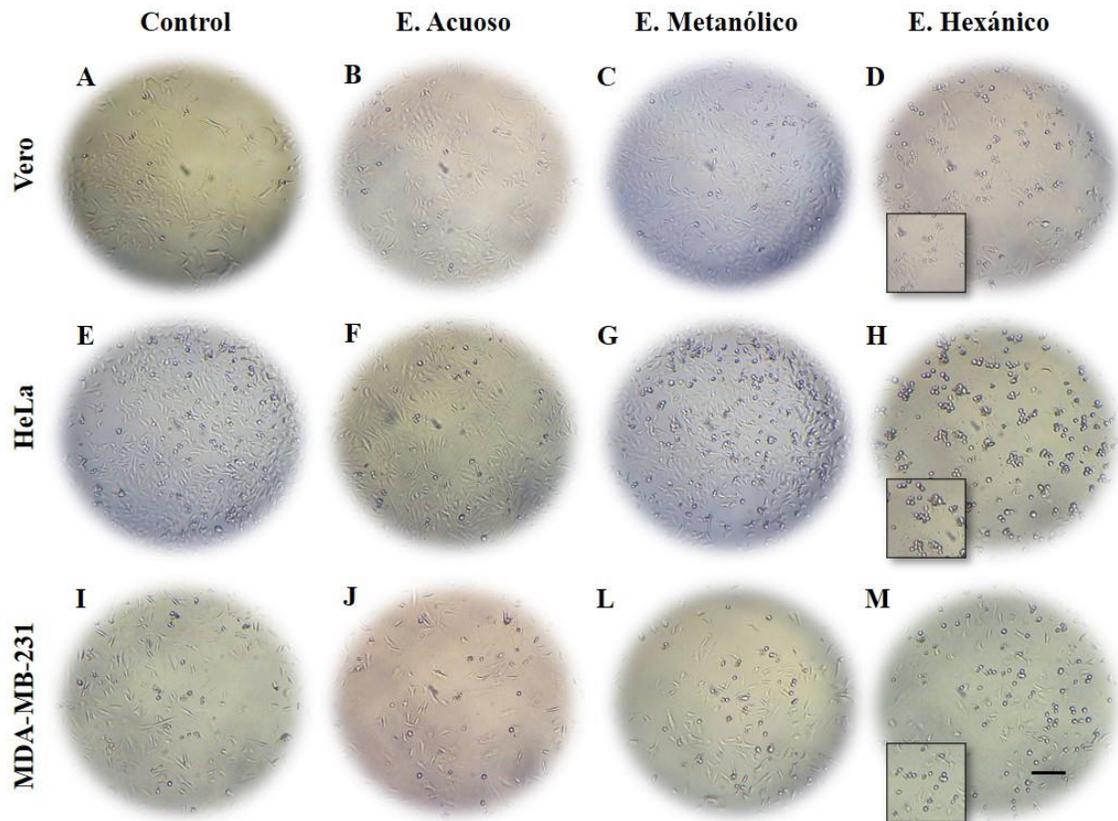


Figura 7.6 Células tratadas por 24 h con 10 $\mu\text{g/ml}$ de extractos de *A. monostachya*. Se administraron los extractos en células Vero, HeLa y MDA-MB-231. Se presenta una columna con las 3 líneas celulares tratadas con el vehículo (A, E e I), con EA (B, F y J), con EM (C, G y L) y con EH (D, H y M). Se aprecia que algunas células tumorales tratadas con EH han adquirido forma redondeada. Barra de escala = 300 μm .

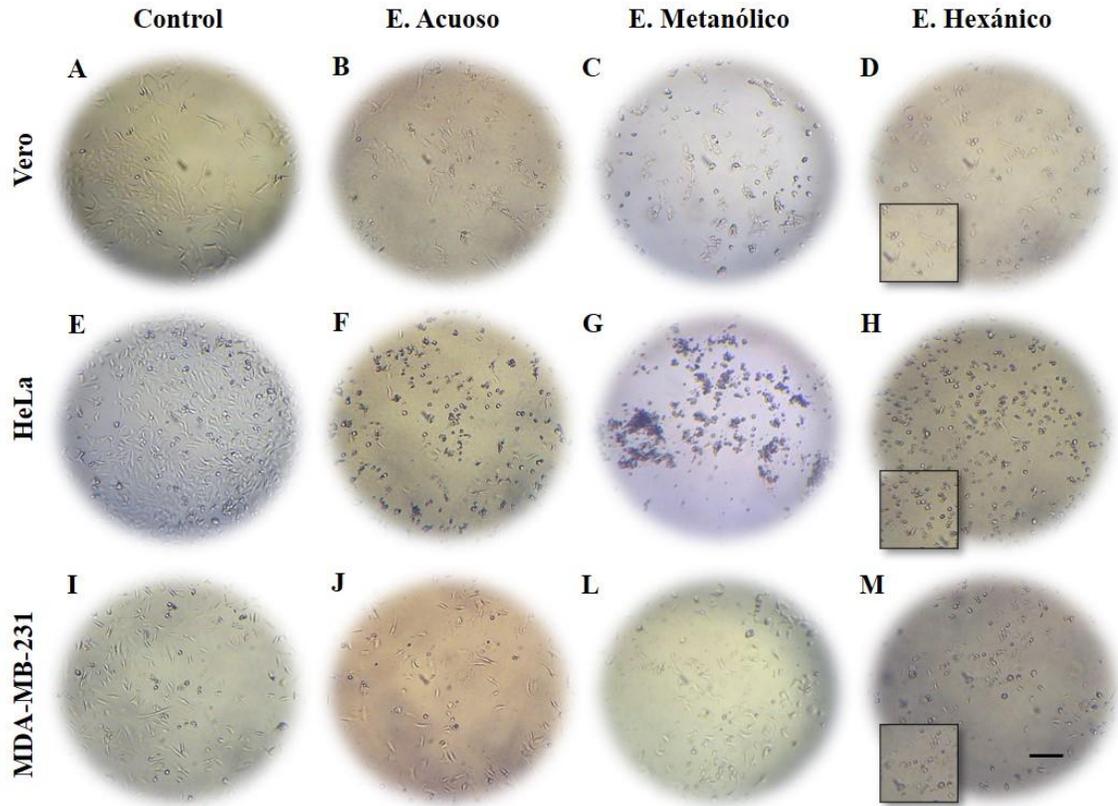


Figura 7.7 Células tratadas por 24 h con 500 $\mu\text{g/ml}$ de extractos de *A. monostachya*. Se administraron los extractos en células Vero, HeLa y MDA-MB-231. Se presenta una columna con las 3 líneas celulares tratadas con el vehículo (A, E e I), con EA (B, F y J), con EM (C, G y L) y con EH (D, H y M). Se aprecia disminución en la confluencia y pérdida de la morfología normal comparada con las células control. Barra de escala = 300 μm .

Nuevamente, los cambios morfológicos fueron acentuándose de manera dependiente de concentración. Las células tratadas con EM comenzaron a presentar alteraciones en la confluencia y morfología al ser expuestas a la concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ y en el caso del EA, éste indujo cambios a partir de la concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ a las 24 h. Las células HeLa tratadas con los tres extractos presentaron mayores cambios en la morfología comparando con las células MDA-MB-231 (Figuras 7.6 y 7.7).

El análisis de los ensayos a las 48 h de exposición a los extractos reveló una evidente disminución en la confluencia de las células tumorales tratadas con EH a partir de la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 7.8). Esta disminución se apreció de manera similar utilizando concentraciones de 300 a 500 $\mu\text{g/ml}$ de EM y EA (Figura 7.9). A este tiempo de exposición, los resultados mostraron que el EH induce mayores cambios en la morfología celular seguido del EM y por último el EA, que necesita concentraciones más altas para producir estos efectos, los cuales se observaron acentuados en las células HeLa, sugiriendo nuevamente que son más sensibles que las células MDA-MB-231.

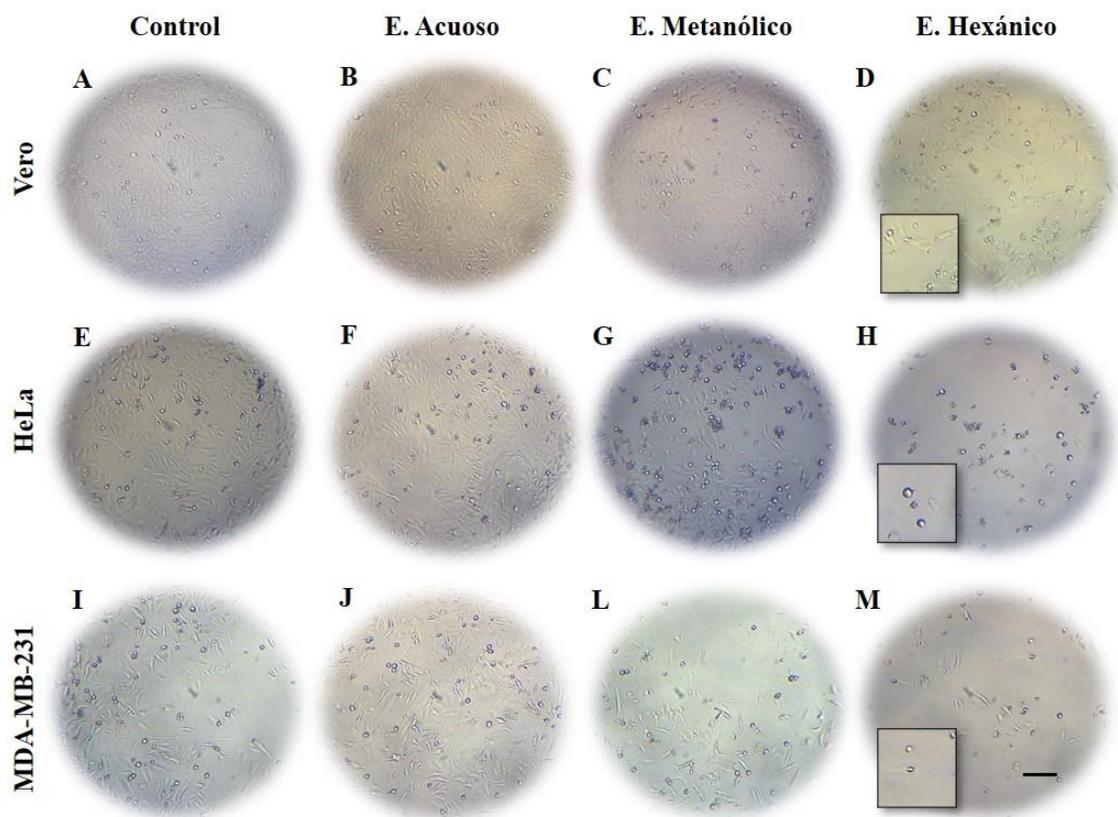


Figura 7.8 Células tratadas por 48 h con 10 $\mu\text{g/ml}$ de extractos de *A. monostachya*. Se administraron los extractos en células Vero, HeLa y MDA-MB-231. Se presenta una columna con las 3 líneas celulares tratadas con el vehículo (A, E e I), con EA (B, F y J), con EM (C, G y L) y con EH (D, H y M). Se aprecia disminución en la confluencia y cambios morfológicos (redondeamiento) acentuados en las células tumorales tratadas con EH. Las células Vero presentaron mínimos cambios. Barra de escala = 300 μm .

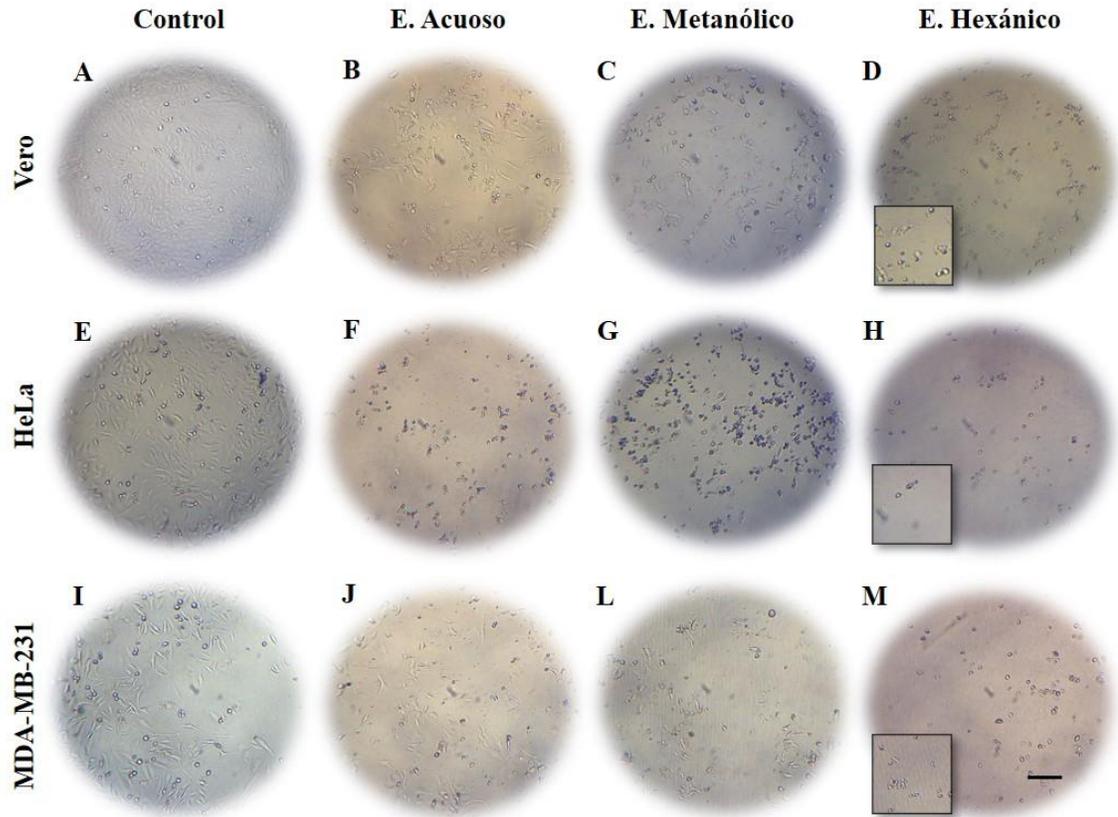


Figura 7.9 Células tratadas por 48 h con 500 $\mu\text{g/ml}$ de extractos de *A. monostachya*. Se administraron los extractos en células Vero, HeLa y MDA-MB-231. Se presenta una columna con las 3 líneas celulares tratadas con el vehículo (A, E e I), con EA (B, F y J), con EM (C, G y L) y con EH (D, H y M). Se aprecia disminución en la confluencia y cambios morfológicos (redondeamiento) acentuados en las células tumorales tratadas con EH. Las células Vero presentaron mínimos cambios. Barra de escala = 300 μm .

El tratamiento aplicado por 72 h mostró que los extractos están induciendo alteraciones, dependientes de tiempo y de concentración. En las figuras 7.10 y 7.11 se aprecia que a las concentraciones de 10 y 500 $\mu\text{g/ml}$, se observó una considerable disminución de la confluencia en las células tratadas con los tres extractos, esto se aprecia con facilidad al comparar con las células control en las que se observa una alta confluencia celular correspondiente con tiempo de incubación.

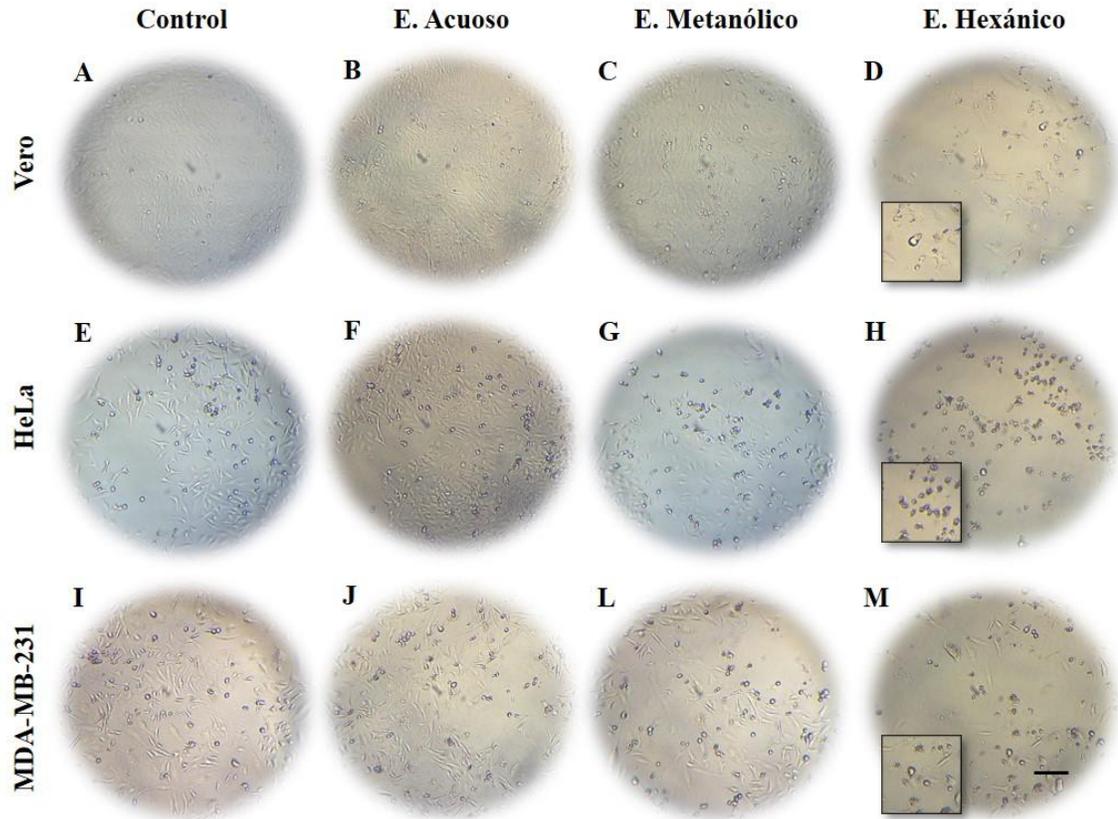


Figura 7.10 Células tratadas por 72 h con 10 µg/ml de extractos de *A. monostachya*. Se administraron los extractos en células Vero, HeLa y MDA-MB-231. Se presenta una columna con las 3 líneas celulares tratadas con el vehículo (A, E e I), con EA (B, F y J), con EM (C, G y L) y con EH (D, H y M). Se aprecia evidente disminución en la confluencia y cambios morfológicos (redondeamiento) acentuados en las células tratadas con EH. Barra de escala = 300 µm.

Se presentó toxicidad selectiva para las líneas celulares tumorales. Las células HeLa presentaron más cambios morfológicos que las MDA-MB-231 frente a la exposición al EH seguido del EM y el EA. Mediante estas observaciones se realizaron los siguientes ensayos.

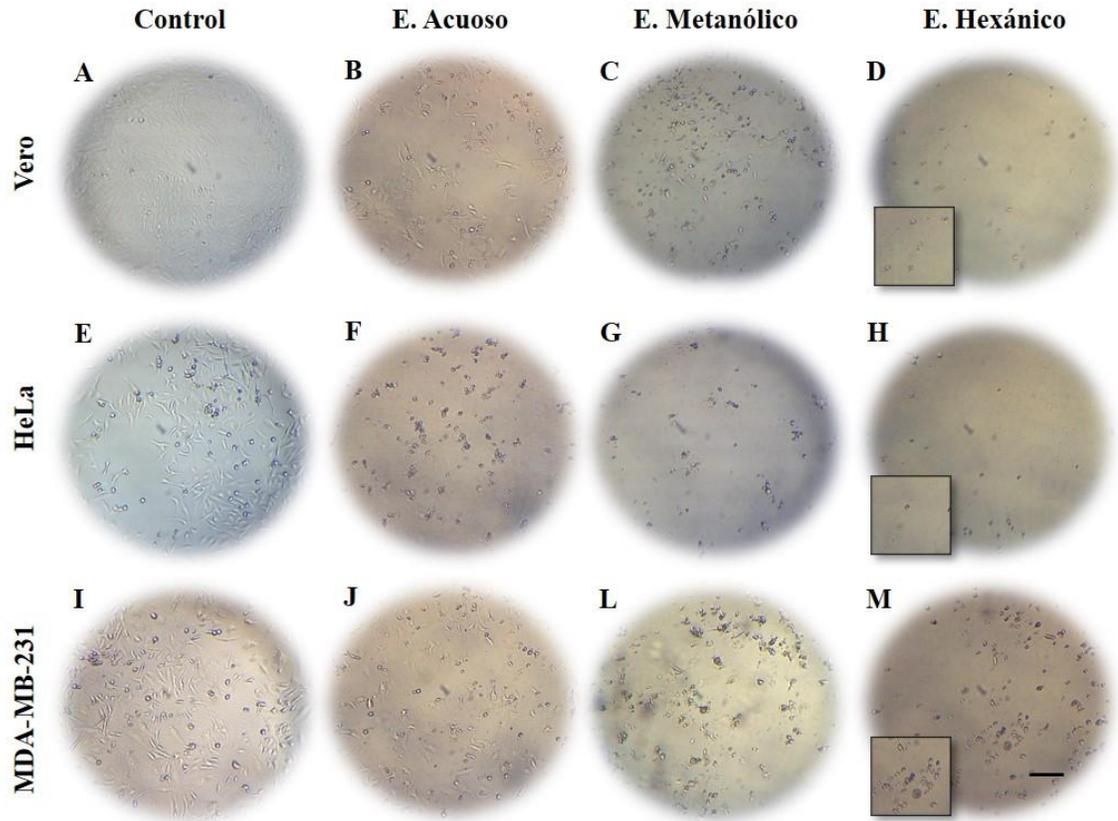


Figura 7.11 Células tratadas por 72 h con 500 $\mu\text{g/ml}$ de extractos de *A. monostachya*. Se administraron los extractos en células Vero, HeLa y MDA-MB-231. Se presenta una columna con las 3 líneas celulares tratadas con el vehículo (A, E e I), con EA (B, F y J), con EM (C, G y L) y con EH (D, H y M). Se aprecia evidente disminución en la confluencia y cambios morfológicos (redondeamiento) en las células tumorales tratadas con los tres extractos, se aprecian acentuados en las células tratadas con EH. Barra de escala = 300 μm .

7.5 Los extractos de *A. monostachya* inducen cambios en la morfología nuclear de células tumorales humanas

Con el objetivo de evaluar una disminución en la proliferación causada por el efecto citotóxico de los extractos, se cuantificó el porcentaje de área de las células adheridas a los pozos de la placa, mediante un ensayo de marcaje de núcleos con DAPI, esto con el fin de obtener una relación de la adherencia con la viabilidad celular.

A las 12 h (Figuras 7.12 y 7.13), se presentaron resultados que concuerdan con lo observado a microscopia óptica. Las células tumorales presentaron cambios en la morfología nuclear correspondientes a muerte celular, que se describen como condensación de la cromatina, redondeamiento, disminución de tamaño y una intensa señal de fluorescencia. Así mismo, después de calcular el porcentaje de área, los resultados se representaron en gráficas donde se aprecian las diferencias significativas contra las células Vero (Figura 7.16).

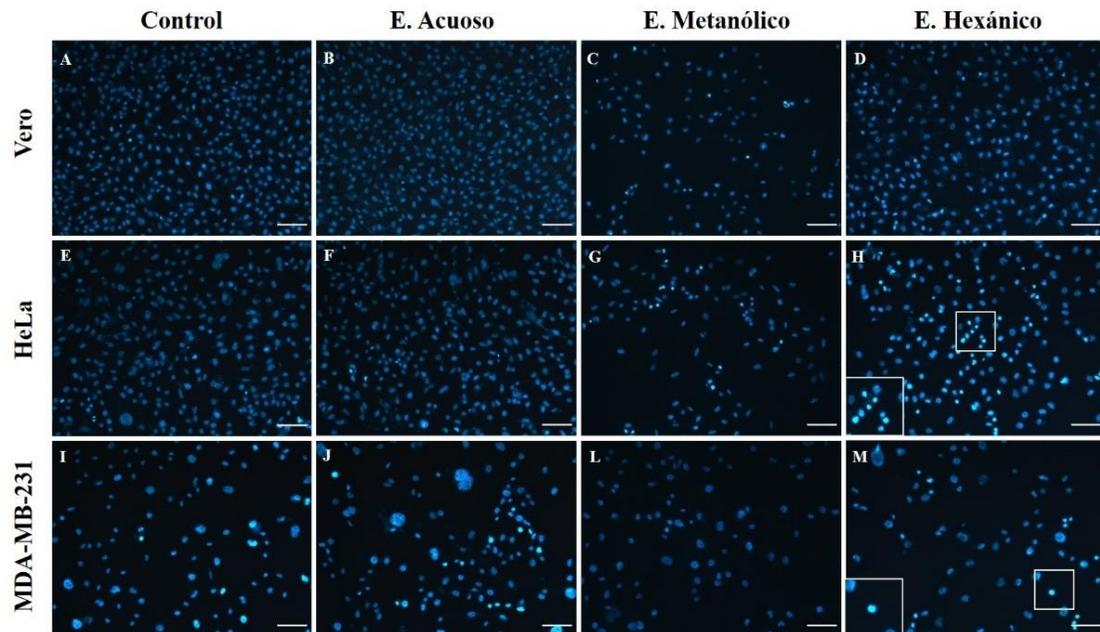


Figura 7.12 Marcaje de núcleos con DAPI en células tratadas por 12 h. con 10 $\mu\text{g/ml}$ de extractos de *A. monostachya*. Células tratadas con vehículo (A, E e I), EA (B, F y J), EM (C, G y L) y EH (D, H y M). Las ampliaciones muestran cambios en la morfología nuclear, como disminución de tamaño, redondeamiento y fluorescencia intensa. Se aprecia una escasa disminución en la confluencia de las células tumorales tratadas con EM y EH. En el caso de las células tratadas con EA no se observan diferencias en la confluencia ni en la morfología. Barra de escala = 50 μm .

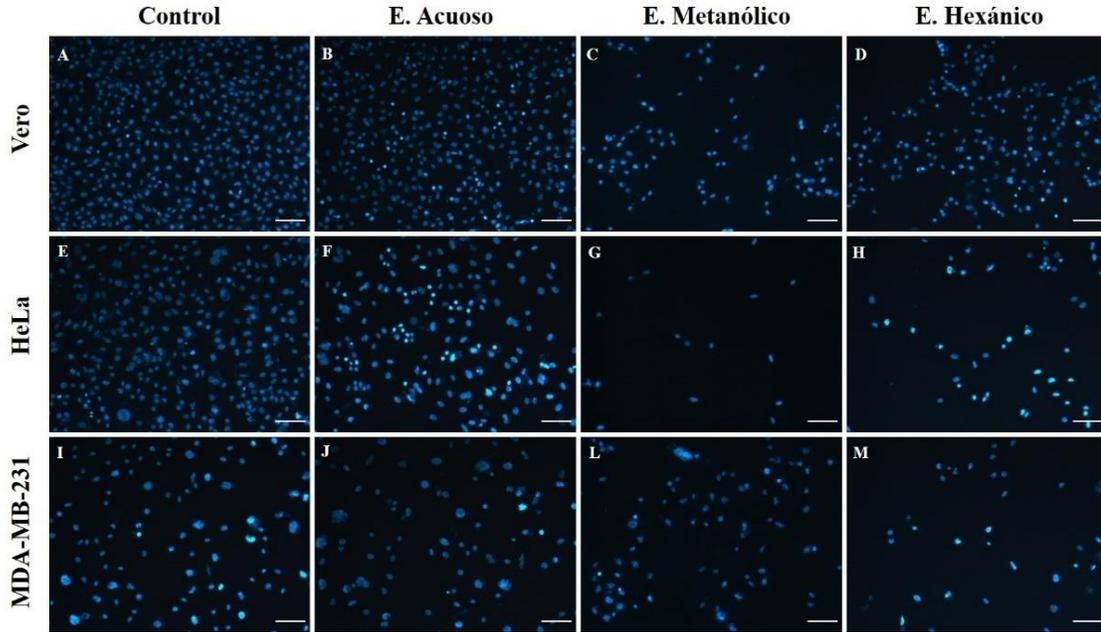


Figura 7.13 Marcaje de núcleos con DAPI en células tratadas por 12 h. con 500 $\mu\text{g/ml}$ de extractos de *A. monostachya*. Células tratadas con vehículo (A, E e I), EA (B, F y J), EM (C, G y L) y EH (D, H y M). Se observan leves cambios en la morfología nuclear, como disminución de tamaño, redondeamiento y fluorescencia intensa, principalmente en las células tratadas con EA. Se aprecia una considerable disminución en la confluencia de las células tumorales tratadas con EM y EH. Barra de escala = 50 μm .

A las 24 h de tratamiento (Figuras 7.14 y 7.15), se observaron cambios similares a los observados a las 12 h, en este caso, también se presenta una ligera disminución en la confluencia. Estos cambios fueron acentuándose a mayor concentración, con la diferencia de que, a las 24 h, los cambios se observan principalmente en las células tumorales tratadas con la concentración mínima utilizada (10 $\mu\text{g/ml}$) de EH. (Figura 7.14). Las células tratadas con EM comenzaron a presentar estos cambios a la concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ y en el caso del EA, éste indujo cambios a partir de la concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$. Estos cambios sugieren muerte celular.

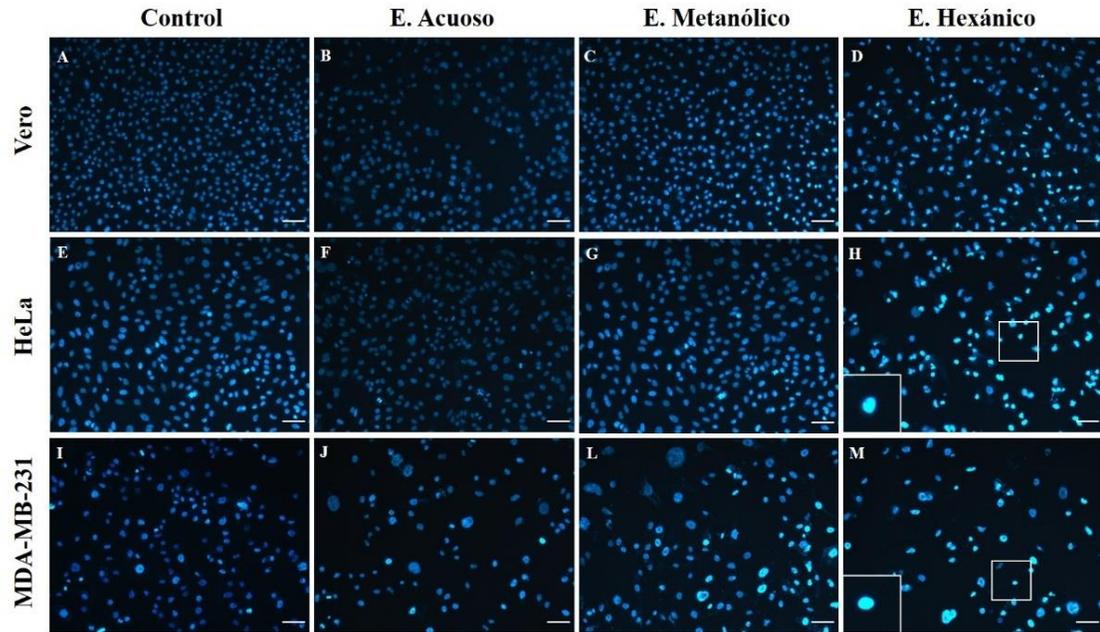


Figura 7.14 Marcaje de núcleos con DAPI en células tratadas por 24 h. con 10 $\mu\text{g/ml}$ de extractos de *A. monostachya*. Células tratadas con vehículo (A, E e I), con EA (B, F y J), con EM (C, G y L) y con EH (D, H y M). Las ampliaciones muestran cambios en la morfología nuclear, como disminución de tamaño, redondeamiento y fluorescencia intensa. Se aprecia una escasa disminución en la confluencia de las células tumorales tratadas con EH. En el caso de las células tratadas con EA no se observan diferencias en la confluencia ni en la morfología a este tiempo de exposición. Barra de escala = 50 μm .

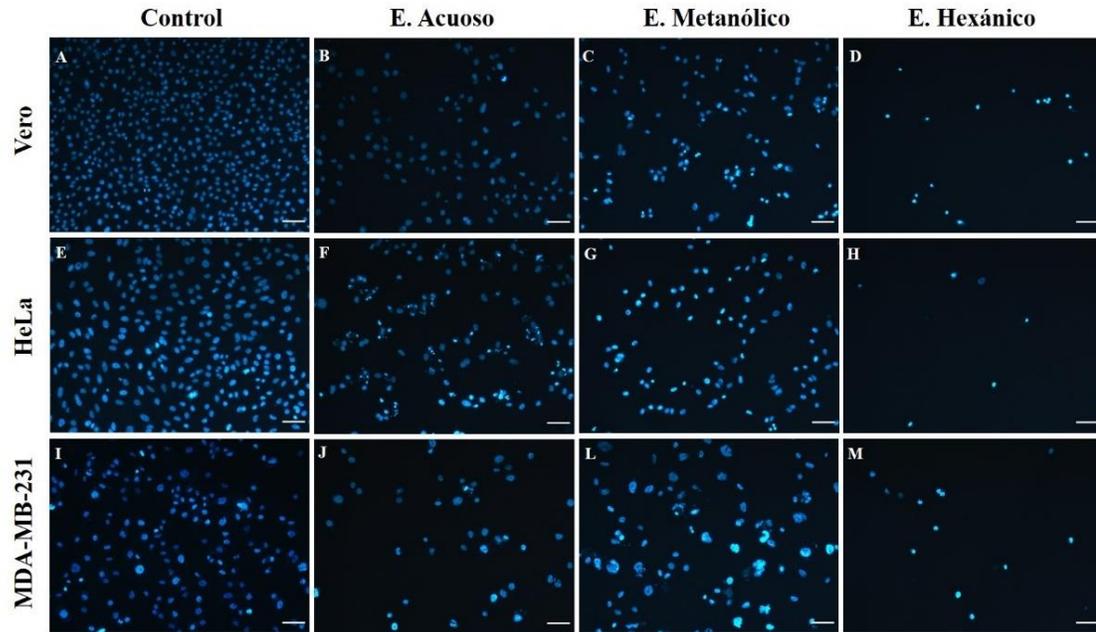


Figura 7.15 Marcaje de núcleos con DAPI en células tratadas por 24 h. con 500 $\mu\text{g/ml}$ de extractos de *A. monostachya*. Células tratadas con vehículo (A, E e I), EA (B, F y J), EM (C, G y L) y EH (D, H y M). Se observan cambios notables en la morfología nuclear, como disminución de tamaño, redondeamiento y fluorescencia intensa. A esta concentración es posible apreciar una evidente disminución en la confluencia de las células tumorales tratadas principalmente EH seguido de las tratadas con EM. En el caso de las células tratadas con EA estos cambios se presentaron en menor grado. Barra de escala = 50 μm .

Al realizar la cuantificación, se apreció que el EA, mostró diferencias significativas contra las células no tumorales, a las concentraciones de 300 y 500 $\mu\text{g/ml}$. Contrario a EM y EH, los cuales necesitaron concentraciones menores de entre 10 y 50 $\mu\text{g/ml}$ para causar cambios morfológicos y presentar diferencias significativas. Estas diferencias, además de que se observaron al comparar los valores con las células Vero, también estuvieron presentes entre las células HeLa y MDA-MB-231, siendo las células HeLa las más afectadas ó con más cambios (Figura 7.16).

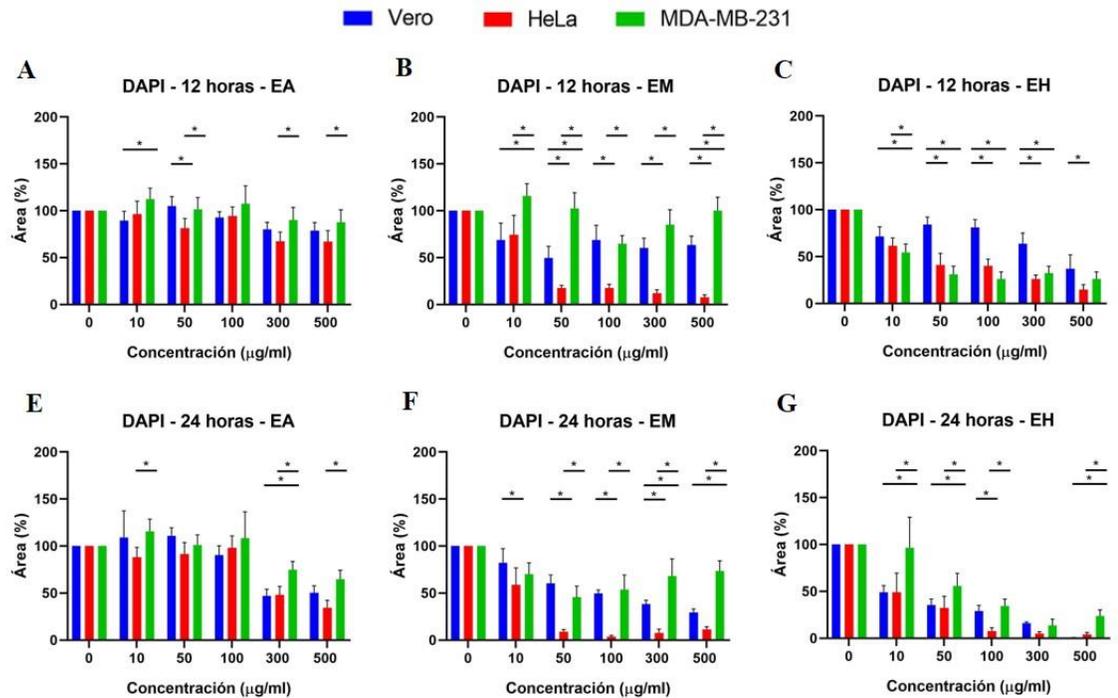


Figura 7.16 Análisis cuantitativo de marcaje de núcleos con DAPI en células tratadas por 12 y 24 h con extractos de *A. monostachya*. Se muestran los porcentajes de área celular de las líneas Vero (no tumoral), HeLa y MDA-MB-231 (tumorales) expuestas a concentraciones de 0, 10, 50, 100, 300 y 500 µg/ml de EA (A y E), EM (B y F) y EH (C y D). n = 8. *P < 0.05, Prueba de comparación múltiple de Tukey vs células Vero.

A las 48 h de tratamiento, al igual que en las micrografías obtenidas por microscopía óptica, se presentó una evidente disminución en la confluencia celular en las células tratadas con los tres extractos a partir de la concentración de 300 µg/ml. Los resultados mostraron que el EH está induciendo cambios morfológicos evidentes, desde las concentraciones mínimas utilizadas, seguido del EM y por último el EA, necesitó concentraciones más altas para producir estos efectos (Figuras 7.17 y 7.18).

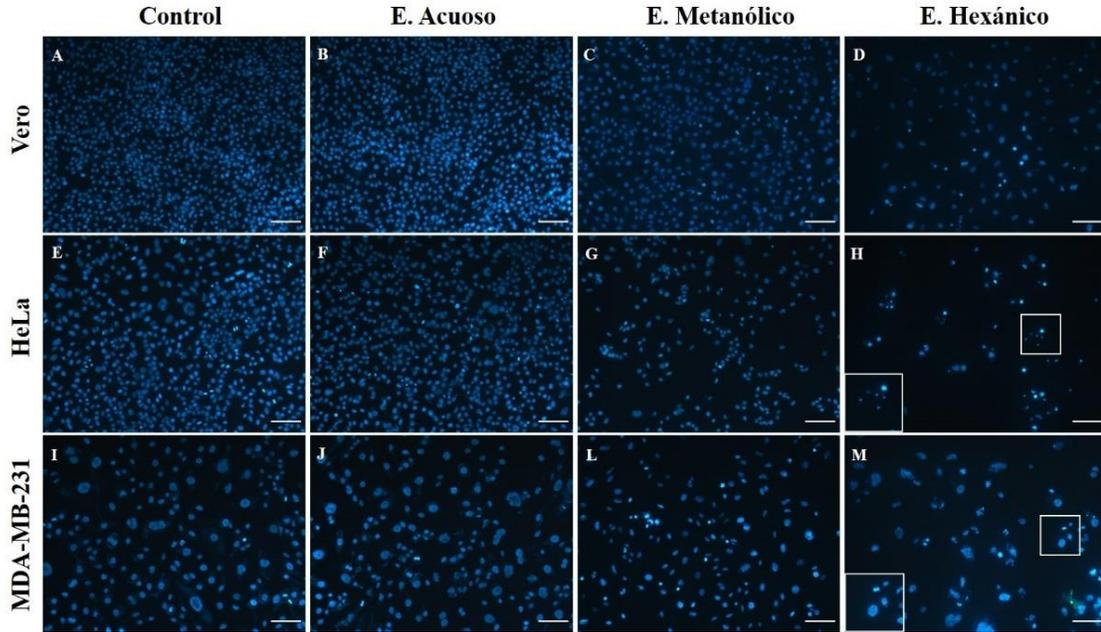


Figura 7.17 Marcaje de núcleos con DAPI en células tratadas por 48 h con 10 $\mu\text{g/ml}$ de extractos de *A. monostachya*. Células tratadas con vehículo (A, E e I), EA (B, F y J), EM (C, G y L) y EH (D, H y M). Las ampliaciones muestran cambios en la morfología nuclear, como disminución de tamaño, redondeamiento y fluorescencia intensa. Se aprecia una notoria disminución en la confluencia de las células tumorales tratadas con EM y EH, siendo más destacado el efecto en las células HeLa. En el caso de las células tratadas con EA no se observan diferencias al comparar con el control. Barra de escala = 50 μm .

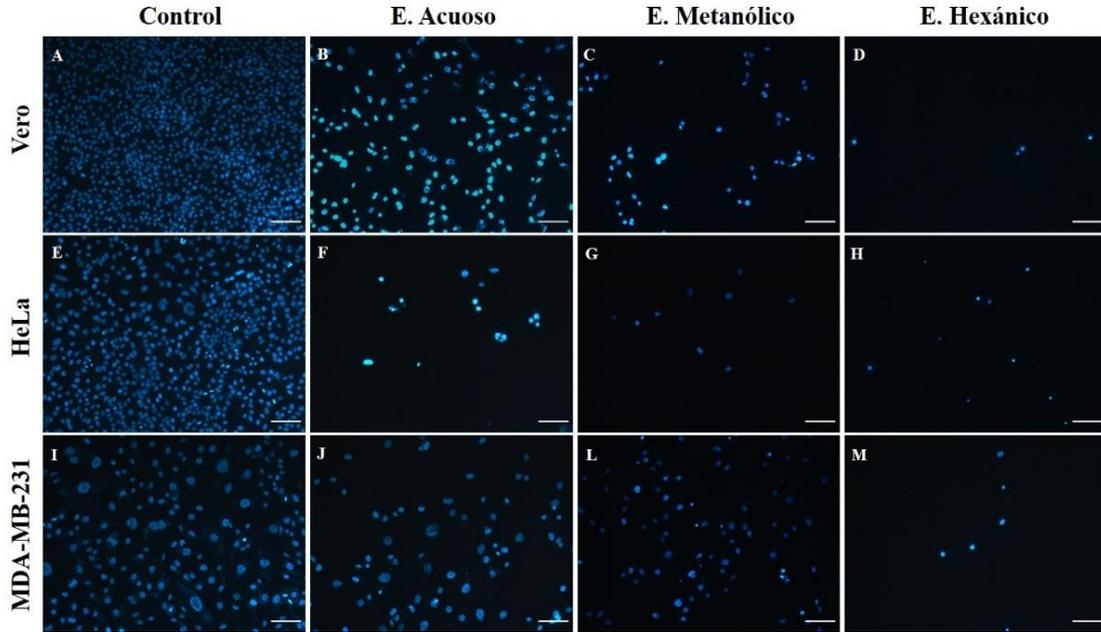


Figura 7.18 Marcaje de núcleos con DAPI en células tratadas por 48 h con 500 µg/ml de extractos de *A. monostachya*. Células tratadas con vehículo (A, E e I), EA (B, F y J), EM (C, G y L) y EH (D, H y M). Se aprecian cambios en la morfología nuclear, como disminución de tamaño, redondeamiento y fluorescencia intensa en las células tumorales tratadas con los tres extractos. Se observa una evidente disminución en la confluencia de las células tumorales tratadas con EH, seguido de las tratadas con EM y EA. Hay que destacar que las alteraciones morfológicas y de confluencia se presentaron en mayor grado en las células HeLa por lo que se sugiere que podrían ser más sensibles a los extractos. Barra de escala = 50 µm.

El tratamiento aplicado por 72 h nuevamente demostró que los extractos están induciendo cambios en la morfología nuclear dependiente de tiempo y de concentración. En las figuras 7.19 y 7.20 se observa que, a la concentración más alta utilizada, hay una considerable disminución en la confluencia en las células tratadas con los tres extractos, esto se aprecia con facilidad al comparar con las células que no fueron tratadas con extracto, en la que se observa una alta confluencia celular debida al tiempo de incubación.

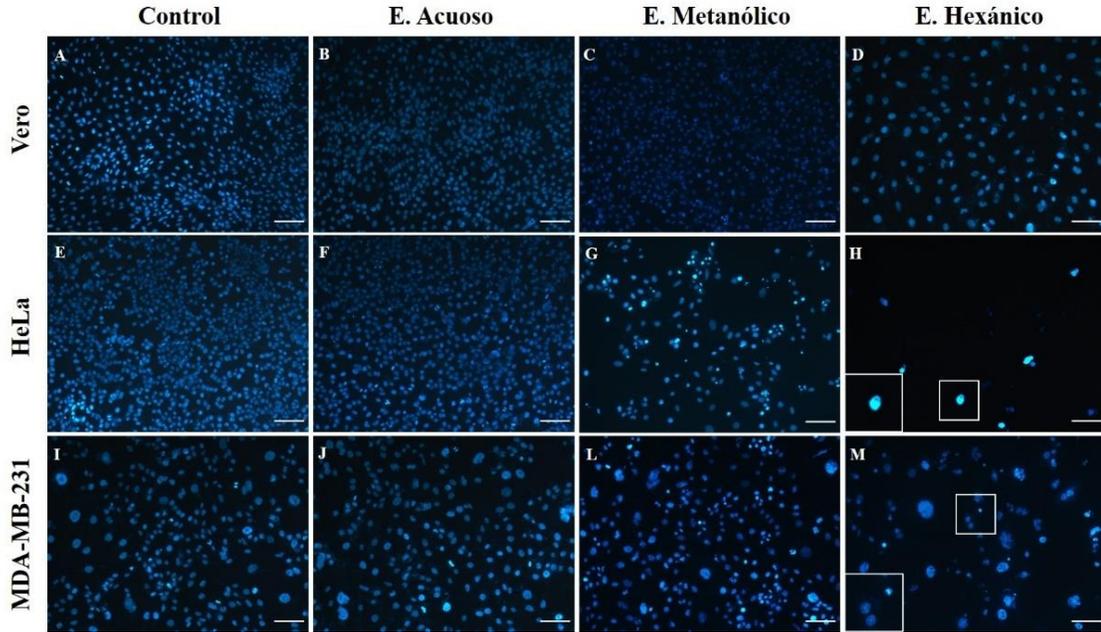


Figura 7.19 Marcaje de núcleos con DAPI en células tratadas por 72 h con 10 $\mu\text{g/ml}$ de extractos de *A. monostachya*. Células tratadas con vehículo (A, E e I), EA (B, F y J), EM (C, G y L) y EH (D, H y M). Las ampliaciones muestran cambios en la morfología nuclear, como disminución de tamaño, redondeamiento y fluorescencia intensa. Se aprecia una escasa disminución en la confluencia de las células tumorales tratadas con EM y EH. En el caso de las células tratadas con EA no se observan diferencias en la confluencia ni en la morfología. Barra de escala = 50 μm .

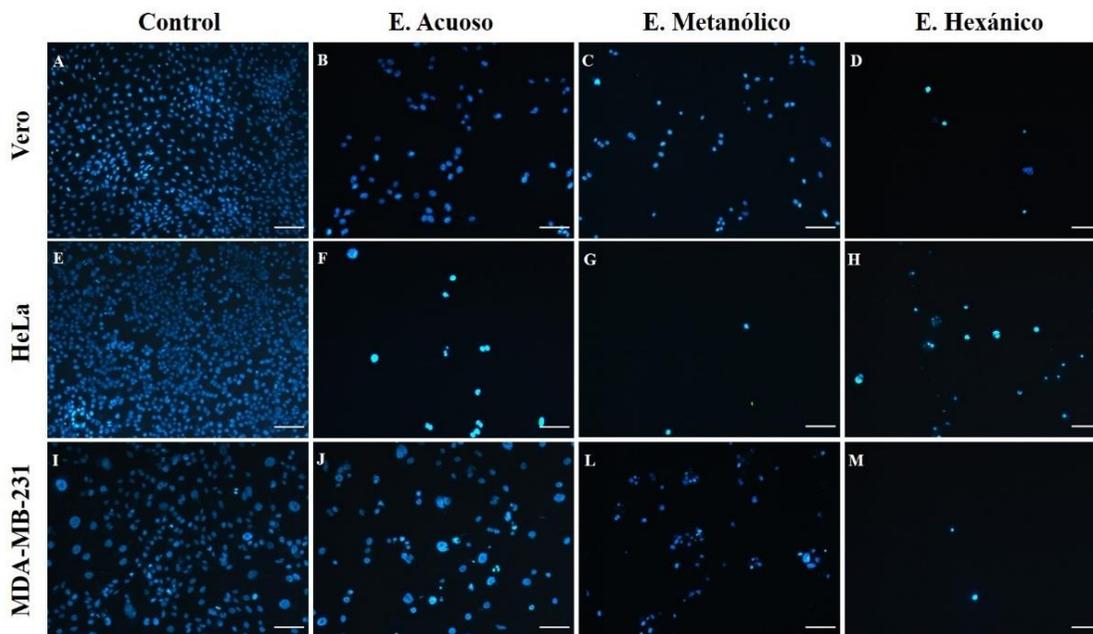


Figura 7.20 Marcaje de núcleos con DAPI en células tratadas por 72 h con 500 $\mu\text{g/ml}$ de extractos de *A. monostachya*. Células tratadas con vehículo (A, E e I), EA (B, F y J), EM (C, G y L) y EH (D, H y M). Las ampliaciones muestran cambios en la morfología nuclear, como disminución de tamaño, redondeamiento y fluorescencia intensa. Se aprecia una evidente disminución en la confluencia de las células tumorales tratadas con EM y EH. En el caso de las células tratadas con EA se observan diferencias moderadas en la confluencia ni en la morfología. Barra de escala = 50 μm .

La figura 7.21 muestra a manera de resumen, el comportamiento celular frente a los 3 extractos a los diferentes tiempos establecidos: 12, 24, 48 y 72 h. Se aprecia que el EA disminuyó significativamente el porcentaje de área a las 24 h utilizando las concentraciones de 300 y 500 $\mu\text{g/ml}$. En el caso de los EH y EM, este efecto se observó a partir de las 24 h, desde la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ acentuado en el EH. Se presentaron diferencias significativas *vs* las células Vero, demostrando la toxicidad selectiva para las células tumorales.

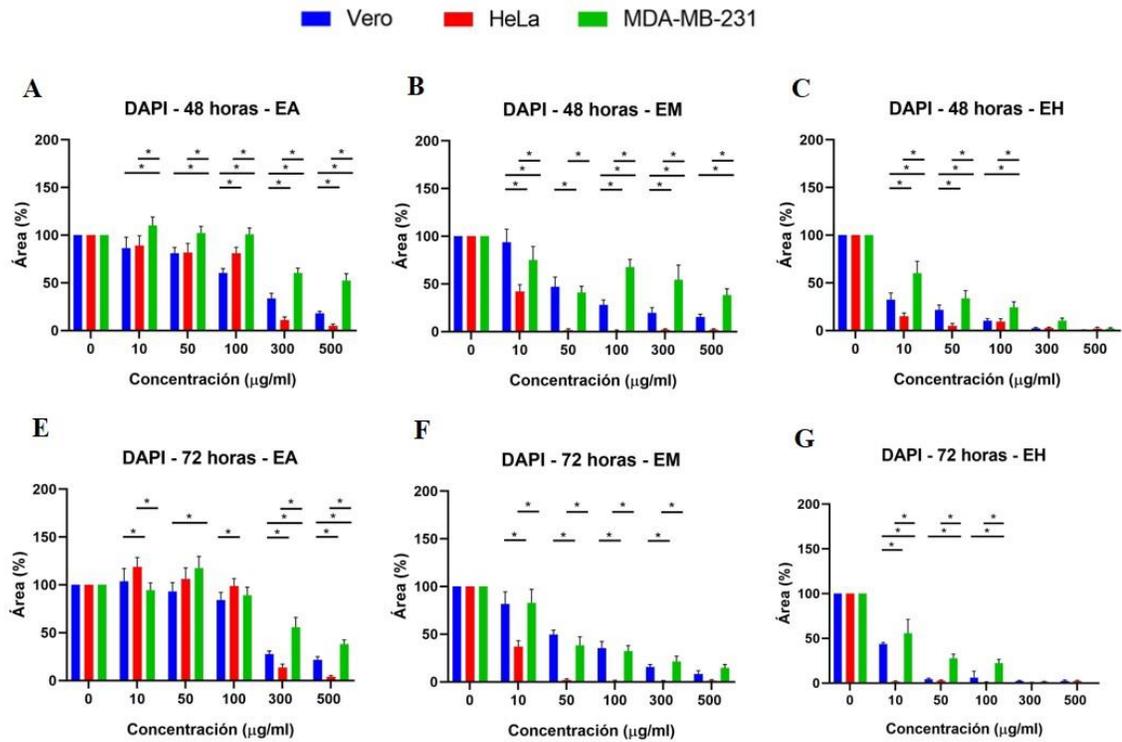


Figura 7.21 Análisis cuantitativo de ensayo de marcaje de núcleos con DAPI en células tratadas por 48 y 72 h con extractos de *A. monostachya*. Se muestran los porcentajes de área celular de las líneas Vero (no tumoral), HeLa y MDA-MB-231 (tumoraes) expuestas a concentraciones de 0, 10, 50, 100, 300 y 500 µg/ml de EA (A y E), EM (B y F) y EH (C y D). n = 8. *P < 0.05, Prueba de comparación múltiple de Tukey vs células Vero.

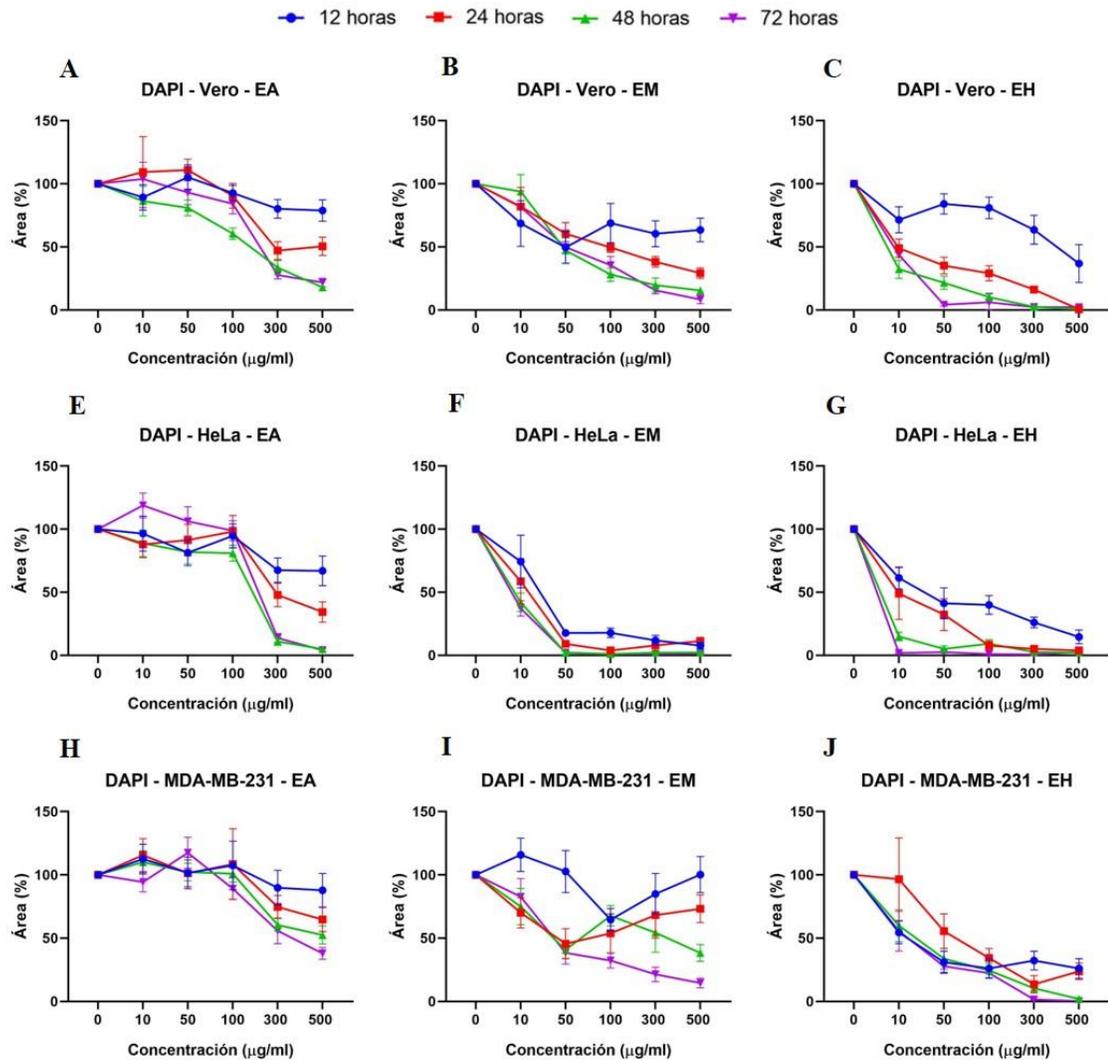


Figura 8.22 Comportamiento celular frente a diferentes concentraciones de extractos de *A. monostachya*, mediante marcaje de núcleos con DAPI. Se presentan comparaciones de los efectos en las 3 líneas celulares: Vero (A, E y H), HeLa (B, F e I) y MDA-MB-231 (C, G y J) ante la exposición a los 3 extractos a las 12 h (línea azul), 24 h (línea roja), 48 h (línea verde) y 72 h (línea morada). Las gráficas muestran el % de área en función de la concentración de los extractos. Se aprecia que el EH posee mayor efecto citotóxico en las líneas celulares tumorales a partir de las 24 h. Las células HeLa presentaron menor porcentaje de área después de la exposición a los extractos. * $P < 0.05$, Prueba de comparación múltiple de Tukey vs células Vero.

7.6 Los extractos de *A. monostachya* disminuyen el porcentaje de viabilidad relativa en células tumorales humanas.

Además de cuantificar las células viables estableciendo una relación con la adherencia celular, decidimos realizar un ensayo de MTT para correlacionar la actividad mitocondrial con la viabilidad y así observar el comportamiento celular frente a los extractos. En este caso, las células viables tuvieron la capacidad de metabolizar la sal de tetrazolio y reducirla obteniendo formazán, un compuesto color azul, del cual se realizaron lecturas de su absorbancia obteniendo los siguientes resultados.

A las 12 h (Figura 7.23) el análisis de MTT muestra que se presentaron diferencias significativas contra las células Vero desde la concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ ante la exposición al EA. Por otra parte, al aplicar los tratamientos de EM y EH, estas diferencias se presentaron a concentraciones más altas (100 y 300 $\mu\text{g/ml}$). Al utilizar los tres extractos se observó que las células HeLa presentaron menos porcentaje de viabilidad relativa que las células MDA-MB-231.

A las 24 h (Figura 7.23) se observaron resultados similares a los obtenidos a las 12 h. El EA presentó diferencias significativas al utilizar la concentración de 300 $\mu\text{g/ml}$ y en este caso, el EM y EH, presentó un efecto citotóxico a partir de la concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$. A partir de este tiempo de exposición se comenzó a apreciar una respuesta dependiente de concentración. Por otra parte, las células MDA-MB-231 presentaron resistencia y en algunos casos mayor viabilidad relativa que la línea celular Vero.

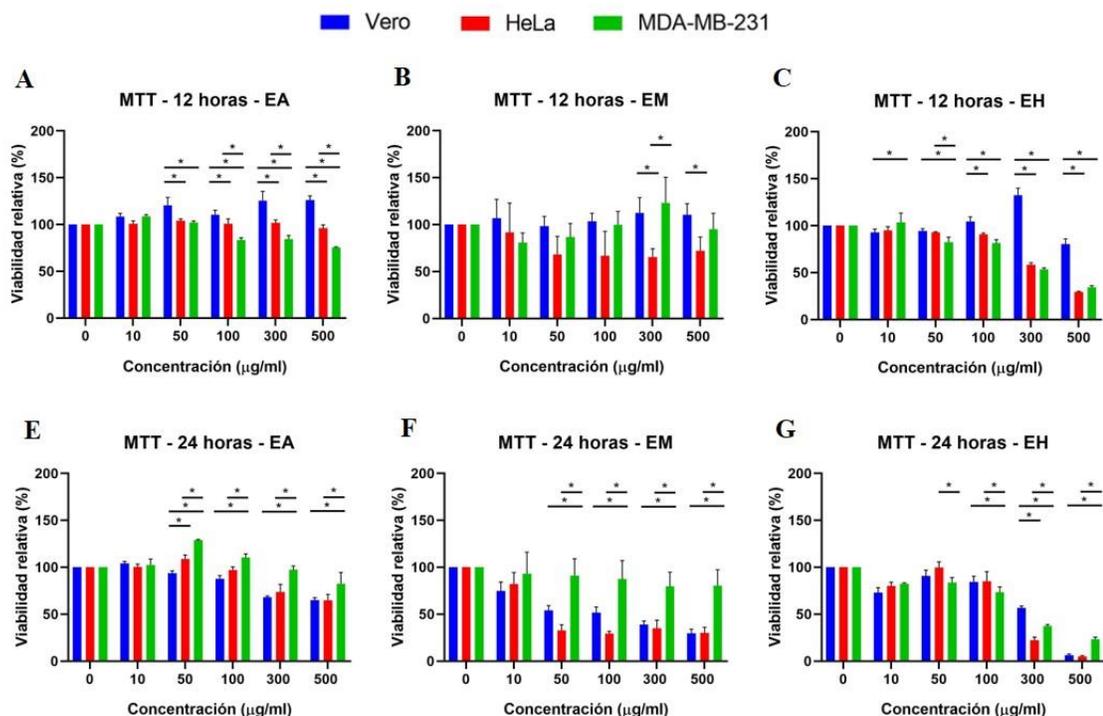


Figura 7.23 Análisis de citotoxicidad por ensayo de MTT en células tratadas por 12 y 24 h con diferentes concentraciones de extractos de *A. monostachya*. Se muestran los porcentajes de viabilidad relativa de las líneas Vero (no tumoral), HeLa y MDA-MB-231 (tumoraes) expuestas a concentraciones de 0, 10, 50, 100, 300 y 500 $\mu\text{g/ml}$ de EA (A y E), EM (B y F) y EH (C y D). $n = 8$. $*P < 0.05$, Prueba de comparación múltiple de Tukey vs células Vero.

A las 48 y 72 h (Figura 7.24) disminuyó considerablemente la viabilidad relativa de las células tumorales y al ser expuestas a los tres extractos presentaron diferencias significativas desde las mínimas concentraciones utilizadas (10 y 50 $\mu\text{g/ml}$). En el caso de las concentraciones más altas se apreció que, a estos tiempos, las concentraciones mayores (300 y 500 $\mu\text{g/ml}$) resultaron tóxicas tanto para líneas celulares tumorales como para las no tumorales. Estas diferencias se presentaron al comparar con las células control (Vero) y entre las dos líneas celulares tumorales lo que indica que mediante el ensayo de MTT se induce un efecto citotóxico dependiente de tiempo y de concentración.

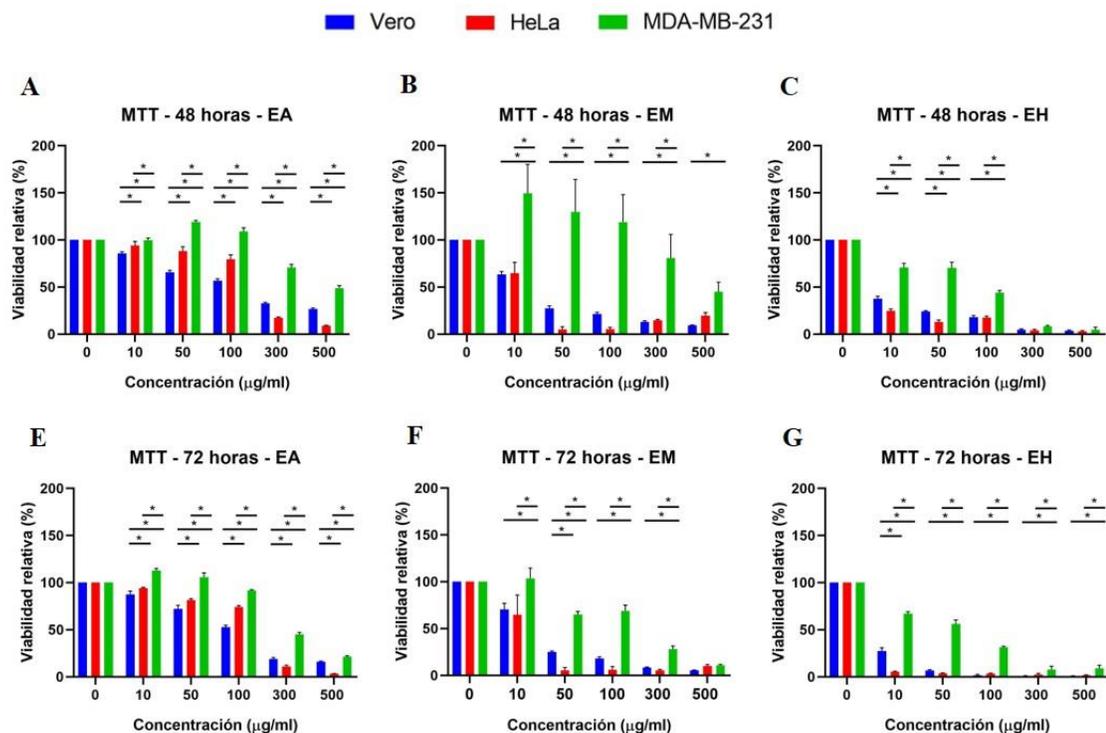


Figura 7.24 Análisis de citotoxicidad por ensayo de MTT en células tratadas por 12 y 24 h con diferentes concentraciones de extractos de *A. monostachya*. Se muestran los porcentajes de viabilidad relativa de las líneas Vero (no tumoral), HeLa y MDA-MB-231 (tumorales) expuestas a concentraciones de 0, 10, 50, 100, 300 y 500 µg/ml de EA (A y E), EM (B y F) y EH (C y D). n= 8. *P < 0.05, Prueba de comparación múltiple de Tukey vs células Vero.

La figura 7.25 muestra a manera de resumen, los resultados observados en las gráficas descritas anteriormente. Se comparó el comportamiento celular ante los extractos en función del tiempo. Hay que destacar que claramente las células Hela, a partir de las 24 h presentan menor porcentaje de viabilidad relativa, después de exposición a EA, EM y EH. Las células MDA-MB-231 presentaron un comportamiento irregular a las 12 y 24 h, observándose dependiente de tiempo y concentración a partir de las 48 h.

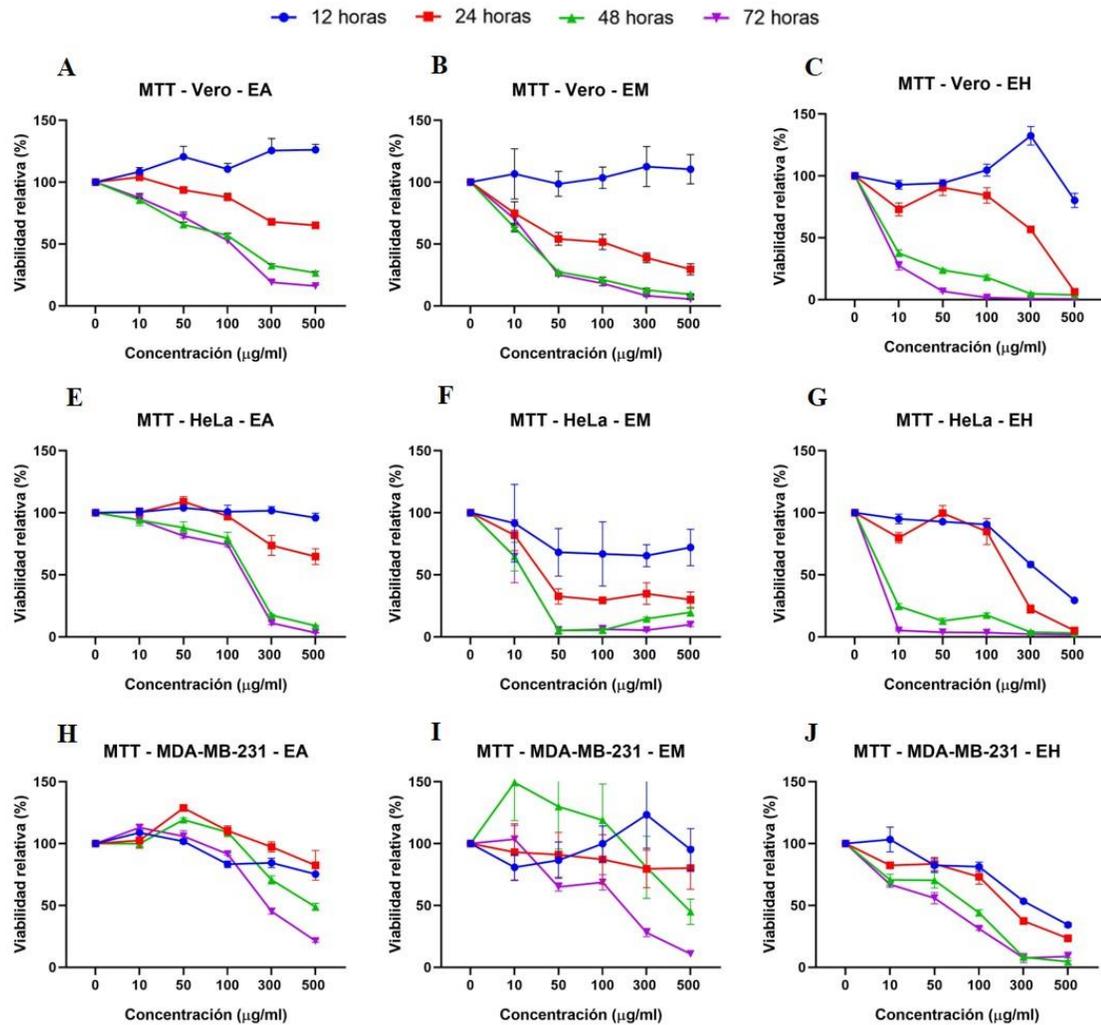


Figura 7.25 Comportamiento celular frente a diferentes concentraciones de extractos de *A. monostachya*, mediante ensayo de MTT. Se presentan comparaciones de los efectos en las 3 líneas celulares: Vero (A, E y H), HeLa (B, F e I) y MDA-MB-231 (C, G y J) ante la exposición a los 3 extractos a las 12 (línea azul), 24 (línea roja), 48 (línea verde) y 72 h (línea morada). Las gráficas muestran el % de área en función de la concentración de los extractos. Se aprecia que el EH posee mayor efecto citotóxico en las líneas celulares tumorales a partir de las 24 h. Las células HeLa presentaron mayor sensibilidad a los extractos. * = $P < 0.05$, Prueba de comparación múltiple de Tukey vs células Vero.

7.7 Las células tumorales humanas presentan más alteraciones morfológicas y nucleares frente a la exposición a los extractos de *A. monostahcya*.

Después de evaluar los cambios morfológicos por microscopia óptica, microscopia de fluorescencia y la citotoxicidad por el ensayo de MTT, se realizó un análisis morfológico a partir de cortes semifinos de un grosor de 350 nm los cuales se tiñeron con azul de toluidina con el fin de tener mayor resolución. Para esto se evaluó el efecto a las concentraciones en las que se observaron mayores cambios morfológicos y de viabilidad en los ensayos anteriores: para el EA, 300 y 500 $\mu\text{g/ml}$ y para EM y EH, 10 y 50 $\mu\text{g/ml}$.

Primero, se evaluaron las características morfológicas de las células sin tratamiento, las células Vero presentaron núcleos heterocromáticos, un nucléolo prominente, y un citoplasma homogéneo (Figuras 7.26 y 7.27, A).

Las células tumorales presentaron características similares, pero se observaron múltiples eventos mitóticos, tales como tamaño celular y nuclear más grande comparados con el control, de las cuales algunos presentan dos nucléolos (Figuras 7.26 y 7.27, E e I).

Las células tratadas, especialmente las tumorales, mostraron vacuolizaciones en el citoplasma al ser expuestas a la menor concentración probada (50 $\mu\text{g/ml}$ y 300 $\mu\text{g/ml}$) de los tres extractos. Estos efectos se acentuaron a la concentración más alta. También se observó condensación de la cromatina que tiende a concentrarse a la periferia del núcleo, lo que se relaciona con evento apoptótico.

Estos resultados también se presentaron de manera dependiente de concentración. Las células tumorales tratadas con 50 y 500 $\mu\text{g/ml}$ de los tres extractos, presentaron mayores alteraciones morfológicas (Figura 7.27).

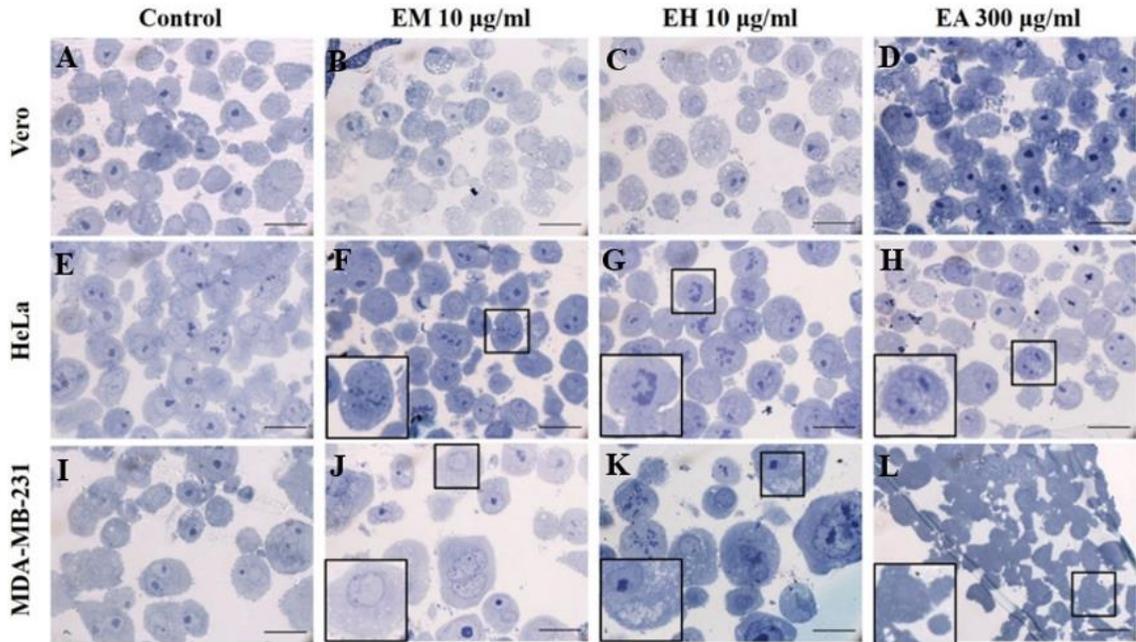


Figura 8.26 Evaluación de cambios morfológicos en cortes semifinos teñidos con azul de toluidina obtenidos a partir de células tratadas por 24 h con extractos de *A. monostachya*. Células tratadas con vehículo (A, E e I), con 10 µg/ml de EA (B, F y J), con 10 µg/ml de EM (C, G y L) y con 300 µg/ml de EH (D, H y M). Las ampliaciones muestran cambios en la morfología nuclear y en el citoplasma. Barra de escala = 20 µm

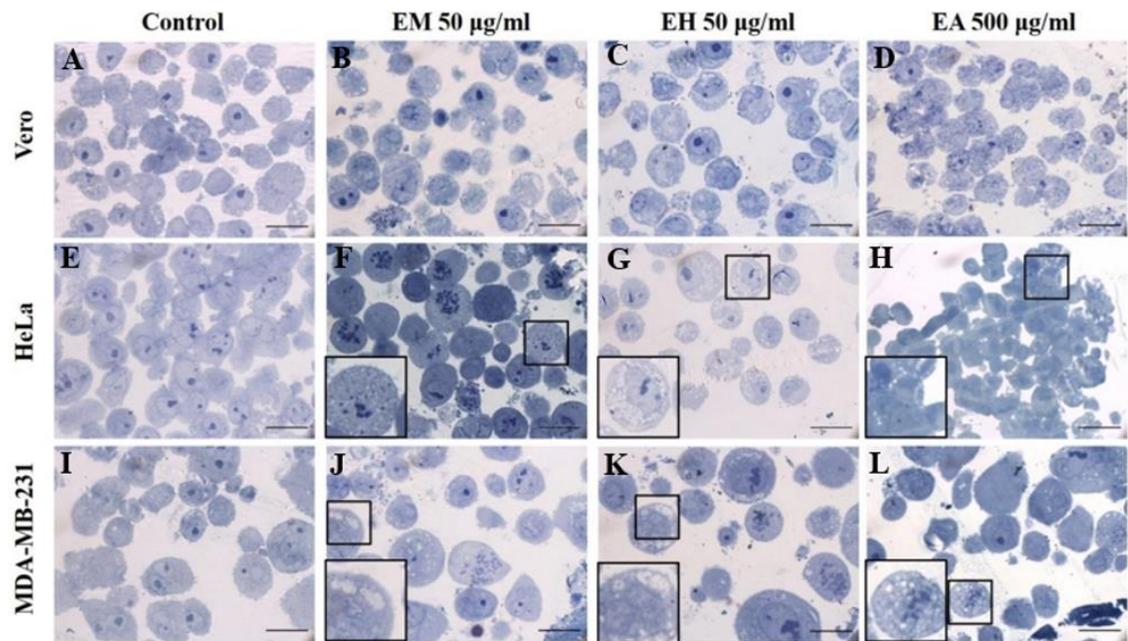


Figura 8.27 Evaluación de cambios morfológicos en cortes semifinos teñidos con azul de toluidina obtenidos a partir de células tratadas por 24 h con extractos de *A. monostachya*. Células tratadas con vehículo (A, E e I), 50 µg/ml de EA (B, F y J), 50 µg/ml de EM (C, G y L) o 500 µg/ml de EH (D, H y M). Las ampliaciones muestran cambios en la morfología nuclear y en el citoplasma. Barra de escala = 20 µm

Posteriormente se cuantificaron las células que presentaron cambios morfológicos indicativos de muerte celular. Los resultados coincidieron con los ensayos anteriores, se observó que las células HeLa presentaron diferencias significativas contra el control, así como un mayor número de células con cambios morfológicos relacionados con muerte celular, comparando con las células MDA-MB-231 y Vero (Figura 7.28).

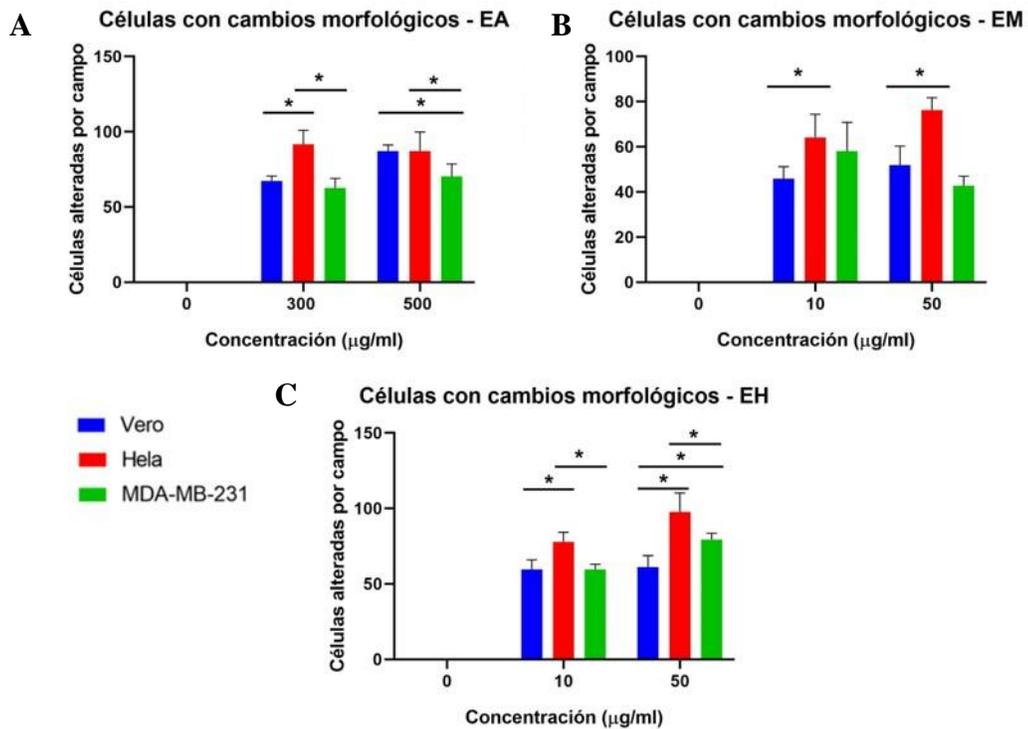


Figura 7.28 No. de células con alteraciones morfológicas relacionadas con muerte celular después de la exposición a tratamientos con extractos de *A. monostachya*. Línea celular Vero (no tumoral) (barra azul), HeLa (barra roja) y MDA-MB-231 (barra verde) (tumorales) expuestas a concentraciones de 0, 10, 50, 300 y 500 µg/ml de EA (A), EM (B) y EH (C). n = 8. *P < 0.05, Prueba de comparación múltiple de Tukey vs células Vero.

8. DISCUSIÓN

Los metabolitos secundarios de las plantas son compuestos químicos producidos por la célula vegetal a través de las vías metabólicas derivadas del metabolismo primario. Está demostrado que poseen efectos biológicos que proporcionan las bases de la medicina tradicional en comunidades antiguas (Rehab y Amira, 2018). En los resultados obtenidos en este estudio, destaca la presencia de compuestos fenólicos de tipo flavonoide, lo cual coincide con los estudios de Canales et al. (2011) quien también detectó compuestos fenólicos en el extracto metanólico de *A. monostachya*, a partir del cual se aislaron ácidos benzoicos, flavonas y flavonoles. Además, se aislaron ácidos grasos insaturados (ácido linolénico y linoleico) del extracto hexánico, compuestos que se relacionan con su actividad antimicrobiana, antioxidante y posiblemente a la actividad citotóxica demostrada en este estudio.

En el caso de otras especies de *Acalypha*, se detectaron, además, otro tipo de compuestos en los extractos de tipo acuoso y metanólico, obtenidos a partir de las hojas, tallos y raíces de *A. manniana*, *A. hispida*, *A. racemosa*, *A. marginata*, *A. indica* y *A. alnifolia* que corresponden a alcaloides, fenoles, flavonoides, hidroxiantraquinonas, saponinas, terpenos, taninos y esteroides, destacando la presencia de flavonoides en la planta completa (Noumedem et al. 2013; Iniaghe et al. 2009; Nazri et al. 2016; Evanjelene y Natarajan, 2012). Estos resultados coinciden con los resultados de nuestro estudio, al detectar grupos de compuestos similares en *A. monostachya*.

Por otro lado, la fracción hexánica obtenida a partir de un extracto metanólico crudo de *A. hispida*, mostró la presencia de flavonoides, carbohidratos, antraquinonas, glucósidos cardiacos, proteínas, alcaloides y ausencia de taninos, esteroides y saponinas (Onocha et al., 2011); en contraste, en nuestro estudio, las saponinas se detectaron en escasa cantidad en *A. monostachya*. Al respecto, Sepúlveda (2018) señala que las variaciones de metabolitos secundarios encontrados, que se presentan entre cada especie, o incluso entre la misma especie, se deben a diversos factores entre los que se encuentran la estación, la edad, el estado fenológico de la planta, estés hídrico, cantidad de nutrientes, ubicación geográfica e incluso las condiciones en las que se colectó, razón por la cual, probablemente se presentaron estas diferencias entre los metabolitos detectados.

Se ha demostrado que *A. indica* contiene compuestos de naturaleza no polar, con actividad antiinflamatoria y anticáncer, en los extractos hexánico y acetato de etilo, mostrando una potente inhibición de lipooxigenasas y ciclooxigenasas (Reddy, 2012), lo cual se puede relacionar con la alta actividad citotóxica detectada en EH de *A. monostachya*. Por otra parte, el extracto metanólico de *A. indica* contiene L-Quebrachitol, un compuesto utilizado para la síntesis de medicamentos contra el cáncer (Sanseera et al., 2012), lo que también se puede relacionar con la actividad de EM.

Los cambios morfológicos observados a microscopía óptica después de aplicar los tratamientos se han descrito anteriormente, como respuesta a la exposición de extractos vegetales. De acuerdo con Moongkarndi et al. (2004), estas alteraciones se describen como contracción de la membrana, redondeo, pérdida de contacto con las células vecinas, formación de ampollas de membrana y cuerpos apoptóticos, lo cual relaciona con muerte celular por apoptosis, esto nos indica que, en este estudio, la respuesta celular observada se atribuye principalmente a los extractos de *A. monostachya* y no a otros factores.

El MTT es uno de los métodos más utilizados para analizar la proliferación y viabilidad celular, se absorbe por endocitosis y se reduce mediante las enzimas mitocondriales y compartimientos endosomales/lisosomales para transportarse a las superficies celulares formando cristales de formazán en forma de aguja. Está previamente demostrado que el MTT no causa lesión ni induce muerte celular (Kuate et al., 2017). Los resultados de nuestro estudio se comparan y así mismo coinciden con los obtenidos por Chekuri et al. (2017) donde se demostró que el extracto crudo hexánico de *A. indica* posee una IC_{50} de 50 $\mu\text{g/ml}$ y el efecto citotóxico se observó a partir de la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ hasta la concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ donde se observó un ligero aumento en la viabilidad. Lo anterior sugiere que el/los compuestos bioactivos de *Acalypha* son de naturaleza no polar.

Se ha evaluado el efecto anti-proliferativo de extractos de *Acalypha* utilizando solventes de distintas polaridades siendo los no polares los que exhibieron mayor actividad, además de presentar una toxicidad selectiva para líneas celulares tumorales (Motadi et al., 2020) al igual que los extractos de *A. monostachya*. Por otra parte, señalan que una de las características típicas de la muerte celular por apoptosis es el encogimiento y condensación de la cromatina, lo cual se apreció en nuestro análisis con la tinción de

DAPI. Además, Syed et al. (2013) señalan que las células apoptóticas presentan condensación nuclear, escisión de la cromatina y cromatina condensada. Estos resultados también se observaron en nuestra investigación, al realizar el marcaje con DAPI en células tumorales expuestas a los tres extractos de *A. monostachya*. Estos resultados por sí solos nos sugieren que el tipo de muerte celular inducido se orienta a apoptosis, de acuerdo con lo observado.

Como se mencionó anteriormente, entre los cambios morfológicos encontrados por estos extractos se encuentran los relacionados con la apoptosis como fragmentación del DNA. Entre los posibles mecanismos de acción que se proponen, se tiene que *A. wilkesiana* deben activar simultáneamente distintos mecanismos que causan roturas de ADN de una sola hebra y de doble hebra que conducen a la apoptosis. Los constituyentes de los extractos pueden desencadenar diferentes vías apoptóticas en diferentes fenotipos de cáncer y ser específico de la célula cancerosa (Lim et al., 2011). De acuerdo con lo anterior, consideramos que los componentes de nuestros extractos también podrían estar induciendo muerte por apoptosis al inducir daño al ADN como se observó en el ensayo de contraste de núcleos con DAPI.

Por otra parte, Saansera et al. (año) describen que los extractos metanólico, hexánico y cloroformico de *A. indica* no fueron citotóxicos para células Vero, pero sí para las células tumorales NCIH-187, esto concuerda con nuestros resultados en donde observamos que los EM y EH de *A. monostachya* tampoco mostraron efecto citotóxico en células Vero.

De manera interesante, Rajkumar et al. (2010) reportaron un efecto antiproliferativo del EA sobre células MDA-MB-435s. En nuestro estudio, no se observó este efecto para el EA de *A. monostachya*, esto podría ser debido a diferencias entre especies del mismo género *Acalypha*.

La morfología celular cambia cuando sus condiciones de homeostasis se ven afectadas por distintos procesos entre los cuales se incluye la muerte celular. Estas alteraciones morfológicas involucran tanto al núcleo como al citoplasma y son similares en todos los tipos de células y especies (Häcker, 2011) Las principales características de la apoptosis son la condensación de la cromatina y la fragmentación nuclear, la condensación forma

una estructura en forma de media luna o anillo (Majno y Joris, 1995), lo cual se observó en los cortes semifinos y en el DAPI.

Una característica de la muerte celular por apoptosis ocurre cuando las células pierden contacto con las células vecinas y comienzan a formar protuberancias en la membrana plasmática conocidas como ampollas, las células se encojen y finalmente las ampollas se presentan formando los conocidos cuerpos apoptóticos (Hengartner, 2001), estas características se apreciaron a microscopía óptica de manera dependiente de concentración.

Por otro lado, la necrosis se diferencia en que presentan diversas características morfológicas, como dilatación de los orgánulos, en algunos casos se produce condensación de la cromatina e inflamación. En el caso de la muerte celular autofágica y no lisosómica, la primera se caracteriza por numerosas vacuolas en el citoplasma llenas de restos celulares y la segunda muestra una dilatación de orgánulos y espacios vacíos. A diferencia de la apoptosis, la membrana celular se vuelve permeable muy pronto (Clarke, 1990; Ziegler y Groscurth, 2004, González, 2005). Curiosamente, los resultados observados en los cortes semifinos indican que las células tumorales tratadas con los extractos de *A. monostachya* poseen características de ambos tipos de muerte celular.

Entre las alteraciones morfológicas observadas en el análisis morfológico mediante cortes semifinos, se encuentran una prominente vacuolización en el citoplasma y condensación nuclear, lo que pudiera estar relacionada también con muerte celular por autofagia. Por otra parte, Soto et al. (2018) mencionan que también se presentan alteraciones mitocondriales que se describen como marcadores de apoptosis temprana. Al perderse la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial, ingresa líquido provocando dilatación lo que se observa similar a vacuolización a microscopía óptica. Lo anterior nos indica que, para observar a mayor detalle las alteraciones en la morfología nuclear y conocer la composición de las vacuolas observadas en nuestro estudio, se sugiere evaluar estos cambios a microscopía electrónica de transmisión.

Por otra parte, existen otros tipos de muerte celular no apoptótica, descritas recientemente que también involucran la formación de vacuolas citoplasmáticas, relacionadas con la exposición a lesión isquémica, compuestos citotóxicos o patógenos, estas son la paraptosis, oncosis y methuosis (Shubin et al., 2016). Entre sus características se encuentran la inflamación y la vacuolización citoplasmática. En conjunto, las evidencias descritas anteriormente, sugieren que es necesario realizar pruebas que nos indiquen el tipo de muerte celular que se lleva a cabo en respuesta a la exposición a los extractos.

Respecto a la citotoxicidad observada y la resistencia de las células MDA-MB-231 a los extractos de *A. monostachya*, este comportamiento se ha observado anteriormente, al exponer a la misma línea celular a extractos de *Origanum majorana*, Hanane et al. (2018) menciona que se produce una expresión de survivina el cual es un objetivo terapéutico contra el cáncer de mama, lo que podría explicar el comportamiento que se observó por parte de la línea celular frente a los extractos de *A. monostachya*.

Estos resultados en conjunto proporcionan la información necesaria para continuar el estudio de los extractos de *A. monostachya*, de los cuales se demostró que poseen un efecto que se evidencia mediante cambios morfológicos nucleares y citoplasmáticos, además de un efecto citotóxico.

9. CONCLUSIONES

Esta investigación proporciona información del efecto de extractos de diferentes polaridades obtenidos a partir de *A. monostachya* sobre líneas tumorales humanas, demostrando que posee actividad citotóxica dependiente de tiempo y de concentración. Esto se evidenció mediante el uso de distintos métodos evaluando viabilidad relativa y la presencia de alteraciones morfológicas ante la exposición de los extractos. Así mismo, esta citotoxicidad es selectiva para las líneas celulares tumorales, destacando que las células HeLa presentaron más cambios morfológicos citoplasmáticos y nucleares, así como un menor porcentaje de viabilidad relativa al ser expuestas a los extractos, comparado con las células MDA-MB-231, las cuales respondieron de esta manera a concentraciones mayores. Esta actividad puede atribuirse a compuestos fenólicos detectados mediante el tamizaje fitoquímico realizado.

Las perspectivas de este trabajo se orientan a realizar un fraccionamiento guiado por bioensayo con el fin de obtener la fracción con el compuesto bioactivo y de esta manera aislarlo y purificarlo. Con los datos obtenidos, se podrá calcular la IC50 de los extractos crudos y posteriormente de sus distintas fracciones. Así mismo, es conveniente evaluar el efecto de los extractos en otras líneas celulares tumorales con el fin de comparar los cambios inducidos. Por último, es posible evaluar el tipo de muerte celular para establecer un mecanismo por el cual actúa el/los compuestos bioactivos presentes en *A. monostachya*.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abubakar, I. B., Lim, S., y Loh, H. (2018). Synergistic Apoptotic Effects of Tocotrienol Isomers and *Acalypha wilkesiana* on A549 and U87MG Cancer Cells Cancer is a group of disease caused by internal and external factors characterized by uncontrolled growth and spread of abnormal cells, resultant. *Tropical Life Sciences Research*, 29(1), 229–238.
- Calzada, F., Meckes, M., Cedillo-Rivera, R., Tapia-Contreras, A., & Mata, R. (1998). Screening of Mexican medicinal plants for antiprotozoal activity. *Pharmaceutical Biology*, 36(5), 305–309. <https://doi.org/10.1076/phbi.36.5.305.4653>
- Canales M., Hernandez T., Rodríguez M., Flores O., Jiménez E., Hernández L., Hernandez M., Trejo N., Ramírez., Julieta E., y Martínez, K. (2011). Evaluation of the antimicrobial activity of *Acalypha monostachya* Cav. (Euphorbiales: Euphorbiaceae). *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. Vol 5.
- Centro de prensa. (2017). OMS | Cáncer. Recuperado de 11 de febrero del 2020 de <https://www.who.int/topics/cancer/es/>
- Chekuri S, Panjala S, Anupalli RR. (2017) Cytotoxic activity of *Acalypha indica* L. hexane extract on breast cancer cell lines (MCF-7). *J Phytopharmacol*; 6(5):264-268.
- Chen, X., y Thibeault, S. (2013). Effect of DMSO concentration, cell density and needle gauge on the viability of cryopreserved cells in three dimensional hyaluronan hydrogel. *Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual International Conference*, 6228–6231.
- Chu, J. H.-Y. (2014). Investigating in vitro anticancer properties of Malaysian rainforest plants: *Acalypha wilkesiana* Mull, Arg. *Archidendron ellipticum* (Blume) Hassk. *Duabanga grandiflora* Walp. *Pseuduvaria macrophylla* (Oliv.) Merr. 263. Recuperado el 11 de mayo del 2020 de <http://eprints.nottingham.ac.uk/28017/>

- Clarke PG. (1990) Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol* 181: 195–213.
- El-Raey, M. A., Mohamed, T. K., El-Kashak, W. A., & Fayad, W. O. (2016). Phenolic constituents and biological activities of *Acalypha wilkesiana* forma tricolor muell arg seeds. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 8(3), 386–392.
- Emeka, P. M., Badger-Emeka, L. I., & Fateru, F. (2012). *In vitro* antimicrobial activities of *Acalypha* ornate leaf extracts on bacterial and fungal clinical isolates. *Journal of Herbal Medicine*, 2(4), 136-142.
- Estrada-Castillón, E., Villarreal-Quintanilla, J. Á., Rodríguez-Salinas, M. M., Encinas-Domínguez, J. A., González-Rodríguez, H., Figueroa, G. R., & Arévalo, J. R. (2018). Ethnobotanical Survey of Useful Species in Bustamante, Nuevo León, Mexico. *Human Ecology*, 46(1), 117–132.
- Evanjelene, V.K., y Natarajan, D. (2012). In Vitro Antioxidant and Phytochemical Analysis of *Acalypha alnifolia* Klein Ex Willd. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 1, 43-47.
- Globocan (2020) *All cancers*. Recuperado de <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf> el 15 de marzo del 2021.
- Globocan (2020) *Mexico Source*. Recuperado de <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-fact-sheets.pdf> el 15 de marzo del 2021.
- Gonzalez-Polo, R.-A. (2005). The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death. *Journal of Cell Science*, 118(14), 3091–3102.
- Gurib-Fakim, A. and Brendler, 2004. Medicinal and aromatic plants of Indian Ocean Islands, Medpharm, Mauritius, 87-89

- Gurib-Fakim, A., and Gueho, J. (1996). *Plantes Médicinal de Maurice, TOME 2. Edition de L'Océan Indien, Mauritius, 71-77.*
- Gutierrez-Lugo, M. T., Barrientos-Benítez, T., Luna, B., Ramirez-Gama, R. M., Bye, R., Linares, E., & Mata, R. (1996). Antimicrobial and cytotoxic activities of some crude drug extracts from Mexican medicinal plants. *Phytomedicine*, 2(4), 341–347. [https://doi.org/10.1016/s0944-7113\(96\)80079-1](https://doi.org/10.1016/s0944-7113(96)80079-1)
- Häcker G. (2000) The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.* Jul;301(1):5-17.
- Hanane M., Mouhcine E, Ahmed M., Mohammed E., Laila B., Mohammed A., (2018) "Cytotoxicity of the Aqueous Extract and Organic Fractions from *Origanum majorana* on Human Breast Cell Line MDA-MB-231 and Human Colon Cell Line HT-29", *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences.*
- Hengartner MO. (2001) Apoptosis: corralling the corpses. *Cell* 104: 325–328.
- Hoppe F., y Butz, K. (1993). Repression of endogenous p53 transactivation function in HeLa cervical carcinoma cells by human papillomavirus type 16 E6, human mdm-2, and mutant p53. *Journal of virology*, 67(6), 3111–3117.
- Iniaghe O.M., Malomo S.O and Adebayo J.O., (2009). Proximate Composition and Phytochemical Constituents of Leaves of Some *Acalypha* Species. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8: 256-258.
- Karunamoorthi, K., Jegajeevanram, K., Vijayalakshmi, J., y Mengistie, E. (2013). Traditional Medicinal Plants: A Source of Phytotherapeutic Modality in Resource-Constrained Health Care Settings. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 18(1), 67–74.
- Kikugawa, K., Hayatsu, H., y Ukita, T. (1967). Modifications of nucleosides and nucleotides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 134(2), 221–231.

- Kuete, V., Karaosmanoğlu, O., y Sivas, H. (2017). Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. *Medicinal Spices and Vegetables from África*, 271–297.
- Lim, S. W., Ting, K. N., Bradshaw, T. D., Zeenathul, N. A., Wiart, C., Khoo, T. J., ... Loh, H. S. (2011). *Acalypha wilkesiana* extracts induce apoptosis by causing single strand and double strand DNA breaks. *Journal of Ethnopharmacology*, 138(2), 616–623. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.10.005>
- Macías S., K. L., Juárez Flores, B. I., Cárdenas O., N. C., Aguirre R., J. R., & Jasso P., Y. (2009). Evaluación de plantas tradicionalmente utilizadas en la desinfección de heridas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 40(2), 5–10.
- Maiti R., González R. H. y Kumari A. (2016) Nutrient Profile of Native Woody Species and Medicinal Plants in Northeastern Mexico: A Synthesis. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 6 (5).
- Maiti, R., Rodriguez, H. G., Degu, H. D., Kumari, C. A., & Sarkar, N. C. (2016). Macro and Micronutrients of 44 Medicinal Plant Species Used Traditionally in Nuevo Leon, Mexico. *International Journal of Bio-Resource and Stress Management*, 7(5), 1054–1062. <https://doi.org/10.23910/ijbsm/2016.7.5.1638a>
- Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*. 1995 Jan;146(1):3-15. PMID: 7856735; PMCID: PMC1870771.
- Mendoza N. y Escamilla E., (2018). Introduction to Phytochemicals: Secondary Metabolites from Plants with Active Principles for Pharmacological Importance, Phytochemicals - Source of Antioxidants and Role in Disease Prevention, Toshiki Asao and Md Asaduzzaman, *IntechOpen*, Recuperado de 8 de Junio del 2021 de <https://www.intechopen.com/books/phytochemicals-source-of-antioxidants-and-role-in-disease-prevention/introduction-to-phytochemicals-secondary-metabolites-from-plants-with-active-principles-for-pharmaco>
- Moongkarndi P, Kosem N, Kaslungka S, Luanratana O, Pongpan N y Neungton N. (2004) Antiproliferation, antioxidation and induction of apoptosis by *Garcinia*

mangostana (mangosteen) on SKBR3 human breast cancer cell line. *J Ethnopharmacol*; 90(1):161-6.

Motadi, L. R., Choene, M. S., y Mthembu, N. N. (2020). Anticancer properties of *Tulbaghia violacea* regulate the expression of p53-dependent mechanisms in cancer cell lines. *Scientific reports*, 10(1), 12924.

Mur, C., Martínez-Carpio, P. A., Fernández-Montolí, M. E., Ramon, J. M., Rosel, P., y Navarro, M. A. (1998). Growth of MDA-MB-231 cell line: different effects of TGF-beta (1), EGF and estradiol depending on the length of exposure. *Cell biology international*, 22(9-10), 679–684.

National Cancer Institute. (2015). ¿Qué es el cáncer? - Recuperado el 10 de mayo de 2020, de <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>

National Cancer Institute. (2020). Tipos de tratamiento del cáncer - Recuperado el 10 de mayo de 2020, de <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>

Nazri, N. N. M., Hazali, N., Ibrahim, M., Masri, M., & Ayob, M. K. (2016). Preliminary studies on *Acalypha indica*: proximate analysis and phytochemical screening. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 8(3), 406-408.

Noumedem, J. A., Tamokou, J., Teke, G. N., Momo, R. C., Kuete, V., & Kuate, J. R. (2013). Phytochemical analysis, antimicrobial and radical-scavenging properties of *Acalypha manniana* leaves. *SpringerPlus*, 2, 503.

OMS, (2021) Medicina tradicional: definiciones. Recuperado el 15 de marzo del 2021 de https://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/

OMS, (2021) Temas de salud: Cáncer. Recuperado el 15 de marzo del 2021 de <https://www.who.int/topics/cancer/es/>

Onocha, P. A., Oloyede, G. K., & Afolabi, Q. O. (2011). Phytochemical investigation, cytotoxicity and free radical scavenging activities of non-polar fractions of *Acalypha hispida* (leaves and twigs). *EXCLI journal*, 10, 1–8.

- Popescu NC, DiPaolo JA, Amsbaugh SC (1987) Integration sites of human papillomavirus 18 DNA sequences on HeLa cell chromosomes. *Cytogenet Cell Genet*; 44(1):58-62.
- Rajkumar, V., Guha, G., & Ashok Kumar, R. (2010). Therapeutic potential of *Acalypha fruticosa*. *Food and Chemical Toxicology*, 48(6), 1709–1713.
- Rascón-Valenzuela, L., Jiménez-Estrada, M., Velázquez-Contreras, C., Garibay-Escobar, A., Vilegas, W., Campaner, L., Robles-Zepeda, R. E. (2015). Chemical composition and antiproliferative activity of *Acalypha californica*. *Industrial Crops and Products*, 69, 48–54.
- Reddy, T. (2012). Exploring the Anti-inflammatory and Anti-cancer compounds from the leaves of *Acalypha indica*. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. 4. 1-7. 10.9790/3008-0420107.
- Rehab A. Hussein y Amira A. El-Anssary (2018). Metabolitos secundarios de las plantas: los impulsores clave de las acciones farmacológicas de las plantas medicinales, *Medicina herbaria*, Philip F. Builders,
- Sanseera, D., Niwatananun, W., Liawruangrath, B., Liawruangrath, S., Baramée, A., Trisuwan, K., & Pyne, S. G. (2012). Antioxidant and anticancer activities from aerial parts of *Acalypha indica* Linn. *Chiang Mai University Journal of Natural Sciences*, 11(2), 157–168.
- Seebaluck, R., Gurib-Fakim, A., & Mahomoodally, F. (2015). Medicinal plants from the genus *Acalypha* (Euphorbiaceae) A review of their ethnopharmacology and phytochemistry. *Journal of Ethnopharmacology*, 159, 137–157.
- Sepúlveda-Vázquez, Jerónimo & Torres-Acosta, Felipe & Sandoval-Castro, Carlos & Martínez-Puc, Jesús & Chan-Pérez, J.I. (2018). La importancia de los metabolitos secundarios en el control de nematodos gastrointestinales en ovinos con énfasis en Yucatán, México. *Journal of the Selva Andina Animal Science*. 5. 79-95.

- Shubin, A. V., Demidyuk, I. V., Komissarov, A. A., Rafieva, L. M., & Kostrov, S. V. (2016). Cytoplasmic vacuolization in cell death and survival. *Oncotarget*, 7(34), 55863–55889.
- Soladoye, M.O., Sonibare, M.A., and Rosanwo, T.O. 2008. Phytochemical and morphometric analysis of the genus *Acalypha* Linn. (Euphorbiaceae). *Journal of Applied Sciences*, 8(17): 3044-3049.
- Soto-Domínguez, A., Ballesteros-Elizondo, R. G., Santoyo-Pérez, M. E., Rodríguez-Rocha, H., García-Garza, R., Nava-Hernández, M. P., Saucedo-Cárdenas, O. (2018). Peroxisomicine A1 (toxin T-514) induces cell death of hepatocytes *in vivo* by triggering the intrinsic apoptotic pathway. *Toxicon*; 09, 010.
- Syed Abdul Rahman, S. N., Abdul Wahab, N., & Abd Malek, S. N. (2013). In Vitro Morphological Assessment of Apoptosis Induced by Antiproliferative Constituents from the Rhizomes of *Curcuma zedoaria*. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, 257108.
- Tipos de tratamiento del cáncer - National Cancer Institute. (n.d.). Recuperado el 16 mayo del 2020 de <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>
- van Tonder, A., Joubert, A. M., y Cromarty, A. D. (2015). Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC research notes*, 8, 47.
- Ziegler, U., y Groscurth, P. (2004). Morphological Features of Cell Death. *Physiology*, 19(3), 124–128.

ANEXOS

A. Procedimientos

A.1 Técnica para inclusión en resinas epóxicas.

1. Fijación en glutaraldehído 2.5 % - 12 horas.
2. Lavado en buffer de cacodilatos 3 veces - 5 min cada lavado.
3. Postfijación en tetraóxido de osmio 2% - 30 min.
4. Lavado en buffer de cacodilatos 3 veces - 5 min cada lavado.
5. Nitrato de uranilo acuoso 1% - 30 min.
6. Lavado en buffer de cacodilatos 3 veces - 5 min cada lavado.
7. Acetona 30% - 5 min.
8. Acetona 50% - 5 min.
9. Acetona 70% - 5 min.
10. Acetona 90% - 5 min.
11. Acetona 100% 3 veces por - 5 min.
12. Acetona-Epón 1:1 1 h o toda la noche. Dejar evaporar bajo campana de extracción por 4 hrs o hasta que la resina se vuelva más viscosa.
13. Epón puro - 1 h.
14. Inclusión y polimerización de 12 a 72 h a 60°C.

A partir de los bloques se preparan cortes semifinos de aprox. De 350 nm de grosor, estos se montaron en portaobjetos y se tiñeron con azul de toluidina para su análisis mediante microscopia de luz.

B. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

B.1 PBS 10X

NaCl	8 g.
KCl	0.2 g.
Na ₂ HPO ₄	1.44 g.
KH ₂ PO ₄	0.24 g.

Ajustar pH a 7.2

Almacenar a 4 °C.

B.2 PBS 1X

* Para preparar 500 ml

PBS 10X	50 ml
Agua destilada	450 ml

Ajustar pH a 7.2

Almacenar a 4 °C.

B.4 Glutaraldehído 2.5 %

Glutaraldehído 25 %	10 ml
Buffer de cacodilatos 0.1 M pH 7.4	90 ml

B.5 Buffer de Cacodilatos 0.1 M pH 7.4

Solución A

Cacodilato de Sodio	4.28 g.
Agua destilada	100 ml

Solución B

Ácido Clorhídrico	0.5 ml
Agua destilada	25 ml

Solución de trabajo	
Solución A	100 ml
Solución B	5.4 ml

Aforar a 200 ml con agua destilada.

B.6 Tetraóxido de osmio 2 %

Tetraóxido de osmio	1 g.
Buffer de cacodilatos 0.1 M pH 7.4	50 ml

B.7 Nitrato de uranilo acuoso 1%

Nitrato de uranilo	1 g.
--------------------	------

Aforara a 100 ml

B.8 Resina epóxica

En este estudio se preparó resina epóxica MEDIA

Resina	23.8 ml (29 g)
DDSA	16.0 ml (16 g)
NMA	11.5 ml (14.3 g).
DMP 30	1 ml (1 g).

B.9 Borato de sodio 5 %

Borato de sodio (Borax)	5 g.
Agua destilada	100 ml

* Se calienta hasta que se disuelva completamente

B.10 Azul de toluidina

1 g.

* Se agrega el azul de toluidina a la solución de borato de sodio 5%, se agita para disolver y se filtra.