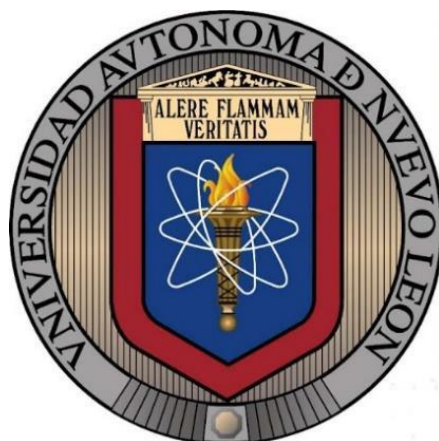


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA *IN VITRO* DEL
EXTRACTO METANÓLICO DE *COLEUS HADIENSIS* Y DETERMINACIÓN
DE LOS CAMBIOS METABÓLICOS EN LA LÍNEA CELULAR HTB-177.**

Por

Q.F.B ANA LAURA VALDEZ ARELLANES

**Como requisito para obtener el Grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS con
Orientación en Farmacia**

Diciembre 2023

Aprobación de la Tesis:

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA *IN VITRO* DEL
EXTRACTO METANÓLICO DE *COLEUS HADIENSIS* Y DETERMINACIÓN DE
LOS CAMBIOS METABÓLICOS EN LA LÍNEA CELULAR HTB-177.”

DRA. KARLA RAMÍREZ ESTRADA
Presidente

DR. OMAR GONZÁLEZ SANTIAGO
Secretario

DRA. MARÍA DEL RAYO CAMACHO CORONA
Vocal

DRA. MARIA ELENA CANTÚ CARDENAS
Sub-Directora de posgrado

Revisión de la Tesis:

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA *IN VITRO* DEL
EXTRACTO METANÓLICO DE *COLEUS HADIENSIS* Y DETERMINACIÓN DE
LOS CAMBIOS METABÓLICOS EN LA LÍNEA CELULAR HTB-177.”

Dra. Karla Ramírez Estrada
Directora de tesis

Dra. Mónica Azucena Ramírez Cabrera
Co-Directora interna de tesis

Dra. María del Rayo Camacho Corona
Comité tutorial

Dra. Elida Marcela Aguilar Bravo
Comité tutorial

Dr. Omar González Santiago
Comité tutorial

RESUMEN

Q.F.B Ana Laura Valdez Arellanes

Fecha de graduación: diciembre 2023

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del proyecto: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA *IN VITRO* DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *COLEUS HADIENSIS* Y DETERMINACIÓN DE LOS CAMBIOS METABÓLICOS EN LA LÍNEA CELULAR HTB-177.

Número de páginas: 115

Candidata para la Maestría en Ciencias con Orientación en Farmacia

Propósito y método de estudio: Las plantas medicinales son unas de las alternativas terapéuticas más empleadas por los humanos, y lo han sido a lo largo de su evolución, por sus cualidades preventivas y curativas contra diversas enfermedades. Las especies vegetales son una fuente rica de recursos (algodón, frutos, madera, lino, etc.) y moléculas llamados metabolitos secundarios, que son productos activos con potencial uso farmacéutico, por lo que, los fitocompuestos, son de interés en la investigación para la búsqueda de nuevos tratamientos en diferentes enfermedades, tales como el cáncer. Actualmente se sigue en la búsqueda de nuevos tratamientos y estrategias para combatir esta enfermedad. Un objetivo de esta búsqueda es el metabolismo de las células cancerosas. En el cáncer, las células presentan un metabolismo anormal o alterado que ayuda a la célula a desarrollar ciertas capacidades

(hallmarks) que son características de la enfermedad. Los hallmarks son blancos terapéuticos por lo que las nuevas investigaciones contra el cáncer sugieren que si se regula el metabolismo alterado que beneficia el desarrollo de estas capacidades, es una manera de atacar a las células cancerosas.

Coleus hadiensis es una planta aromática nativa de África, en donde ha sido utilizada en la medicina tradicional por sus propiedades en el aparato digestivo y respiratorio. Esta planta es rica en terpenos y compuestos fenólicos a los que se les atribuyen diversas actividades biológicas, tales como antibacteriana, antifúngica, antiinflamatoria, entre otras¹. En años recientes han surgido investigaciones en donde se estudia la actividad anticancerígena de esta planta en algunos tipos de cáncer tales como, cáncer de colon y cáncer cervical. Por lo tanto, en este proyecto se busca probar la actividad anticancerígena *in vitro* del extracto metanólico de *C. Hadiensis* en cáncer de pulmón y si este tiene un efecto en el metabolismo anormal en las células de cáncer, lo que contribuiría positivamente a la búsqueda y evaluación de nuevos tratamientos derivados de fitoquímicos.

En este proyecto se realizó la evaluación citotóxica y anticancerígena *in vitro* del extracto metanólico de *C. hadiensis* sobre la línea celular Vero y HTB-177 por medio de la prueba MTT y se determinó la actividad moduladora del metabolismo en ambas líneas celulares por la técnica de Resonancia Magnética Nuclear, con la finalidad de obtener información sobre el mecanismo de la actividad biológica del extracto de la planta.

Contribuciones y conclusiones:

Como resultado de la evaluación de la citotoxicidad y actividad anticancerígena *in vitro* se obtuvo, que el extracto metanólico de *C. hadiensis* presentó actividad anticancerígena con un IC₅₀ de 192.85 µg/mL para las células HTB-177. El extracto presentó menor citotoxicidad alcanzando un IC₅₀ de 618 µg/mL en las células Vero. Estos resultados arrojaron un índice de selectividad de 3.20, lo que indica una alta selectividad hacia las células cancerosas por parte del extracto metanólico de *C.hadiensis*. En el análisis metabolómico se observaron cambios principalmente en el metabolismo de las células HTB-177 mientras que en las células Vero resultaron ser menos evidentes. El análisis reveló que el tratamiento con el extracto metanólico de *C. hadiensis* interfirió en el metabolismo energético, la síntesis de fosfolípidos de membrana y el metabolismo de los aminoácidos.

FIRMA DEL ASESOR_____

Dra. Karla Ramírez Estrada

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Autónoma de Nuevo León** y en especial a la **Facultad de Ciencias Químicas** por darme la oportunidad de ser parte de su alumnado en la maestría.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por la beca otorgada en estos dos años.

Al la **División de Estudios de Posgrado** de la Facultad de Ciencias Químicas por las instalaciones prestadas.

Al **Laboratorio de Ingeniería Genética y Genómica** de igual manera por darme la oportunidad de trabajar en dichas instalaciones durante mis estudios y por el apoyo brindado.

Al **Laboratorio de Metabolismo Celular** por todo el apoyo brindado, por las instalaciones prestadas durante estos dos años y por ser como mi segunda familia dentro de la facultad.

A la **Dra. Karla Ramírez Estrada** por darme la oportunidad de ser su alumna, por su apoyo incondicional, su atención y confianza, le agradezco todo lo que he aprendido de ella. Es una excelente asesora, investigadora, maestra y mujer, muchas gracias, Dra. Karla.

A la **Dra. Mónica Azucena Ramírez Cabrera** por todos los consejos, recomendaciones y sobre todo el apoyo otorgado durante mi proyecto. Por siempre estar al pendiente de lo que necesitaba y de mis avances, muchas gracias.

A la **Dr. Emanuel Hernández Núñez** por su apoyo, recomendaciones y enseñanzas que me ayudaron a obtener los resultados de este proyecto.

A mi comité tutorial: **Dra. María del Rayo Camacho Corona, Dra. Elida Marcela Aguilar Bravo y el Dr. Omar Gonzáles Santiago** por la disponibilidad, apoyo y sus sugerencias brindadas para la realización de esta tesis.

DEDICATORIAS

A mis padres, por siempre apoyarme incondicionalmente, por motivarme a continuar, por haberme forjado como la persona que soy, los logros que tengo se los debo a ustedes.

A mis hermanos, por siempre estar a mi lado, por su apoyo y cariño.

A Kevin, por impulsarme a continuar y no dejar que me rindiera, por estar a mi lado en todo momento y por ser mi compañero en el camino.

A mis sobrinos, que son mi alegría.

A todas las personas que hicieron posible la realización de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

| Capítulo..... | Página |
|--|---------------|
| TABLA DE CONTENIDO | IX |
| ÍNDICE DE FIGURAS | XII |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | XVII |
| SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS..... | XVIII |
| CAPITULO 1..... | 1 |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Productos naturales..... | 1 |
| 1.2 Cáncer..... | 4 |
| 1.3 Vías metabólicas alteradas en cáncer..... | 10 |
| 1.3.1 Glucólisis y producción de lactato | 10 |
| 1.3.2 Glutaminólisis..... | 11 |
| 1.3.3 Succinato..... | 11 |
| 1.3.4 Vía de las Pentosas Fosfato..... | 12 |
| 1.3.5 Síntesis de lípidos..... | 12 |
| 1.4 Los Hallmarks y el metabolismo del cáncer..... | 13 |
| 1.5 Rutas metabólicas alteradas en cáncer de pulmón | 15 |
| 1.6 Metabolitos secundarios vegetales que se utilizan para combatir el cáncer | 17 |
| CAPITULO 2..... | 22 |
| ANTECEDENTES..... | 22 |
| CAPITULO 3..... | 26 |
| 3.1 JUSTIFICACIÓN | 26 |

| | |
|---|----|
| 3.2 HIPÓTESIS | 26 |
| 3.3 OBJETIVOS | 27 |
| 3.3.1 Objetivo general | 27 |
| 3.3.2 Objetivos específicos..... | 27 |
| CAPITULO 4 | 28 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 28 |
| 4.1 MATERIAL | 28 |
| 4.1.1 Material biológico | 28 |
| 4.1.1.2 Material vegetal..... | 28 |
| 4.2 MÉTODOS | 30 |
| 4.2.1 Obtención del extracto metanólico de <i>C. hadiensis</i> | 30 |
| 4.2.2 Evaluación de la citotoxicidad y actividad anticancerígena <i>in vitro</i> | 30 |
| 4.2.3 Análisis de metaboloma por RMN | 34 |
| 4.2.4 Residuos..... | 38 |
| CAPITULO 5 | 39 |
| RESULTADOS | 39 |
| 5.1 Obtención del extracto metanólico de <i>C. hadiensis</i> | 39 |
| 5.2 Citotoxicidad en la línea Vero | 39 |
| 5.3 Actividad anticancerígena <i>in vitro</i> en la línea HTB- 177 | 42 |
| 5.3.1 Comparación de los efectos del extracto y el fármaco de referencia vincristina en ambas líneas celulares | 44 |
| 5.4 Análisis del metaboloma de células Vero y HTB-177 | 47 |
| 5.4.1 Espectros de ¹ H RMN..... | 47 |
| 5.4.2 Metabolómica no dirigida. Análisis multivariado no dirigido. | 51 |

| | |
|---|------------|
| 5.4.3 Metabolómica dirigida. Metabolitos identificados | 55 |
| 5.4.4 Cuantificación relativa de los metabolitos identificados | 56 |
| 5.4.7 Análisis multivariado (MVDA) dirigido | 71 |
| 5.4.5 Metabolitos diferenciales..... | 75 |
| 5.4.6 <i>Heatmap</i> | 79 |
| CAPITULO 6..... | 83 |
| DISCUSIÓN | 83 |
| 6.1 Evaluación de la capacidad citotóxica y anticancerígena <i>in vitro</i>..... | 83 |
| 6.2 Análisis del metaboloma por ¹H RMN | 85 |
| CAPITULO 7..... | 99 |
| CONCLUSIONES | 99 |
| CAPITULO 8..... | 101 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 101 |
| CAPITULO 9..... | 114 |
| ANEXOS..... | 114 |
| 9.1 Preparación del medio de cultivo | 114 |
| 9.2 Preparación de la Solución de Buffer de Fosfatos (PBS)..... | 114 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura | Página |
|--|---------------|
| Figura 1. Tipos de cáncer con mayor incidencia (A) y mortalidad (B) en el mundo en ambos sexos, estudio del año 2020. (Gráficas editadas y datos tomados de Globocan 2020 ²)..... | 5 |
| Figura 2. Tipos de cáncer con mayor incidencia en México en ambos sexos, estudio del año 2020. (Gráficas editadas y datos tomados de Globocan 2020 ³)..... | 6 |
| Figura 3. Tipos de cáncer con mayor mortalidad en México en ambos sexos, estudio del año 2020. (Gráficas editadas y datos tomados de Globocan 2020 ³)..... | 7 |
| Figura 4. Hallmarks del cáncer y la influencia de los metabolitos o procesos metabólicos en cada una de estas características oncogénicas. Las características del cáncer comprenden ocho sellos distintos y dos características habilitadoras (subrayado). Los rasgos pueden adquirirse en diferentes etapas del desarrollo de cáncer. Figura modificada, ,tomada de Wishart, et al. 2019..... | 8 |
| Figura 5. Imagen modificada de Chang 2020. Rutas alteradas en el metabolismo de células de cáncer de pulmón. GLUT (Glucotransportadores); TMC (Transportadores de monocarboxilato); G6P (Glucosa-6 fosfato), FEP (Fosfoenolpiruvato); LDH-A (Lactato deshidrogenasa A); ERO (Especies reactivas de oxígeno); ACLY (ATP citrato liasa)..... | 16 |

Figura 6. Mecanismos de acción de fitoquímicos o extractos de plantas dentro del metabolismo de células cancerosas. GLUT (Glucotransportadores); TMC (Transportadores de monocarboxilato); G6P (Glucosa-6 fosfato), 3-FG (3-fosfoglicerato); FEP (Fosfoenolpiruvato); LDH-A (Lactato deshidrogenasa A); 3-FHP (3- Fosfohidroxipiruvato); PHGDH (Fosfoglicerato deshidrogenasa); PSAT1 (Fosfoserina aminotransferasa); G6PD (Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa); α -KG (Alfa-cetoglutarato); GLUD2 (Glutamato deshidrogenasa 2); GLUD1 (Glutamato deshidrogenasa 1); GLS1 (Glutaminasa); SLC1A5 (Transportador de aminoácidos neutro B); ACLY (ATP citrato liasa); ACC1 (Acetil-CoA carboxilasa); FASN (Ácido graso sintasa).....**19**

Figura 7. Evaluación de la citotoxicidad del extracto metanólico de *C. hadiensis*. Porcentaje de viabilidad celular de las células Vero obtenido después de 48 h de exposición al extracto metanólico de *C. hadiensis* o el anticancerígeno vincristina como fármaco de referencia. Viabilidad celular medida mediante la prueba de MTT por triplicado.....**41**

Figura 8. Evaluación de la actividad anticancerígena del extracto metanólico de *C.hadiensis*.....**44**

Figura 9. Comparación del porcentaje de la viabilidad obtenida en ambas líneas celulares expuestas al extracto metanólico de *C. hadiensis*.....**45**

Figura 10. Comparación del porcentaje de la viabilidad obtenida en ambas líneas celulares expuestas a la vincristina.....**46**

| | | |
|-------------------|---|-----------|
| Figura 11. | Espectros ¹ H RMN apilados correspondientes al extracto intracelular polar de células Vero, control sin tratamiento (A), células Vero expuestas al extracto por 48h (B), células HTB-177 control sin tratamiento (C) y células HTB-177 expuestas al extracto por 48h (D)..... | 48 |
| Figura 12. | Espectros ¹ H RMN apilados correspondientes al extracto intracelular lipofílico de células Vero, control sin tratamiento (A), células Vero expuestas al extracto por 48h (B), células HTB-177 control sin tratamiento (C) y células HTB-177 expuestas al extracto por 48h (D)... | 49 |
| Figura 13. | Espectros ¹ H RMN apilados correspondientes al extracto extracelular (medio de cultivo) de células Vero, control sin tratamiento (A), células Vero expuestas al extracto por 48h (B), células HTB-177 control sin tratamiento (C) y células HTB-177 expuestas al extracto por 48h (D)... | 50 |
| Figura 14. | Análisis no dirigido de PCA del efecto del extracto de <i>C. hadiensis</i> en las células Vero y HTB 177 con y sin tratamiento..... | 52 |
| Figura 15. | Análisis no dirigido de sPLS-DA del efecto del extracto de <i>C. hadiensis</i> en las células Vero y HTB 177 con y sin tratamiento..... | 54 |
| Figura 16. | Concentración de carbohidratos y metabolitos orgánicos en el extracto intracelular (A) y extracelular (B)..... | 60 |
| Figura 17. | Concentración de aminoácidos en el extracto intracelular (A) y extracelular (B)..... | 63 |
| Figura 18. | Concentración de cuerpos cetónicos en el extracto intracelular (A) y extracelular (B)..... | 65 |

| | | |
|-------------------|--|-----------|
| Figura 19. | Concentración metabolitos alcoholes y aminas en el extracto intracelular (A) y extracelular (B)..... | 67 |
| Figura 20. | Comparación de metabolitos diferenciales entre muestras tratadas y los controles de los extractos intracelulares polar y lipofílico de células Vero (A) y HTB-177 (B). El asterisco (*) indica los metabolitos que tienen Log ₂ (FC) con valor p < 0,05..... | 69 |
| Figura 21. | Comparación de metabolitos diferenciales entre muestras tratadas y los controles de los extractos extracelular de células Vero (A) y HTB-177 (B). El asterisco (*) indica los metabolitos que tienen Log ₂ (FC) con valor p < 0,05..... | 71 |
| Figura 22. | Análisis dirigido de PCA del extracto polar de células Vero y HTB 177 (A), análisis del extracto lipofílico (B) y extracto extracelular (C). Donde los círculos verdes son el control de células Vero, celestes el tratamiento, los rosas son el control de HTB 177 y los morados el tratamiento..... | 73 |
| Figura 23. | Análisis dirigido sPLS-DA del extracto polar de células Vero y HTB 177 (A), análisis del extracto lipofílico de células Vero y HTB-177 (B), análisis extracelular de células Vero y HTB 177 (C). Donde los círculos rosas son las réplicas de los controles y los verdes las réplicas de los tratamientos..... | 75 |
| Figura 24. | Importancia variable en la proyección (VIP). Metabolitos variables en los extractos intracelulares y extracelulares de células control y tratadas de Vero (A y C) y HTB-177 (B y D). Los recuadros coloreados a la derecha | |

| | | |
|-------------------|---|-----------|
| | indican las concentraciones relativas del metabolito correspondiente en cada grupo en estudio..... | 78 |
| Figura 25. | <i>Heatmap</i> donde se visualizan los perfiles metabólicos intracelulares polares y lipofílicos de células Vero y HTB-177..... | 81 |
| Figura 26. | <i>Heatmap</i> donde se visualizan los perfiles metabólicos extracelulares de células Vero y HTB-177..... | 82 |
| Figura 27. | Mapa metabólico de principales vías afectadas en células HTB-177(donde el control es la barra roja y el tratamiento es la barra verde) y su comparación con células Vero (donde el control es la barra amarilla y el tratamiento es la barra morada)..... | 98 |

ÍNDICE DE TABLAS

| Tabla | Página |
|---|---------------|
| Tabla 1. Metabolitos secundarios encontrados en <i>C. hadiensis</i> y su actividad reportada..... | 3 |
| Tabla 2. Metabolitos secundarios utilizados en cáncer y sus mecanismos..... | 18 |
| Tabla 3. Metabolitos derivados de plantas y su efecto en el metabolismo de ciertos tipos de cáncer..... | 21 |
| Tabla 4. Porcentaje de viabilidad celular de Vero expuestas a distintas concentraciones del extracto metanólico y el fármaco de referencia vincristina..... | 42 |
| Tabla 5. Porcentaje de viabilidad celular de las células HTB-177 expuestas a distintas concentraciones del extracto metanólico y el fármaco de referencia vincristina..... | 44 |
| Tabla 6. Nombres, desplazamiento químico y clasificación por ruta metabólica de los 34 metabolitos identificados en los extractos obtenidos de las muestras celulares..... | 56 |

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

| | |
|------------------------|--|
| % | porcentaje |
| °C | grados centígrados |
| * | $P \leq 0.05$ |
| ** | $P \leq 0.01$ |
| ** | $P \leq 0.001$ |
| nm | nanómetros |
| cm² | centímetro cuadrado |
| mg | miligramo |
| µg | microgramo |
| mL | mililitro |
| L | litro |
| IC₅₀ | concentración inhibitoria 50 |
| h | hora |
| rpm | revoluciones por minuto |
| ANOVA | análisis de varianza |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| EMEM | medio esencial mínimo |
| PBS | solución buffer de fosfatos |
| pH | potencial de hidrogeno |
| MTT | metiltriazol tetrazolio |
| TSP | 3-trimetilsilil propionato de sodio-d4 |

| | |
|-----------------------|---------------------------------------|
| EDTA | ácido etilendiaminotetraacético |
| D₂O | agua deuterada |
| GLUT | glucotransportadores |
| TMC | transportadores de monocarboxilato |
| G6P | glucosa-6 fosfato |
| 3-FG | 3-fosfoglicerato |
| FEP | fosfoenolpiruvato |
| LDH-A | lactato deshidrogenasa |
| 3-FHP | 3- Fosfohidroxipiruvato |
| PHGDH | fosfoglicerato deshidrogenasa |
| PSAT1 | fosfoserina aminotransferasa |
| G6PD | glucosa-6-fosfato deshidrogenasa |
| α-KG | alfa-cetoglutarato |
| GLUD2 | glutamato deshidrogenasa 2 |
| GLUD1 | glutamato deshidrogenasa 1 |
| GLS1 | glutaminasa |
| SLC1A5 | transportador de aminoácidos neutro |
| ACLY | ATP citrato liasa |
| ACC1 | acetil-CoA carboxilasa |
| FASN | ácido graso sintasa |
| LAT 1 | transportador de aminoácidos tipo L 1 |

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Productos naturales

Las plantas medicinales son una de las alternativas más empleadas por los seres humanos, y lo han sido a lo largo de su evolución, por sus cualidades preventivas y curativas contra diversas enfermedades y sus síntomas⁴. La mayor parte de los tratamientos tradicionales involucra el uso de extractos de plantas o sus principios activos. Aunque no se conoce el dato exacto para evaluar la extensión del uso de plantas medicinales a nivel global, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que aproximadamente el 80% de la población de regiones con menor desarrollo utiliza la medicina tradicional de plantas para satisfacer las necesidades primarias de salud⁵.

Las plantas conforman un recurso muypreciado en los sistemas de salud de países en desarrollo. Como bien lo menciona la definición de planta medicinal según la OMS; *cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden usarse para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos*⁶, las plantas son una fuente

rica e interminable de recursos y moléculas, por tanto, los fitocompuestos representan una fuente importante de productos activos con potencial uso farmacéutico.

Las plantas producen una amplia y diversa variedad de compuestos orgánicos llamados metabolitos secundarios, los cuales no participan directamente en el crecimiento y desarrollo de las especies vegetales. Estos compuestos son un grupo de sustancias químicas entre las cuales podemos citar alcaloides, flavonoides, terpenos, entre otros, los cuales pueden poseer diversas actividades biológicas por lo que se han utilizado y se siguen usando ampliamente en la formulación de medicamentos⁶.

Coleus hadiensis también conocida como la planta de vick⁷, es una planta semisuculenta, entre arbustiva y herbacéa, muy aromática que al tocar libera un olor a “vaporub”. Esta planta pertenece a la tribu *Ocimeae* de la familia *Lamiaceae*⁷. Las plantas del género *Coleus* comprenden 300 especies que tienen una gran diversidad de usos etnobotánicos, aproximadamente el 85% de las especies se utilizan con fines medicinales. Esta planta aromática es nativa de África, en donde ha sido utilizada en la medicina tradicional por sus propiedades en el aparato digestivo y respiratorio. El género es una fuente importante de metabolitos secundarios principalmente en terpenos, flavonoides y compuestos fenólicos, que poseen efectos citotóxicos, antiproliferativos, antibacterianos, antifúngicos y anticancerosos¹. Algunos de los metabolitos secundarios encontrados en la planta se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Metabolitos secundarios encontrados en *C. hadiensis* y su actividad reportada

| Clase | Tipo de metabolito | Actividad reportada | Referencia |
|-----------------------|---------------------------------|---|-------------------|
| Terpenos | Plectrantonona | Anticancerígena | 8 |
| | Geraniol | Antioxidante Antiinflamatoria Anticancerígena | 9 |
| Flavonoides | Ayanin | Antibacteriana | 10 |
| | Crisosplenol D | Antiinflamatoria | 11 |
| | Quercetina 3, 7-dimetiléter | Vasorelajante | 12 |
| | Casticina | Anticancerígena Analgésica Antiinflamatoria | 13 |
| | Luteolina 7- O - glucurónido | Antiinflamatoria | 14 |
| Ácido fenólico | Ácido rosmarínico | Anticancerígena | 15 |

A lo largo de la historia el uso de plantas como medicamentos ha implicado el aislamiento de los compuestos activos que producen acciones fisiológicas sobre el cuerpo humano. Un ejemplo claro es el aislamiento de la morfina del opio a principios del siglo XIX. Aunque se buscan específicamente las moléculas bioactivas, se siguen probando extractos completos de plantas medicinales que ejerzan una actividad en el tratamiento o prevención de enfermedades. Tal es el caso del extracto metanólico del árbol *Anogeissus leiocarpa* empleado en el tratamiento de la tuberculosis, el extracto acuoso de *Verbascum fruticosum* usado en el tratamiento de la neumonía, y los extractos metanólicos de *Curcuma longa* usados para el asma¹⁶.

A lo largo del tiempo, se han investigado y utilizado, tanto extractos vegetales como metabolitos secundarios aislados de estos, para el tratamiento del cáncer.

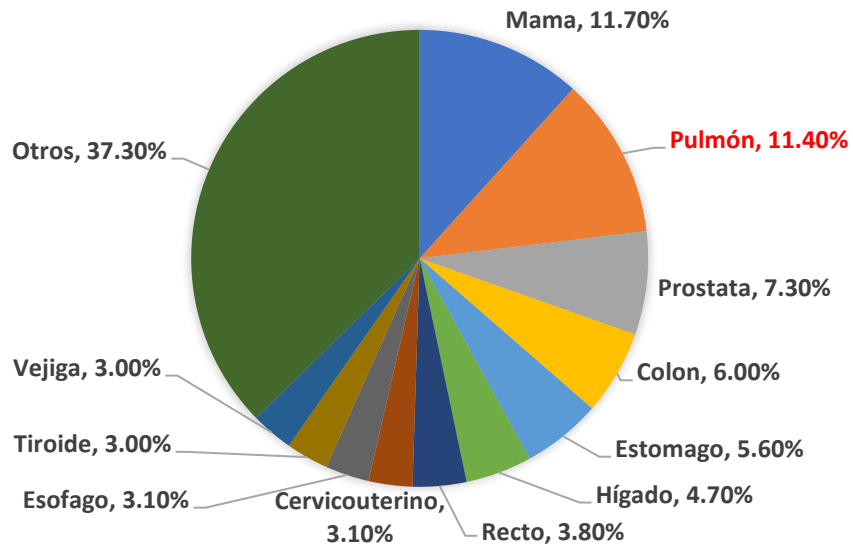
Algunos extractos alcohólicos de plantas como *Aloe castellorum* y *Ricinus communis* han demostrado tener actividad anticancerígena (en cáncer de colon y en cáncer de mama, respectivamente)^{17,18} y actualmente hay quimioterapéuticos ya aislados paclitaxel, topotecán, vincristina, irinotecán, entre otros, que son metabolitos provenientes de plantas¹⁹.

1.2 Cáncer

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por el crecimiento y diseminación incontrolados de células, puede comenzar y afectar en casi cualquier órgano o tejido¹⁹. En el año 2020 hubo 19.2 millones de casos nuevos, y se considera una de las principales causas de muerte en todo el mundo, con un estimado de 9.9 millones de muertes en el año 2020. Los tipos de cáncer más comunes en orden son: mama, pulmón, próstata, colon, estómago e hígado, de los cuales el cáncer de pulmón es el que tiene mayor tasa de mortalidad².

A nivel mundial, los casos y las muertes por cáncer de pulmón siguen aumentando. En 2020, Globocan estimó 2.2 millones de casos nuevos (representando el 11.4% del total de casos de cáncer), tasas más altas que las reportadas anteriormente en el año 2018, lo que convierte al cáncer de pulmón en uno de los tipos más frecuentes, posicionándose como el segundo tipo de cáncer más común y la primera causa más común de muerte por cáncer a nivel mundial². **Figura 1.**

INCIDENCIA (A)



MORTALIDAD (B)

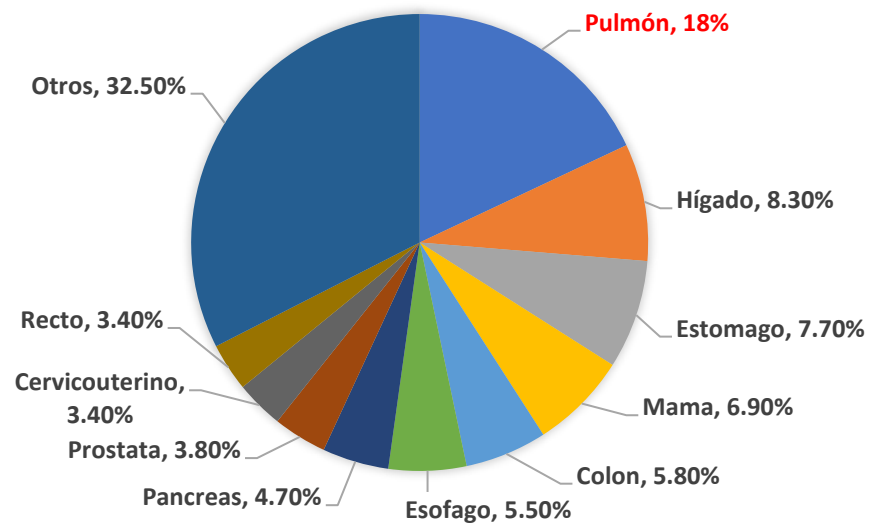


Figura 1. Tipos de cáncer con mayor incidencia (A) y mortalidad (B) en el mundo en ambos sexos, estudio del año 2020. (Gráficas editadas y datos tomados de Globocan 2020²)

En México el cáncer de pulmón representa el séptimo lugar de los tipos de cáncer con mayor incidencia en el 2020, registrándose 7588 nuevos casos para ese año (representando el 3.9% del total de casos). **Figura 2.**

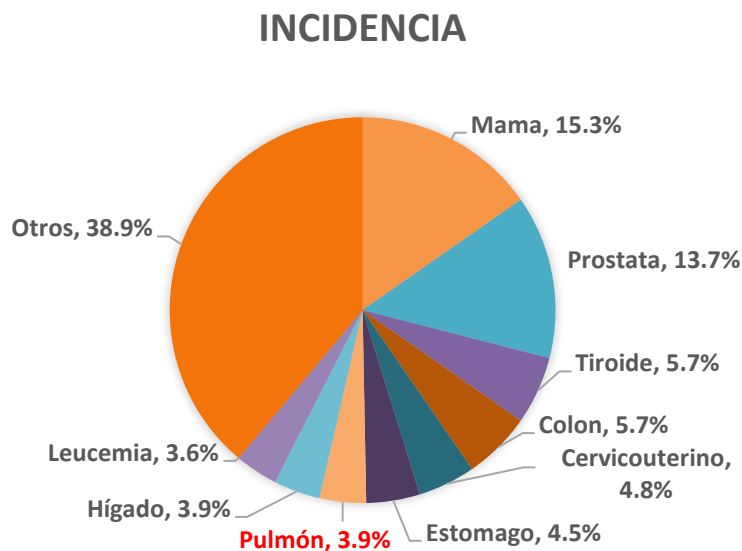


Figura 2. Tipos de cáncer con mayor incidencia en México en ambos sexos, estudio del año 2020. (Gráficas editadas y datos tomados de Globocan 2020³)

Por otro lado, es el cuarto tipo de cáncer con mayor mortalidad en México después de mama, próstata e hígado (representando el 7.9% de índice de mortalidad)³. **Figura 3.**

MORTALIDAD

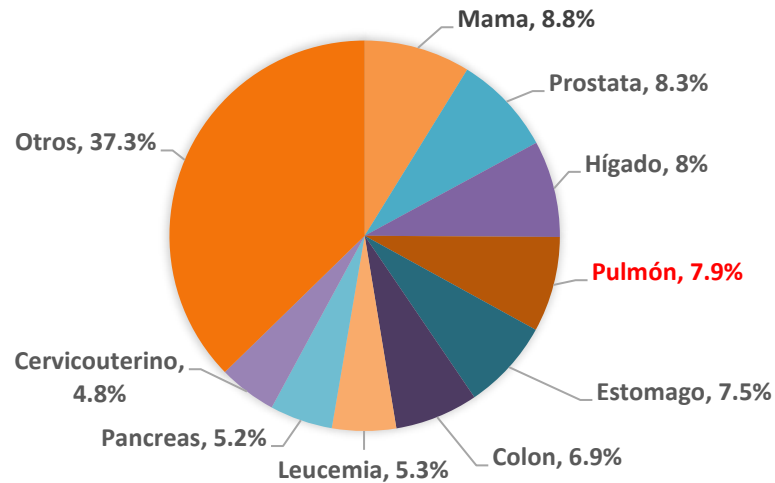


Figura 3. Tipos de cáncer con mayor mortalidad en México en ambos sexos, estudio del año 2020. (Gráficas editadas y datos tomados de Globocan 2020³)

El cáncer es una enfermedad compleja que se compone de alteraciones tanto genéticas como epigenéticas que afectan a una gran cantidad de genes, proteínas y redes de señalización durante la progresión del tumor. Las células normales requieren de ciertas características para volverse malignas conocidas como “hallmarks”, los cuales se describieron en el año 2000. Se ha propuesto un marco que comprende ocho sellos y dos características habilitadoras, estos son capacidades adquiridas durante el desarrollo del cáncer que le permite a las células sobrevivir, proliferar, y hacer metástasis²⁰.

Los hallmarks del cáncer son los siguientes; mantener la señalización proliferativa, evadir los supresores del crecimiento, evitar la destrucción inmunológica, inmortalidad replicativa, activación de la invasión y metástasis, inducir angiogénesis, resistir la muerte celular, desregular la energía celular,

promover la inflamación e inestabilidad y mutación genómica²¹. Todos ellos se encuentran relacionados de alguna forma con el metabolismo alterado de la célula cancerígena, del cual hablaremos más adelante **Figura 4**.

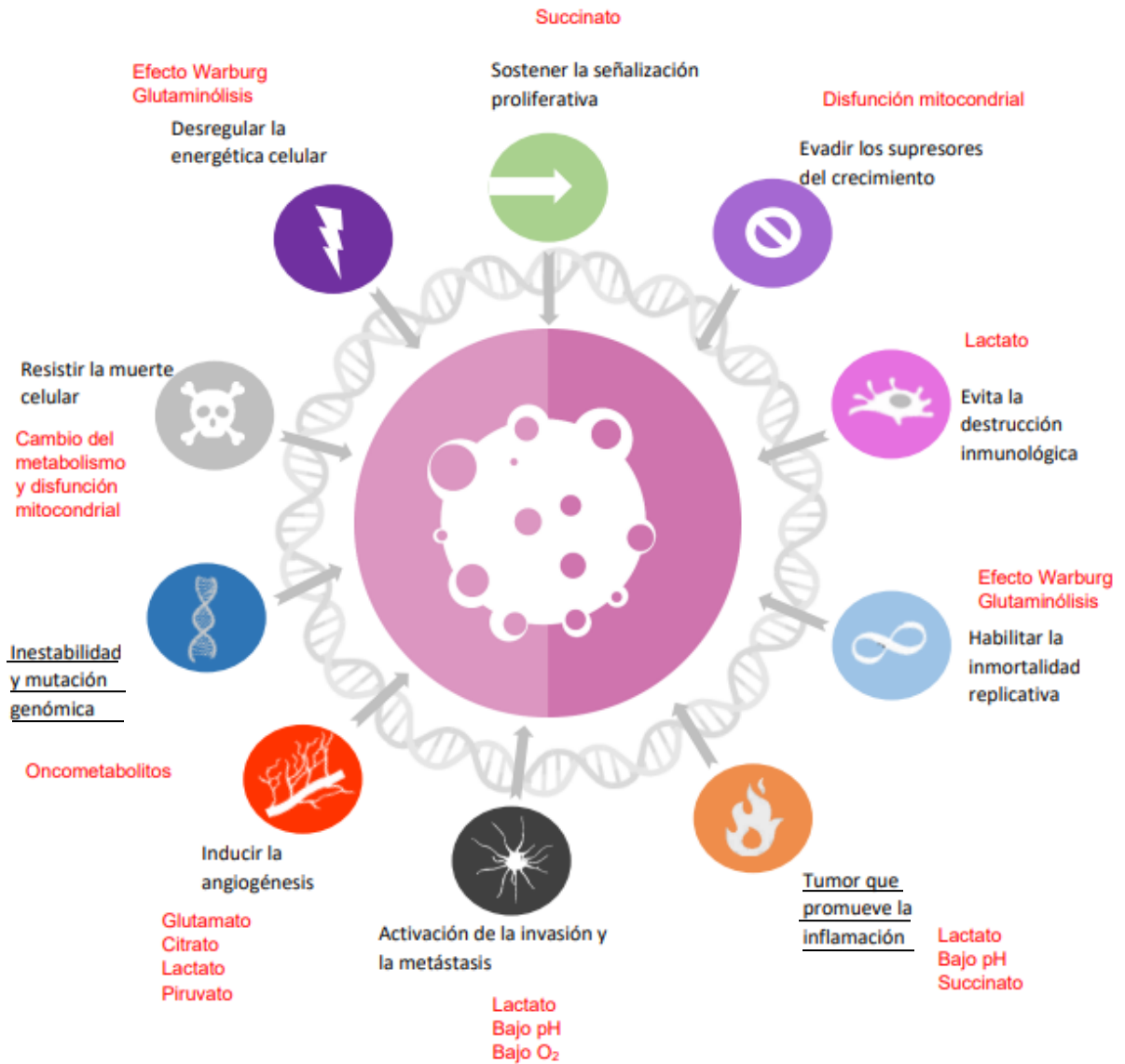


Figura 4. Hallmarks del cáncer y la influencia de los metabolitos o procesos metabólicos en cada una de estas características oncogénicas. Las características del cáncer comprenden ocho sellos distintos y dos características habilitadoras (subrayado). Los rasgos pueden

adquirirse en diferentes etapas del desarrollo de cáncer. Figura modificada de Wishart, et al. 2019.

Las células cancerígenas, como cualquier tejido en división, deben de producir constantemente los precursores para la síntesis de macromoléculas. Las células de los mamíferos dependen de un ambiente complejo compuesto por abundantes fuentes esenciales de carbono y nitrógeno. Por lo tanto, las células cancerosas utilizan una diversidad de nutrientes para generar los componentes monoméricos de las macromoléculas²².

Las vías metabólicas son el medio por el cual las células utilizan y descomponen los nutrientes para obtener energía y los elementos básicos que requieren para el crecimiento, la proliferación y el mantenimiento de los procesos celulares²³.

Una de las principales características del cáncer es el metabolismo celular alterado, en el que hay un incremento del flujo metabólico y de las necesidades nutricionales para conseguir así una proliferación celular acelerada, y mejorar otras funciones biológicas de las células cancerosas. La mayor tasa de división celular en el cáncer necesita un rediseño de las vías metabólicas, las principales alteraciones metabólicas comprenden un aumento de la glucólisis aeróbica, desregulación del pH, desregulación del metabolismo de los lípidos, aumento de la generación de ROS, así como alteraciones de las actividades enzimáticas²⁴.

1.3 Vías metabólicas alteradas en cáncer

1.3.1 Glucólisis y producción de lactato

Las células cancerosas producen energía a través del efecto Warburg, en el que hay un aumento en la glucólisis y fermentación del ácido láctico en el citosol sin importar el nivel de oxígeno. Fomentado por el efecto Warburg y debido a otras actividades metabólicas alteradas, las células cancerosas aumentan el anabolismo, en donde hay síntesis acelerada de nucleótidos, aminoácidos y lípidos, además, alteran las respuestas que combaten el estrés metabólico para mantener la supervivencia de la célula, todo esto para apoyar su proliferación²⁵.

Para evitar la entrada del piruvato proveniente de la glucólisis en las mitocondrias, las células cancerosas expresan en mayor cantidad la enzima lactato deshidrogenasa isoenzima tipo A (LDHA), la cual se caracteriza por tener una gran afinidad por el piruvato, en consecuencia, se libera lactato. La liberación de lactato promueve la metástasis, la angiogénesis²⁵ y ayuda a las células en la evasión inmune a través de la activación de GPR81 (receptor 81 acoplado a proteína G) el cual disminuye la presentación de antígenos tumorales y activación de células T²⁶.

1.3.2 Glutaminólisis

Además de la glucosa, el segundo nutriente más importante que necesitan los tumores es el aminoácido glutamina. Debido a la preferencia por la glucólisis aeróbica en las células cancerosas (efecto Warburg), se reduce la entrada de piruvato al ciclo del ácido tricarboxílico. Por lo tanto, las células cancerosas generalmente tienen una dependencia mayor de biomoléculas alternativas para reponer los intermediarios del ciclo de Krebs, y la glutamina es uno de esos metabolitos. Aun cuando la glutamina puede ser sintetizada por las propias células como un aminoácido no esencial, muchas células cancerosas dependen de la glutamina exógena para favorecer su crecimiento. La glutamina es sometida a glutaminólisis, esta vía rompe la glutamina en intermediarios anapleróticos que reemplazan a los intermediarios del ciclo del ácido tricarboxílico, a través del α -cetoglutarato y mantiene el metabolismo mitocondrial, la síntesis de aminoácidos, ácidos nucleicos y ácidos grasos para la división celular²⁷.

1.3.3 Succinato

El succinato es un metabolito intermediario en el ciclo de Krebs, que deriva en parte de la glutaminólisis, debido a que proviene del α -cetoglutarato, este es convertido en fumarato por la enzima succinato deshidrogenasa (SDH). Se observa con frecuencia que en los tumores hay mutaciones en el gen que

codifica a esta enzima, lo que conduce a una disminución de la actividad de SDH y dan como resultado la acumulación de succinato^{28,29,30}.

1.3.4 Vía de las Pentosas Fosfato

Además de la generación rápida de ATP, la glucólisis de las células cancerosas dirige los carbonos de glucosa hacia la vía de las pentosas fosfato (VPF), la cual genera NADPH + H⁺ y azúcar ribosa. NADPH + H⁺ es necesario para la síntesis de ácidos grasos. En el primer paso de la VPF oxidativa, el intermediario glucolítico glucosa-6-fosfato (G6P) se convierte irreversiblemente en 6-fosfogluconolactona catalizada por la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD). Este proceso contribuye al crecimiento y la supervivencia del cáncer al determinar el flujo de intermediarios en VPF con fines biosintéticos, así como la producción de NADPH+ H⁺³¹.

1.3.5 Síntesis de lípidos

El metabolismo de los lípidos tiene un papel importante en la supervivencia de las células cancerosas, estas tienen la capacidad de realizar síntesis de *Novo* de lípidos. Esta alteración en el metabolismo les proporciona múltiples ventajas, ya que ayuda en la producción de energía, la proliferación, migración, síntesis de membranas, focalización en la superficie celular, localización, secreción y

maduración de la membrana y también en la regeneración de energía mediante la β -oxidación²⁴.

1.4 Los Hallmarks y el metabolismo del cáncer

Muchos de los cambios en el metabolismo que se observan en las células cancerígenas pueden explicar los “hallmarks”.

Sostener la señalización proliferativa se logra por el incremento en la producción de succinato en las células ya que este estimula la producción de factores de crecimiento.

Evadir los supresores de crecimiento puede explicarse mediante el metabolismo alterado (glucólisis o glutaminólisis), sin embargo, no se sabe si se debe al metabolismo, se cree que también se debe a la pérdida de supresores de crecimiento debido a mutaciones³².

La capacidad que tienen las células cancerígenas de evitar la destrucción inmunitaria puede deberse a la producción de lactato, ya que este es un conocido inmunosupresor que además tiene un efecto reductor de pH que induce pérdida de la función de células T²⁸.

La inmortalidad replicativa es el resultado del efecto Warburg y glutaminólisis ya que estos procesos son sostenibles aun en condiciones adversas (pH bajo, alto contenido de especies reactivas de oxígeno y otorgan a los tumores la capacidad de dividirse en cualquier entorno y por mucho tiempo)²⁸.

La promoción de la inflamación durante la patología del cáncer se debe a la producción de lactato, al pH bajo que activa nociceptores que provocan dolor e irritación crónica y el succinato que también promueve la inflamación³².

La invasión y la metástasis se deben en gran parte al lactato, al bajo pH del microambiente, y a la hipoxia que probablemente se debe a los bajos requerimientos de oxígeno en la glucólisis. La acidez activa las proteasas las cuales rompen las proteínas de adherencia en las células y estimula el potencial metastásico. También se ha reportado que la hipoxia induce metástasis³³.

Respecto a la inducción de angiogénesis, actualmente se ha demostrado que el glutamato, citrato, lactato y piruvato son fuertemente angiogénicos. Estos inducen la activación de NF- κ B, un factor de transcripción que promueve la expresión de VEGF. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es una proteína señalizadora que está implicada en la vasculogénesis y en la angiogénesis³⁴.

La inestabilidad genómica presente en las células cancerígenas puede explicarse por la producción de oncometabolitos (2-hidroxiglutarato, succinato y

fumarato) que conducen a las mutaciones y cambios epigenéticos en las células³⁵.

La resistencia a la muerte celular de las células del cáncer se explica por el cambio de la célula al metabolismo citoplasmático y a la disfunción mitocondrial y por último la desregulación de energía puede ser explicada por el efecto Warburg y/o la glutaminólisis²⁸. **Figura 4.**

1.5 Rutas metabólicas alteradas en cáncer de pulmón

Las células de cáncer de pulmón, al igual que todos los tipos de cáncer, consumen altas cantidades de glucosa. Esta molécula entra a través de los transportadores de glucosa (GLUT), posteriormente se convierte en glucosa- 6 - fosfato (G6F), la cual puede seguir por la ruta de glucólisis o bien en el metabolismo de las pentosas fosfato, en donde se sintetizan nucleótidos, NADPH y glutatión³⁶. Estos últimos pueden mejorar la anti-apoptosis en las células tumorales. Por otro lado, al continuar la G6F por la glucólisis, se obtiene piruvato, como ya se mencionó anteriormente las células cancerosas sobre expresan LDHA para evitar la entrada de piruvato a la mitocondria, en consecuencia, se libera lactato en el microambiente, y una cierta cantidad de piruvato entra al ciclo de Krebs en forma de citrato³⁷. El lactato se excreta y se absorbe a través de los transportadores de monocarboxilato (TMC). Dentro del ciclo de Krebs, la presencia de especies activas de oxígeno (ERO) inhibe la actividad de la enzima aconitasa, por lo que el citrato tiene problemas para ser

transformado, sin embargo, parte del citrato se convierte en malato y continúa participando en el ciclo. El citrato también participa en el metabolismo de los ácidos grasos endógenos, como resultado, este metabolismo ofrece a las células de cáncer de pulmón la energía para la proliferación e invasión³⁸.

Figura 5.

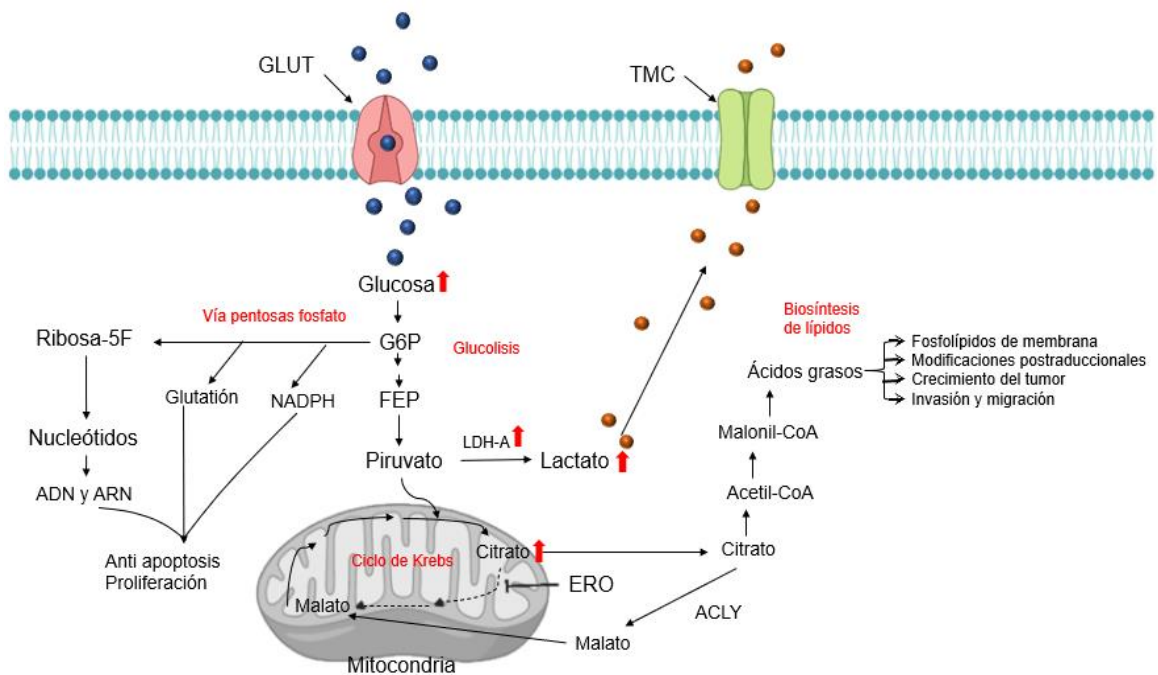


Figura 5. Imagen modificada de Chang 2020. Rutas alteradas en el metabolismo de células de cáncer de pulmón. GLUT (Glucotransportadores); TMC (Transportadores de monocarboxilato); G6P (Glucosa-6 fosfato), FEP(Fosfoenolpiruvato); LDH-A (Lactato deshidrogenasa A); ERO (Especies reactivas de oxígeno); ACLY (ATP citrato liasa). Figura creada con [BioRender.com](https://www.biorender.com)

Recientemente se ha estado investigando el papel de los fitoquímicos en la modificación del metabolismo de diferentes tipos de cáncer, incluido el de pulmón.

1.6 Metabolitos secundarios vegetales que se utilizan para combatir el cáncer

Existen en el mercado metabolitos secundarios vegetales o derivados de estos que actualmente son utilizados para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, **Tabla 2**.

Tabla 2. Metabolitos secundarios utilizados en cáncer y sus mecanismos.

| Metabolito | Descripción | Mecanismo | Referencia |
|--------------------|--|--|------------|
| Vincristina | Un alcaloide proveniente de la planta <i>Catharanthus roseus</i> . Se utiliza en leucemia, enfermedad de hodgkin entre otros. | Actúa en la fase de mitosis en el ciclo celular. Inhibe la agregación de los microtúbulos | 39 |
| Taxol | Un alcaloide diterpénico proveniente de <i>Taxus brevifolia</i> . Utilizado en cáncer de mama, ovario, pulmón, entre otros. | Actúa en la fase de mitosis en el ciclo celular. Inhibe la desagregación de los microtúbulos. Altera la función de la cadena respiratoria. | 39 |
| Topotecán | Derivado de la camptotecina un alcaloide obtenido de <i>Camptotheca acuminata</i> . Utilizado en cáncer de ovario, pulmón, cuello uterino. | Actúa en la fase S del ciclo celular. Inhibe la topoisomerasa I | 40 |

| | | | |
|------------------|---|---|----|
| Etopósido | Es un derivado de la podofilotoxina, un alcaloide obtenido de <i>Podophyllum notatum</i> . Utilizado en cáncer de pulmón, ovario, testicular. | Actúa en la fase G2 del ciclo celular. Inhibe la topoisomerasa II. | 41 |
|------------------|---|---|----|

La capacidad que tienen los fitoquímicos para prevenir o dar tratamiento al cáncer ha sido muy estudiada, se sabe que tienen efectos y mecanismos para evitar la inflamación, mutagénesis, estrés oxidativo, y mayormente se basan en el arresto del ciclo celular, estos tratamientos suelen ser muy agresivos. Actualmente, ciertos metabolitos secundarios aislados, así como extractos crudos de plantas han mostrado una nueva vía en el tratamiento del cáncer al dirigirse al metabolismo de este. En la **Tabla 3** se muestra un resumen de algunos metabolitos secundarios y su actividad en el metabolismo de células cancerígenas. Estas moléculas interfieren con el proceso de transformación metabólica en el cáncer mediante la inhibición directa de las vías metabólicas, modificando la actividad de los reguladores del metabolismo, inhibiendo receptores y enzimas como lo son GLUT, TMC, SLC1A5, LDHA, ACLY, entre otros, por ende, disminuyen el consumo o producción de algunos metabolitos primarios dentro de las vías metabólicas en la célula^{42,43}. Todos han demostrado ser objetivos terapéuticos propicios para los productos naturales.

En la **Figura 6** se muestran algunos metabolitos secundarios y extractos de plantas que han mostrado un efecto en el metabolismo de células cancerosas.

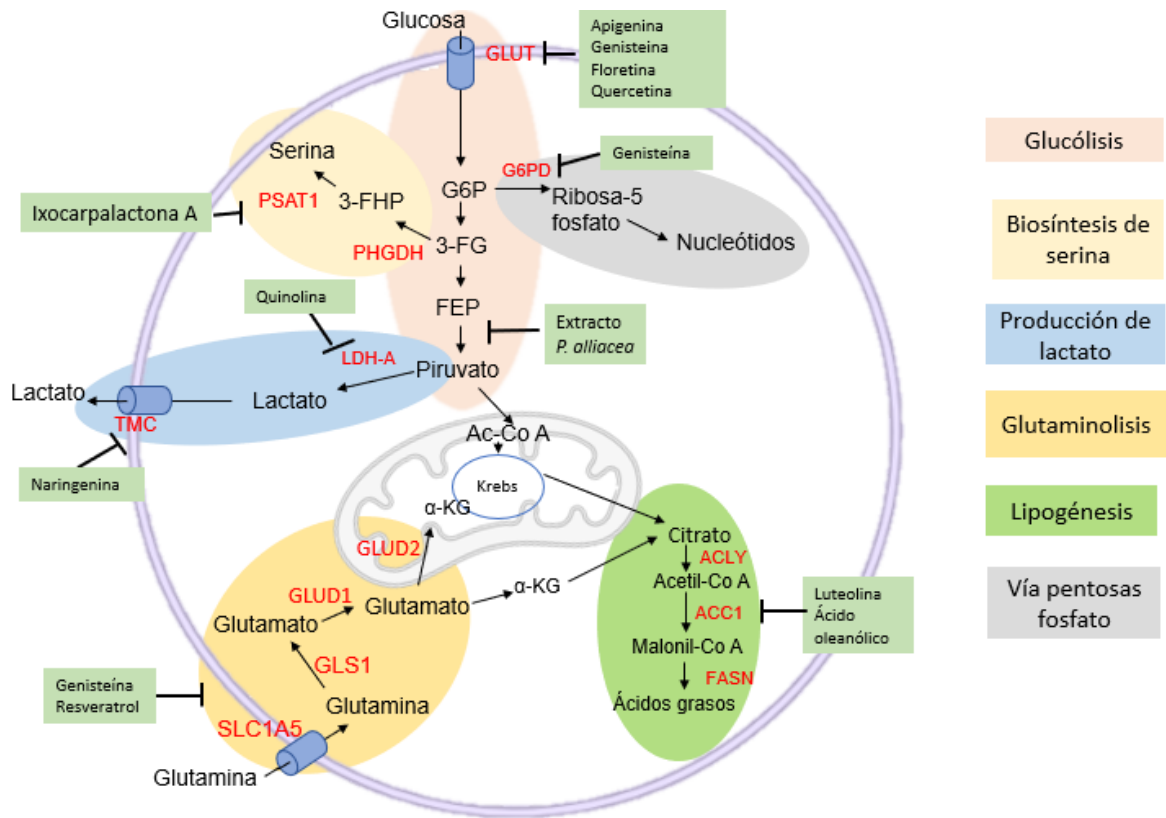
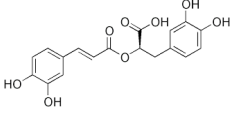
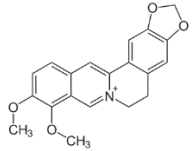
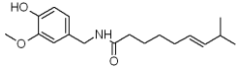
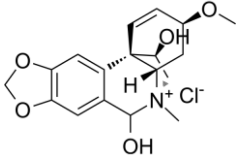
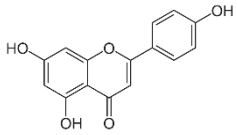

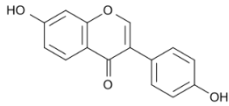
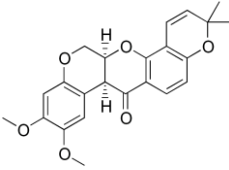
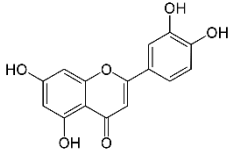
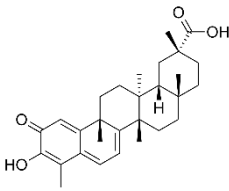
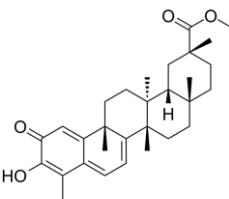


Figura 6. Mecanismos de acción de fitoquímicos o extractos de plantas dentro del metabolismo de células cancerosas. GLUT (Glucotransportadores); TMC (Transportadores de monocarboxilato); G6P (Glucosa-6 fosfato), 3-FG (3-fosfoglicerato); FEP (Fosfoenolpiruvato); LDH-A (Lactato deshidrogenasa A); 3-FHP (3- Fosfohidroxipiruvato); PHGDH (Fosfoglicerato deshidrogenasa); PSAT1 (Fosfoserina aminotransferasa); G6PD (Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa); α-KG (Alfa-cetoglutarato); GLUD2 (Glutamato deshidrogenasa 2); GLUD1 (Glutamato deshidrogenasa 1); GLS1 (Glutaminasa); SLC1A5 (Transportador de aminoácidos neutro B); ACLY (ATP citrato liasa); ACC1 (Acetil-CoA carboxilasa); FASN (Ácido graso sintasa).^{43,44}. Figura creada con [BioRender.com](https://www.biorender.com)

Tabla 3. Metabolitos derivados de plantas y su efecto en el metabolismo de ciertos tipos de cáncer.

| Fitocompuesto | Planta | Línea celular | Actividad | Referencia |
|--|--|--|---|------------|
| Ácido rosmarínico  | <i>Rosmarinus officinalis</i> | Cáncer de colon (HCT-8, HCT116) | Disminuye el consumo de glucosa y la producción de lactato | 45 |
| Berberina  | <i>Hydrastis canadensis</i> | Cáncer de mama (MCF-7), colon (HCT-116), cervical (HeLa) | Disminuye el consumo de glucosa, inhibe enzimas lipogénicas | 46,47, 48 |
| Capsaicina  | Del género <i>Capsicum</i> | Células de carcinoma hepatocelular (HepG2) y pancreático (AsPC-1) | Inhibe la síntesis de <i>Novo</i> de ácidos grasos | 49,50 |
| Cloruro de N-metilhemeantidina  | <i>Zephyranthes candida</i> | Cáncer de páncreas (AsPC-1, Mia) | Desregula GLUT1 y LDHA, disminuye el consumo de glucosa y la producción de lactato | 51 |
| Apigenina  | <i>Olea europea</i> <i>Apium graveolens</i> | Cáncer de mama (MCF-7), cáncer de colon resistente a cisplatino (HT-29), cáncer de pulmón (H460) | Inhibe GLUT1, disminuye el consumo de glucosa, glutamato y la producción de lactato, disminuye la síntesis de lípidos | 52,53, 54 |
| Daidzeína  | <i>Glycine max</i> | Cáncer de mama (MCF-7, MDA-MB-231) | Disminuye el consumo de glucosa | 55 |

| | | | | |
|---|-------------------------------|---|--|--------|
|  | | | y glutamina | |
| Deguelin | <i>Mundulea sericea</i> | Cáncer de pulmón de células no pequeñas (H460,H520) | Disminuye el consumo de glucosa y la producción de lactato | 56 |
|  | | | | |
| Luteolina | <i>Olea europaea</i> | Cáncer de mama (MCF-7, SKBR3) de próstata (LNCaP) | Disminuye la síntesis de lípidos, de fosfolípidos, triglicéridos interrumpiendo la síntesis <i>de Novo</i> | 57, 58 |
|  | | | | |
| Celastrol | <i>Trypterygium wilfordii</i> | Cáncer cervical (HeLa) | Inhibe el glucolisis, el ciclo de Krebs, y la síntesis de aminoácidos | 59 |
|  | | | | |
| Pristimerina | <i>Maytenus ilicifolia</i> | Cáncer de mama (SKBR3) | Disminuye la actividad y los niveles de FASN | 60 |
|  | | | | |

GLUT1 (transportador de glucosa 1); FASN (ácido graso sintasa); LDHA (lactato deshidrogenasa A).

CAPITULO 2.

ANTECEDENTES

La necesidad de nuevos tratamientos y estrategias terapéuticas contra el cáncer ha impulsado la búsqueda y el estudio de nuevos extractos y compuestos derivados de plantas que tengan un efecto modulador en el metabolismo de las células cancerosas. A continuación, se mencionan trabajos recientes en donde se han estudiado los efectos de los fitoquímicos en el metabolismo de las células cancerígenas.

Sorice et al (2016) evaluaron la actividad anticancerígena de los polifenoles presentes en el extracto hidroalcohólico de cáscara de castaño en 6 tipos de células cancerígenas. Estudiaron también el efecto modulador sobre el metabolismo de estas células utilizando la técnica de RMN. Ellos determinaron que el ácido gálico, elálgico y siríngico eran los compuestos más abundantes en el extracto. Observaron que las células cancerosas expuestas a una concentración de 137 µg/mL del extracto de polifenoles disminuyeron en un 50% la viabilidad celular. El estudio del metaboloma evidenció que se afectaron negativamente los niveles de aminoácidos como lo son alanina, glutamina, leucina, entre otros. Así mismo hubo una regulación a la baja de otros

metabolitos como lo es la glucosa y glutamato. Por tanto, se demostró que estos polifenoles, entre otras vías, modifican la glucólisis y la glutaminólisis, dos de las vías metabólicas más importantes utilizadas por las células cancerosas para su crecimiento⁶¹.

Uifalean et al (2016) evaluaron la actividad anticancerígena y el perfil metabolómico en dos líneas celulares de cáncer de mama mediante RMN en exposición a isoflavonas extraídas de soya. Ellos observaron que a una concentración de 166.34 y 26.36 µg/mL en las líneas MCF-7 y MDA-MB-231 respectivamente, disminuyeron en un 20% la viabilidad celular. En el metaboloma de las células cancerosas la vía de las pentosas fosfato fue regulada positivamente lo cual ayuda a la proliferación celular. Sin embargo, se observó una disminución significativa en la absorción de glucosa lo cual priva a la célula de su principal fuente de energía⁵⁵.

Noorolahi, et al (2016) evaluaron la actividad anticancerígena y el perfil metabolómico utilizando la técnica de RMN en células Raji (células de linfoma canceroso) tras la exposición al extracto de *Aloe vera* (gel interior calentado y filtrado). Observaron que las células disminuyeron en un 50% su viabilidad celular a una concentración de 40 µg/ml después de 48h. El análisis metabólico mostro que se afectaron negativamente la síntesis de proteínas, aminoácidos, y la vía pentosas fosfato, principalmente. Esto desencadenaría problemas en la supervivencia y la proliferación de la célula⁶².

Malekzadeh, et al (2020) evaluaron la actividad anticancerígena y el perfil metabólico por RMN en células de cáncer de ovario utilizando un extracto

etanólico de la planta *Xanthium Strumarium*. Ellos observaron que a concentraciones de 6 µg/ml disminuyó en un 50% la viabilidad celular de las células cancerosas. Las alteraciones metabólicas incluyeron vías vitales como lo son el metabolismo de nucleótidos, glicerolípidos y en particular la biosíntesis de lípidos, las cuales se vieron afectadas negativamente. Debido a esto la célula cancerosa tendría problemas para producir energía, proliferar, migrar, entre otras cosas⁶³.

Dentro de la familia *Lamiaceae* las plantas del género *Coleus* han demostrado una actividad anticancerígena considerable. Hasibuan, et al (2014), detectaron esta propiedad en diferentes extractos de la especie *P. amboinicus*. El estudio se realizó en células de cáncer cervical HeLa obteniendo valores de IC₅₀ de 76.3 µg/mL (extracto de n-hexano), 143.2 µg/mL (extracto de acetato de etilo), y 88.9 µg/mL (extracto etanólico)⁶⁴. Muniyandi, et al (2017), observaron una gran actividad del extracto metanólico de *P. stocksii* en células de cáncer de mama y colon obteniendo una IC₅₀ de 5 mg/mL⁶⁵. Matias, et al (2019), estudiaron la actividad del extracto acetónico de *P. madagascariensis* obteniendo actividad con una IC₅₀ de 64.52 µg/mL en cáncer de mama⁶⁶.

La actividad anticancerígena de la planta de estudio, *C. hadiensis*, solo ha sido reportada en los siguientes artículos: Menon, et al (2011); estudiaron la actividad del extracto metanólico de *C. hadiensis* en células HeLa obteniendo una IC₅₀ de 141.3µg/mL⁶⁷. En 2015, el mismo grupo reportó la actividad anticancerígena de terpenos aislados de *C. hadiensis* a nivel apoptótico en células de cáncer de colon⁶⁸. Aunque la actividad anticancerígena de esta

planta ha sido reportada (en pocos estudios), no se ha determinado su actividad anticancerígena y efectos en células de cáncer de pulmón. Aun cuando este último es uno de los cánceres más importantes a nivel mundial. Además, no existe, hasta dónde conocemos artículo alguno que haya estudiado los efectos de esta planta en el metabolismo celular de células cancerosas. El estudio y la determinación de estos efectos serán de gran impacto ya que generan un nuevo conocimiento y enfoque para el tratamiento de dicho cáncer, además de una nueva perspectiva de estudio para esta planta y género.

La literatura citada ha demostrado que, el estudio del metaboloma en células cancerígenas provee nuevos conocimientos sobre la participación de la reprogramación metabólica en las respuestas celulares a los metabolitos secundarios vegetales bioactivos. Esto último puede contribuir a la investigación sobre las terapias basadas en fitoquímicos y ayudar en la búsqueda de nuevos tratamientos; ya que no solo es urgente la necesidad de nuevas quimioterapias, sino que también se necesitan nuevas estrategias en los métodos terapéuticos.

CAPITULO 3

3.1 JUSTIFICACIÓN

Debido a la diversidad de compuestos y actividades biológicas que posee la planta de estudio *C. hadiensis*, resulta importante e interesante determinar la actividad anticancerígena *in vitro*, y desde el punto de vista de este estudio conocer los cambios que resultan en el metabolismo de las células cancerosas.

3.2 HIPÓTESIS

El extracto metanólico de *C. hadiensis* presentará actividad anticancerígena *in vitro* y modificará el metabolismo de las células de cáncer de pulmón HTB 177.

3.3 OBJETIVOS

3.3.1 Objetivo general

Evaluar la actividad anticancerígena *in vitro* y los cambios en el metabolismo de las células expuestas al extracto metanólico de *C. hadiensis* .

3.3.2 Objetivos específicos

1. Obtener el extracto metanólico de *C. hadiensis*
2. Determinar la citotoxicidad del extracto metanólico de *C. hadiensis* en la línea Vero, mediante la técnica de MTT.
3. Evaluar la actividad anticancerígena *in vitro* del extracto metanólico de *C. hadiensis* en la línea HTB-177, mediante la técnica de MTT.
4. Estudiar el efecto del tratamiento con el extracto metanólico de *C. hadiensis* en el metabolismo de las células de cáncer de pulmón HTB 177 y células Vero, utilizando la técnica de RMN.

CAPITULO 4.

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Material biológico

4.1.1.1 Células animales

Para los estudios *in vitro* se utilizaron dos líneas celulares obtenidas del American Type Culture Collection (ATCC), línea cancerígena: células de cáncer de pulmón HTB-177 (ATCC: H460) y línea no cancerígena: células Vero (células de riñón del mono verde africano ATCC: CCL-81)

4.1.1.2 Material vegetal

La planta madre a partir de la cual se obtuvo todo el material vegetal para este estudio, fue donada y posteriormente identificada por el herbario de la facultad de ciencias biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. La planta fue identificada como *Coleus hadiensis* (Forssk.) A.J.Patton. 2019. Planta

sufrútice a herbácea, semisuculenta, de tallos erectos a decumbentes 15(150) cm de largo, 5.0-7.0 mm de diámetro, extendidos, terete, pilosos a pubescentes, de color verde citrino. Hojas opuestas y decusadas, pecioladas, pecíolos de 0.7-2.0 cm de largo, 3.0 mm de diámetro, terete; lámina entera, plana, ovado-orbicular, con venación camptódroma; ápices redondeados a obtusos; bases redondeadas a cuneadas; márgenes crenado-dentados, con 3-5 pares de dientes, planos a marginados; 3.0-3.7 cm de largo, 3.3-3.5 cm de ancho, 1.0 mm de grosor; superficie adaxial glandular y escasamente vilosa, de color verde cartuja; superficie abaxial glandular, densamente vilosa-tomentosa, de color verde citrino. El indumento con tricomas filiformes, uniseriados, pluricelulares, con base bulbosa, muy numerosos; y tricomas glandulares de base bulbosa, cortos (1/2 a 1/8 del largo de los tricomas filiformes), unicelulares, capitados a peltados, los últimos sumamente escasos; muy denso en hojas y brotes jóvenes, más escaso al madurar. Cultivada, nativa a África (desde Egipto hasta Sudáfrica) y Asia (Península Arábiga, India, Sri Lanka y Maldivas). Se le asignó el número de folio: 030597. Para obtener la cantidad adecuada de material vegetal, se llevó a cabo la propagación por esquejes a partir de la planta madre. Las plantas se mantuvieron en condiciones controladas en el laboratorio (25°C, 16 h luz/ 8 h oscuridad). Posteriormente, con una edad de 5 meses se recolectaron las partes aéreas para posteriormente ser procesadas.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Obtención del extracto metanólico de *C. hadiensis*

Las partes aéreas recolectadas de la planta se liofilizaron y se obtuvo un peso seco de 41.10 g. A este material se le realizó una maceración a temperatura ambiente con 850 ml (volumen para cubrir por completo la planta seca) de metanol al 95% por 48 horas, cambiando el solvente cada 24 horas (2 extracciones) en un matraz Erlenmeyer de 2L. El extracto obtenido se filtró con un papel Whatman para separar el material vegetal y posteriormente el extracto se llevó a sequedad con ayuda de un rotavapor.

4.2.2 Evaluación de la citotoxicidad y actividad anticancerígena *in vitro*

4.2.2.1 Cultivo de líneas celulares

La línea de cáncer de pulmón HTB-177 y la línea celular Vero fueron sembradas en frascos de cultivo con medio esencial mínimo (EMEM) suplementado con suero fetal bovino al 10%. Se incubaron a 37 ° C en atmósfera humidificada con 5% de CO₂ y 95% de aire, hasta la formación de un monocapa celular.

4.2.2.2 Preparación de placas y tratamiento de células

Para los ensayos de actividad anticancerígena y citotoxicidad *in vitro*, se utilizaron las líneas celulares HTB-177 y Vero respectivamente, con un 80% de confluencia. Las células fueron tratadas con 0.5 mL de tripsina al 0.25%, por 5-10 minutos, para desprender las células del frasco de cultivo y entre ellas mismas. Posteriormente se añadió 3 mL de medio EMEM para inactivar la tripsina. De la suspensión celular resultante se tomó 100 μ L y se colocaron en una cámara de Neubauer para determinar la densidad celular, para posteriormente ajustarla a 1×10^4 células/ 0.1 mL. Se colocaron 100 μ L de estas células en cada pocillo de las placas de 96 pocillos y fueron incubadas durante 24 h.

Se prepararon varias concentraciones del extracto metanólico de *C. hadiensis* (31.25, 62.50, 125, 250 ,500 μ g/mL)⁶⁷ disuelto en DMSO (0.5%). Las distintas concentraciones del extracto se añadieron de manera independiente a las placas de 96 pozos (por triplicado) que contenían la línea celular a evaluar. Para ambos análisis, citotoxicidad y actividad anticancerígena, se utilizó como control positivo de muerte celular células expuestas a Tritón al 1%. Las células sin tratamiento se usaron como control negativo. Células con DMSO 0.5% como control para evaluar el efecto del disolvente del extracto. Se utilizó un fármaco de referencia vincristina a las mismas concentraciones del extracto para

comparación. Después de incubar durante 48 h, se realizó la prueba de MTT para determinar la viabilidad celular en respuesta a los diferentes tratamientos.

4.2.2.3 Prueba de MTT

Después de la exposición al extracto, el medio de cada pocillo con células fue remplazado por 100 μ L de medio nuevo preparado con el reactivo de MTT (0.5 mg/mL), se incubaron las placas por 3 h, posteriormente se retiró el medio y se agregó una mezcla de alcohol isopropílico con HCL 0.4 N (10:1). Se mantuvo 30 min en oscuridad a temperatura ambiente y finalmente se midió la absorbancia a 550 nm utilizando un lector de microplacas⁶⁹.

4.2.2.4 Análisis de resultados

4.2.2.4.1 Cálculo del porcentaje de viabilidad celular, IC₅₀ y índice de selectividad

Los ensayos de MTT se hicieron por triplicado para cada tratamiento y control. Se obtuvo un promedio y se utilizó para calcular la viabilidad de las células con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ viabilidad celular} = \frac{\text{Abs célula con extracto} - \text{Abs blanco (medio)}}{\text{Abs control positivo} - \text{Abs blanco (medio)}} \times 100$$

Para calcular el IC₅₀, una vez graficados los valores de % de viabilidad celular, se obtuvo la ecuación de la recta de cada tratamiento, se despejó x y se obtuvo el valor de la concentración inhibitoria del 50% de crecimiento.

El índice de selectividad del extracto se calculó utilizando las IC₅₀ obtenidas de las células no cancerosas (Vero) y células de cáncer (HTB-177), con la siguiente formula:

$$IS = \frac{IC50 \text{ células no cáncerosas}}{IC50 \text{ de células de cáncer}}$$

4.2.2.4.2 Análisis estadístico

Se realizó análisis T student utilizando el software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego California USA) para obtener el valor de p y determinar si la diferencia entre los grupos de tratamiento es significativa. Se consideró un valor p de significancia menor o igual a 0.05.

4.2.3 Análisis de metaboloma por RMN

4.2.3.1 Cultivo de líneas celulares

Las células HTB 177 y Vero fueron sembradas en frascos de cultivo de 175cm² con medio nutritivo EMEM y se cultivaron a 37 °C en atmósfera humidificada con 5% de CO₂ y 95% de aire, hasta obtener una cantidad de 15 millones de células, tanto para el tratamiento como el control.

4.2.3.2 Tratamiento de células y extracción de metabolitos

Las células se incubaron con el extracto a una concentración de 618 y 192.85 µg/ml (de acuerdo con las IC₅₀ obtenidas anteriormente) para las células Vero y HTB 177 respectivamente, por 48 horas. Como control negativo se utilizaron las líneas celulares expuestas a DMSO 0.5%. Las muestras se recolectaron inmediatamente después del periodo de exposición.

Para obtener los metabolitos extracelulares, se tomó el medio de cultivo de cada frasco de cultivo de manera independiente, se centrifugó a 1000rpm/5min a 4°C. El sobrenadante se recuperó y se almacenó a -80°C, posteriormente se liofilizó y se conservó hasta el análisis.

Para extraer los metabolitos intracelulares, las células aun contenidas en el frasco de cultivo se lavaron 3 veces con PBS. Posteriormente se realizó una extracción agregando 6 ml de metanol frío directamente en el frasco de cultivo. Las células se rasparon del frasco de cultivo y, la suspensión resultante se transfirió a un tubo Falcon, se agitó en vórtex durante 30 s. Posteriormente, se añadieron 6 ml de cloroformo y 4.5 ml de agua ultrapura fríos, seguido de agitación en vórtex por 30 s. Las muestras se dejaron reposar en hielo durante 10 min y se centrifugaron a 4000 rpm/10 min/4°C. Se separó la fase polar y la fase orgánica y se transfirieron a tubos Falcon nuevos, se evaporó el solvente y se liofilizó. Se guardó hasta el análisis por RMN⁷⁰.

4.2.3.5 Preparación de muestras y parámetros de adquisición de espectros de RMN de ¹H

Previo a la adquisición de datos en el RMN, a las muestras de medio liofilizado, se les añadió 500 µL de solución de TSP (3-trimetilsililpropionato de sodio-d4) 0.05 mM (Sigma-Aldrich Co 97%). Posteriormente se transfirieron a un tubo de 5mm para realizar el análisis de RMN de ¹H. Los extractos polares secos se reconstituyeron en 500 µL de TSP (0.05 mM) en D₂O y los extractos lipofílicos con TMS (Tetrametilsilano) 0.05 mM en cloroformo deuterado. Se transfirieron las muestras a tubos de RMN de 5 mm para el análisis. El análisis se hizo por triplicado.

Las muestras se analizaron en un espectrómetro Varian 600 MHz. Los parámetros de adquisición fueron los siguientes: tamaño FID = 64 K, ancho espectral = 10.50 ppm, ganancia = 1, tiempo de adquisición = 2.18 s, tiempo de relajación = 10 s, y resolución del FID = 0.45 Hz. Número de scan= 512.

4.2.3.6 Análisis de resultados

En los espectros resultantes de RMN de ^1H se ajustó la fase y la línea de base, se calibro la señal TSP y TMS a 0.0 ppm utilizando el programa MestReNova (versión 6.0.2; MestReC).

Los espectros se importaron al software Chenomx NMR Suite 8.2 (Chenomx, Inc., Canadá) en el que se realizó la identificación y cuantificación de los metabolitos. Chenomx funciona adaptando señales de su base de datos espectrales interna a las señales dentro de los espectros experimentales. Después de ajustar la señal experimental, el software calcula la concentración relativa (mM) al TSP o TMS dependiendo de la muestra. Además, se utilizó la comparación y coincidencia de los picos equivalentes a los metabolitos en la base de datos de Human Metabolome Database⁷¹ para confirmar los compuestos. El análisis estadístico de la cantidad relativa de metabolitos identificados se realizó mediante GraphPad Prism (versión 9.0.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California, EE. UU.). Se realizó un análisis de varianza One-way (ANOVA), seguido de la prueba de comparación múltiple de

Newman-Keuls para el análisis estadístico de la producción relativa de metabolitos entre las diferentes muestras. Se determinó una diferencia significativa entre los grupos con un valor de $p \leq 0,05$. Todos los análisis se realizaron utilizando tres réplicas de cada línea celular y se presentan en los gráficos como medias \pm desviación estándar.

4.2.3.6.1 *Bucketing* para análisis metabolómico no dirigido

El espectro de RMN se dividió en una serie de “*buckets*” o secciones con un ancho de áreas uniforme cada uno de 0,04 ppm. Los datos de RMN resultantes se digitalizaron en una matriz con valores numéricos correspondientes a las áreas de pico de cada sección. Estos valores se introdujeron en un archivo de texto (.csv) para un análisis adicional general de los datos espectroscópicos. Este procesamiento de datos fue realizado por el software MestReNova (versión 6.0.2; MestReC).

4.2.3.6.2 Análisis multivariado dirigido

Los datos de concentración de metabolitos identificados se sometieron a un análisis estadístico multivariado con el software Metaboanalyst 5.0. Se utilizó el análisis de componentes principales (PCA) para la descripción general de los datos y la detección de valores atípicos. Los datos se modelaron con el método

supervisado de análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales dispersos (sPLS-DA) que ayuda a mejorar la distribución y la separación de los grupos de estudio. La calidad del modelo se describió por los parámetros de R² y Q², donde R² es el coeficiente de determinación y Q² indica la relevancia predictiva, si R² es cercano a 1 y Q² ≥ 0.5 indican un buen modelo⁷². Los análisis se aplicaron en una matriz de datos de escala de Pareto normalizada por sum (normaliza dividiendo el valor de una muestra entre la suma de su serie, esto reduce el conjunto de datos de modo que los datos normalizados se encuentren entre 0 y 1) utilizando el software Metaboanalyst. Los puntajes de Influencia variable en la proyección (VIP) muestra los metabolitos que influyen en la separación de los grupos fueron proporcionados y calculados por el software. Se utilizó este mismo software para realizar el modelo de agrupamiento jerárquico y la visualización de mapas de calor de los metabolitos cuantificados entre los tratamientos y controles del extracto intracelular y extracelular. Todos los análisis estadísticos aquí descritos se generaron en una matriz de datos de escala de Pareto y los datos se normalizaron por su sum.

4.2.4 Residuos

4.2.4.1 Disposición de residuos

El manejo de residuos se realizó de acuerdo con las normas establecidas por la Facultad de Ciencias Químicas y el CINVESTAV.

CAPITULO 5.

RESULTADOS

5.1 Obtención del extracto metanólico de *C. hadiensis*

Después de macerar en metanol el material vegetal liofilizado por 48 horas, se obtuvo el extracto metanólico de la parte aérea de la planta. Este extracto se llevó a sequedad por evaporación a presión reducida y se obtuvieron 2.76g de extracto seco obtuvo. El porcentaje de rendimiento calculado fue de 6.71%.

5.2 Citotoxicidad en la línea Vero

Para determinar la citotoxicidad del extracto metanólico de *C. hadiensis*, la línea celular no cancerígena Vero se expuso a diferentes concentraciones (31.25, 62.50, 125, 250 ,500 µg/mL) del extracto vegetal por 48h y se comparó con el fármaco de referencia, vincristina. Se observó que la viabilidad celular de la línea Vero expuesta por 48 h al extracto disminuyó solo en un 6% en la concentración más baja evaluada (31.25 µg/mL). La viabilidad continuó disminuyendo, respondiendo al aumento de la concentración del extracto.

Observamos que la viabilidad disminuyó un 10% por cada aumento de concentración hasta los 125µg/mL a partir de aquí solo disminuyó 5% (Tabla 4). En la concentración más alta evaluada (500 µg/mL) se observó una disminución total del 34% de la viabilidad celular.

Por otro lado, el control de células expuestas al fármaco de referencia (vincristina), mostró una disminución de casi el 30% de viabilidad desde la concentración más baja evaluada y continuó disminuyendo conforme aumentamos la concentración. En la concentración más alta evaluada (500 µg/m) el fármaco disminuyó 42% la viabilidad de las células (tabla 4).

Pudimos observar en el extracto metanólico vegetal y la vincristina un comportamiento similar. Ambos disminuyen la viabilidad conforme aumenta la concentración. Sin embargo, la vincristina disminuyó en mayor medida la viabilidad celular desde la concentración más baja, mientras que el extracto tiene que llegar a concentraciones más altas para afectar significativamente las células sanas (figura 7).

Tabla 4. Evaluación de la citotoxicidad del extracto metanólico de *C. hadiensis*. Porcentaje de viabilidad celular de la línea Vero expuesta a distintas concentraciones del extracto metanólico y el fármaco de referencia vincristina. Los datos se presentan como media ± DE (desviación estándar) de tres experimentos independientes. * P<0.05, ** P<0.01. *** P< 0.001 en comparación con el control positivo.

| [$\mu\text{g/mL}$] | % viabilidad \pm DE | |
|----------------------|-----------------------|------------------|
| | Extracto | Vincristina |
| 0 | 100 | 100 |
| 31.25 | 93.83 \pm 4.25** | 71.54 \pm 3.83 |
| 62.5 | 84.30 \pm 8.14* | 65.66 \pm 0.82 |
| 125 | 73.52 \pm 1.73 | 62.44 \pm 0.22 |
| 250 | 69.16 \pm 1.70 | 60.01 \pm 2.20 |
| 500 | 66.16 \pm 1.54 | 57.74 \pm 0.71 |

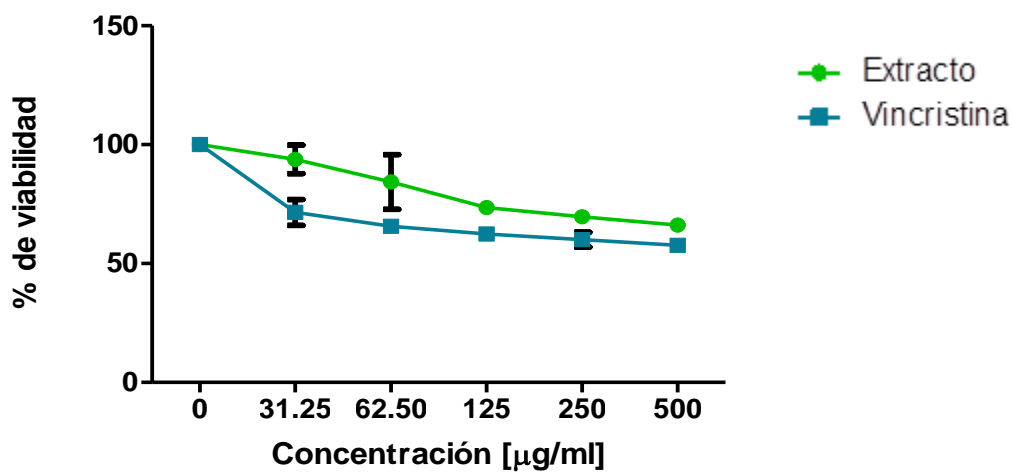


Figura 7. Evaluación de la citotoxicidad del extracto metanólico de *C. hadiensis*. Porcentaje de viabilidad celular de las células Vero obtenido después de 48 h de exposición al extracto metanólico de *C. hadiensis* o el anticancerígeno vincristina como fármaco de referencia. Viabilidad celular medida mediante la prueba de MTT por triplicado.

Las IC₅₀ se calcularon a partir de los resultados de viabilidad obtenidos en la **tabla 4**. El extracto de metanol de *C.hadiensis* en células Vero alcanzó un valor de IC₅₀ de 618 µg/ml. Por otro lado, la vincristina utilizada como fármaco de referencia alcanzó un valor de IC₅₀ de 502 µg/ml. Podemos observar que existe una diferencia en la citotoxicidad de ambos tratamientos, se requiere de una mayor concentración del extracto para disminuir la viabilidad celular al 50%.

5.3 Actividad anticancerígena *in vitro* en la línea HTB- 177

Para determinar la actividad anticancerígena *in vitro* del extracto metanólico de *C. hadiensis*, la línea celular HTB 177 de cáncer de pulmón se expuso a diferentes concentraciones (31.25, 62.50, 125, 250 ,500 µg/mL) del extracto vegetal. Se observó que la viabilidad celular de la línea HTB-177 expuesta al extracto por 48 h disminuyó en un 22% a partir de la concentración más baja (31.25 µg/mL). La viabilidad continuó disminuyendo conforme aumentó la concentración del extracto. En promedio, por cada aumento de concentración bajó en un 10% la viabilidad de las células cancerígenas. En la concentración más alta aplicada (500 µg/mL) se observó una disminución del 60% de la viabilidad celular, esto nos sugiere una actividad dependiente de dosis (figura 8).

Observamos una disminución del 51% en viabilidad de las células HTB 177 expuestas al fármaco vincristina a la concentración más baja. La viabilidad continuó disminuyendo conforme se aumentó la concentración hasta llegar a un 32% de viabilidad a la concentración más alta (tabla 5, figura 8).

Tabla 5. Evaluación de la actividad anticancerígena del extracto metanólico de *C.hadiensis*. Porcentaje de viabilidad celular de las células cancerígenas HTB 177 expuestas a distintas concentraciones del extracto metanólico y al fármaco de referencia vincristina. Los datos se presentan como media \pm DE (desviación estándar) de tres experimentos independientes. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. *** $P < 0.001$ en comparación con el control positivo.

| [$\mu\text{g/mL}$] | % viabilidad \pm DE | |
|----------------------|-----------------------|------------------|
| | Extracto | Vincristina |
| 0 | 100 | 100 |
| 31.25 | 78.41 \pm 9.52*** | 48.96 \pm 0.12 |
| 62.5 | 64.63 \pm 6.88* | 43.20 \pm 2.54 |
| 125 | 58.60 \pm 4.31* | 38.37 \pm 3.55 |
| 250 | 46.45 \pm 1.25 | 32.90 \pm 3.78 |
| 500 | 39.58 \pm 6.33 | 31.93 \pm 3.24 |

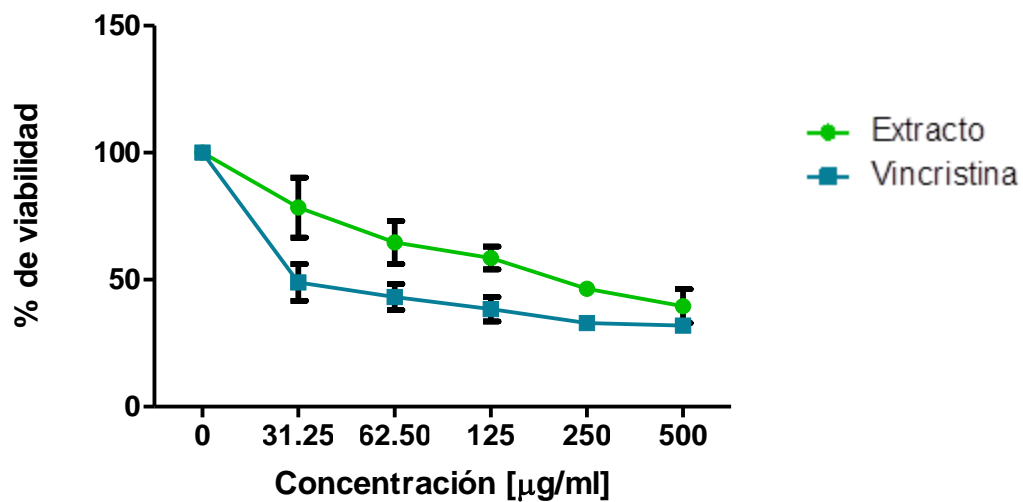


Figura 8. Evaluación de la actividad anticancerígena del extracto metanólico de *C.hadiensis*. Porcentaje de viabilidad celular de la línea de cáncer de pulmón HTB 177 después de 48 h de exposición al extracto metanólico de *C. hadiensis* y el anticancerígeno vincristina como fármaco de referencia. Viabilidad medida mediante la prueba de MTT por triplicado.

Las IC₅₀ se calcularon a partir de los resultados de viabilidad obtenidos en la **tabla 5**. El extracto de metanol de *C.hadiensis* en células HTB 177 alcanzó un valor de IC₅₀ de 192.85 µg/ml. Por otro lado, en la vincristina utilizada como fármaco de referencia observamos un valor de IC₅₀ de 42.81 µg/ml.

5.3.1 Comparación de los efectos del extracto y el fármaco de referencia vincristina en ambas líneas celulares

A partir de los resultados anteriores se realizó un análisis para correlacionar la citotoxicidad y la actividad anticancerígena *in vitro* del extracto. En la **Figura 9** se muestra la actividad del extracto en las células cancerígenas. Pudimos observar que el extracto, desde la concentración más baja redujo significativamente la viabilidad celular de la línea HTB-177 (a menos del 80%) en una manera dependiente de la dosis. Por otro lado, observamos que para la línea celular Vero, el extracto disminuyó en menor medida la viabilidad celular (93%).

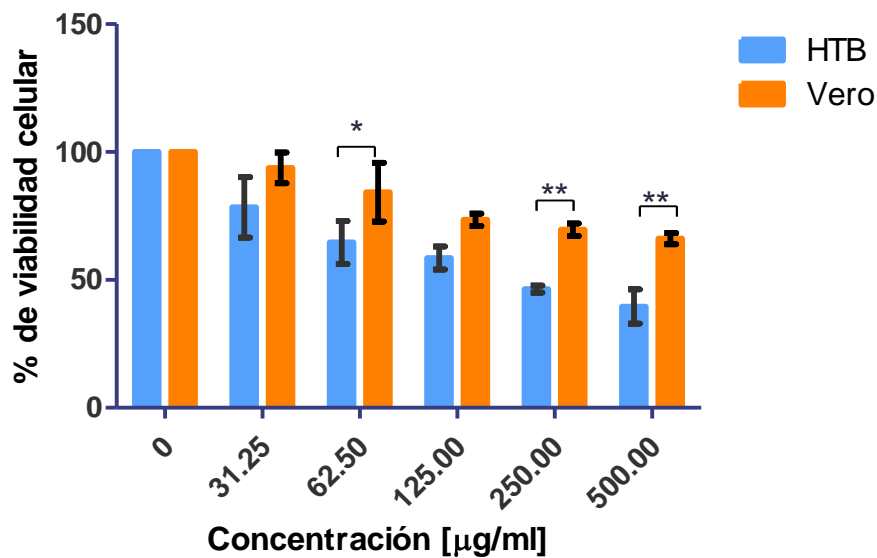


Figura 9. Comparación del porcentaje de la viabilidad obtenida en ambas líneas celulares expuestas al extracto metanólico de *C. hadiensis*. El análisis se realizó por triplicado. El asterisco (*) indica diferencia significativa * P<0.05, ** P<0.01

Se realizó también un análisis comparativo de la citotoxicidad y la actividad anticancerígena del fármaco de referencia vincristina. En la **figura 10** se muestra la actividad de la vincristina en ambas líneas celulares. Se puede observar que desde la concentración más baja de 31.25 $\mu\text{g/ml}$ esta molécula redujo rápidamente la viabilidad celular de la línea HTB-177 a menos del 50% de viabilidad. El porcentaje de viabilidad continúa disminuyendo conforme va aumentando la concentración del fármaco.

Por otro lado, para la línea celular Vero, observamos que la viabilidad disminuyó en menor medida. Sin embargo, se vio mucho más afectada por esta molécula en comparación con el extracto de la planta. Observamos una disminución de la viabilidad al 70% en la concentración de 31.25 $\mu\text{g/ml}$ y siguió bajando al aumentar la concentración.

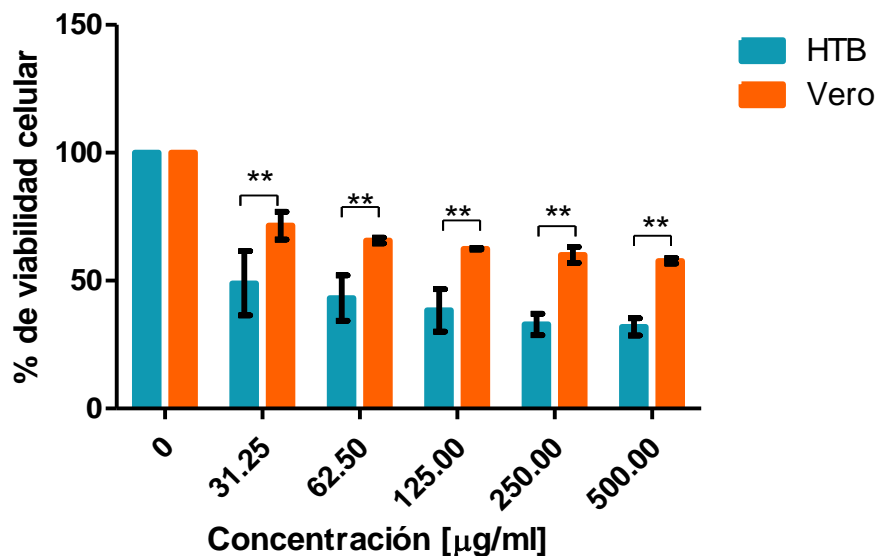


Figura 10. Comparación del porcentaje de la viabilidad obtenida en ambas líneas celulares expuestas a la vincristina. El análisis se realizó por triplicado. El asterisco (*) indica diferencia significativa * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

5.4 Análisis del metaboloma de células Vero y HTB-177

5.4.1 Espectros de ^1H RMN

Cada línea celular se expuso al extracto vegetal por 48h a la concentración IC_{50} correspondiente. Los extractos intracelulares, polar (figura 11) y lipofílico (figura 12) y del medio extracelular (figura 13) obtenidos posterior al tratamiento se analizaron por 1D ^1H RMN en un rango de 0 a 12 ppm.

Los espectros representativos 1D ^1H RMN de cada línea celular (tratada y no tratada) en cada uno de sus extractos presentó variaciones cuantitativas y cualitativas. Una inspección visual de los espectros reveló diferencias entre los perfiles, observamos aumento o disminución de la intensidad de las señales en comparación con los controles sin tratamiento (figuras 11-13).

Los espectros de RMN revelaron una reducción de las señales en la región de carbohidratos (δH 3,0–5,5 ppm) después del tratamiento en los extractos, donde se observó una disminución mayor en las muestras de células HTB 177. La intensidad de las señales de las regiones alifáticas (δH 1.0–3.0 ppm), en el extracto intracelular polar, lipofílico y extracelular, disminuyeron y algunas señales aumentaron en intensidad en ambas líneas celulares en respuesta al tratamiento. En la región aromática (δH 6.0–8.0 ppm) no se observan cambios

marcados en las intensidades de los picos. En la región de aldehídos (δ H 8.5-10 ppm) se encontró una señal en los extractos polares y extracelulares que disminuye después del tratamiento.

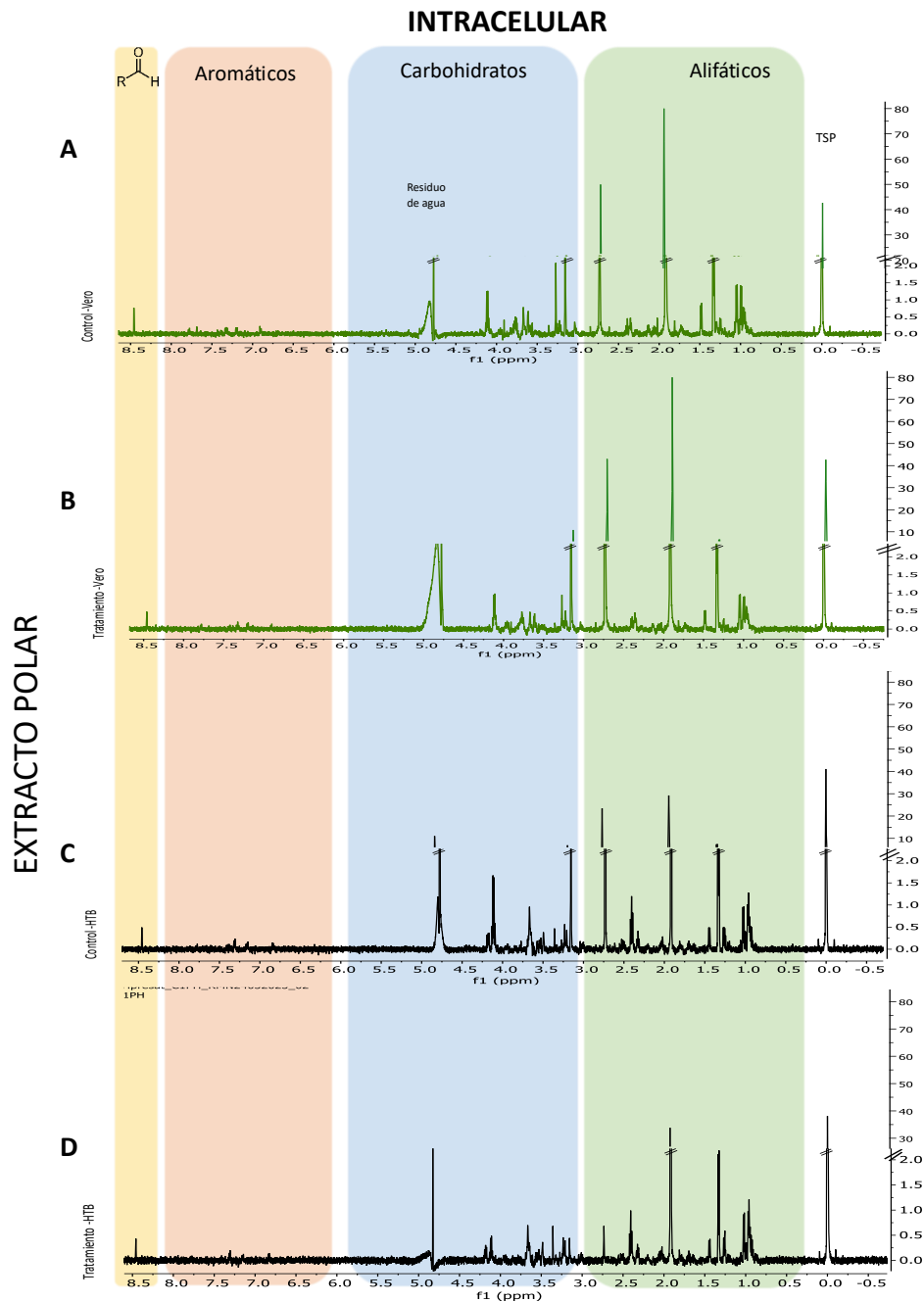


Figura 11. Espectros ^1H RMN apilados correspondientes al extracto intracelular polar de células Vero, control sin tratamiento (A), células Vero expuestas al extracto por 48h (B), células HTB-177 control sin tratamiento (C) y células HTB-177 expuestas al extracto por 48h (D).

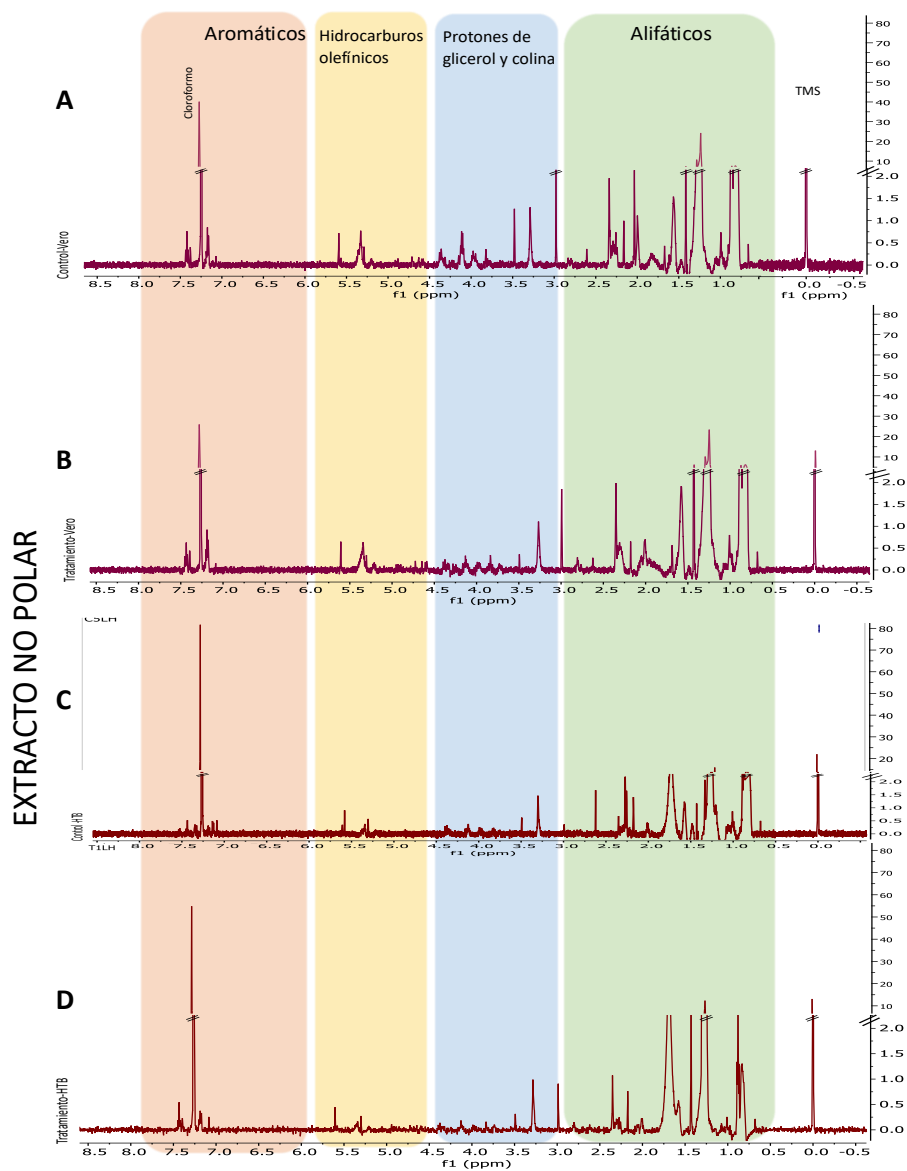


Figura 12. Espectros ¹H RMN apilados correspondientes al extracto intracelular lipofílico de células Vero, control sin tratamiento (A), células Vero expuestas al extracto por 48h (B), células HTB-177 control sin tratamiento (C) y células HTB-177 expuestas al extracto por 48h (D).

EXTRACELULAR

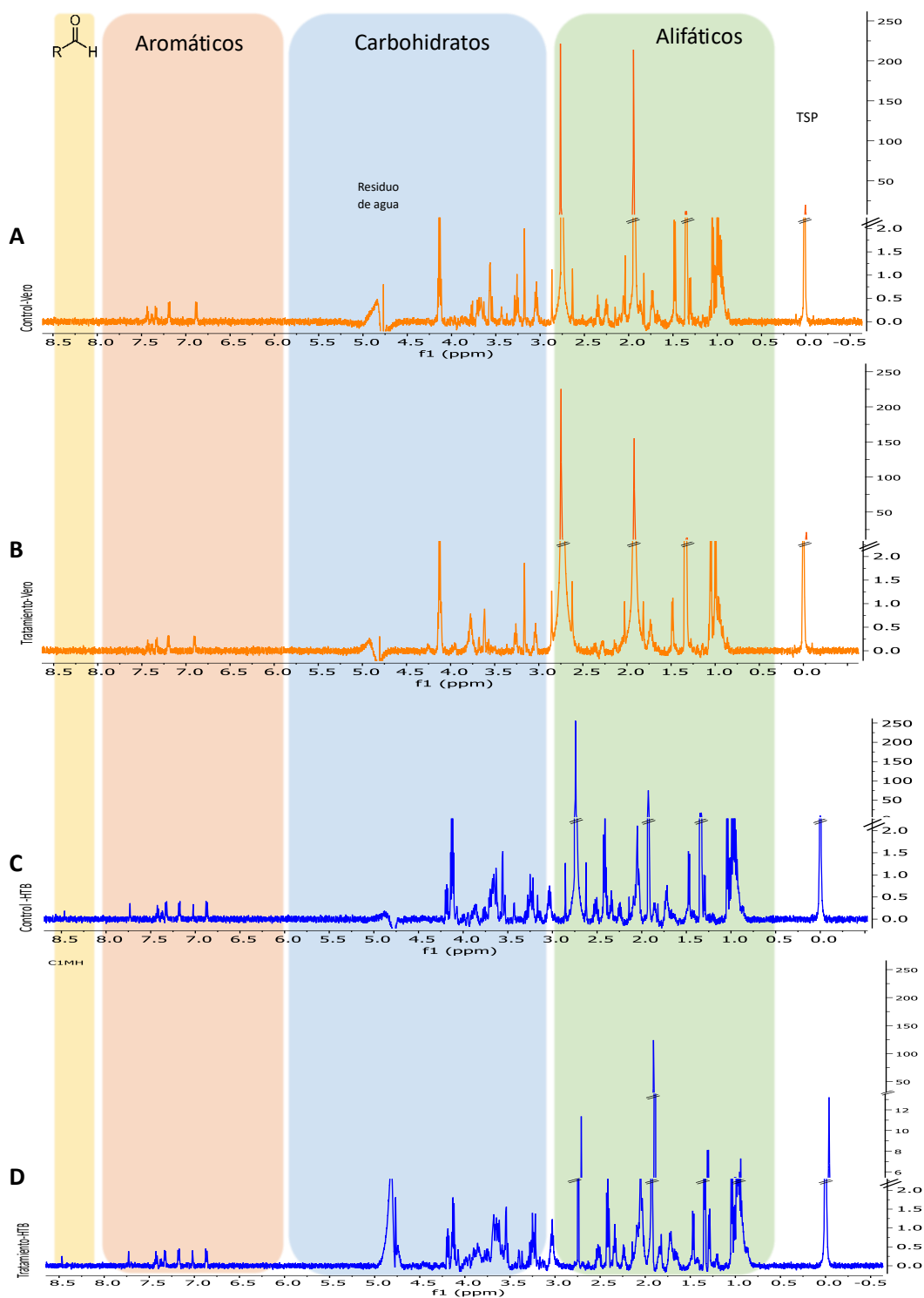


Figura 13. Espectros ^1H RMN apilados correspondientes al extracto extracelular (medio de cultivo) de células Vero, control sin tratamiento (A), células Vero expuestas al extracto por 48h (B), células HTB-177 control sin tratamiento (C) y células HTB-177 expuestas al extracto por 48h (D).

5.4.2 Metabolómica no dirigida. Análisis multivariado no dirigido.

La metabolómica no dirigida es el análisis integral de todos los analitos medibles en una muestra, incluidos los compuestos desconocidos. Del espectro de cada muestra y tratamiento, se obtienen las abundancias relativas de la totalidad de los metabolitos que se encuentran en esa muestra. Esto nos permite determinar los cambios y comportamientos generales en el metaboloma de la célula en respuesta al tratamiento.

Analizamos el efecto general de la exposición al extracto metabólico de *C. hadiensis* en los distintos extractos obtenidos de cada tipo celular tratado y no tratado. Para ello, se realizó el estudio no dirigido de los datos del metaboloma (áreas relativas de los picos) registrados en el ^1H RMN para cada grupo de muestras. Este análisis consistió en hacer un *bucketing* o *binning* (agrupamiento) de tres réplicas de cada muestra (control y tratamiento en cada línea celular).

En la figura 14 se muestran los PCA (unsupervised principal component analysis) de los extractos intracelulares polar y lipofílico de las células Vero y HTB-177, así como del medio de cultivo (extracto extracelular). En los tres extractos podemos observar una clara separación entre los grupos control y tratamiento. Esto nos indica que, las cantidades de los metabolitos polares y no polares presentes en cada tipo celular y tratamiento son distintas. Observamos que, la separación entre los controles de células vero y la línea cancerígena es

muy evidente. Comparando cada línea celular tratada con su respectivo control, observamos que la separación entre la línea celular vero sin tratar y tratada es mucho menos grande que la separación entre las células HTB-177 tratadas y sin tratar. Esto nos indica un menor efecto del extracto en las células sanas en comparación con el efecto observado más marcado en las cancerígenas.

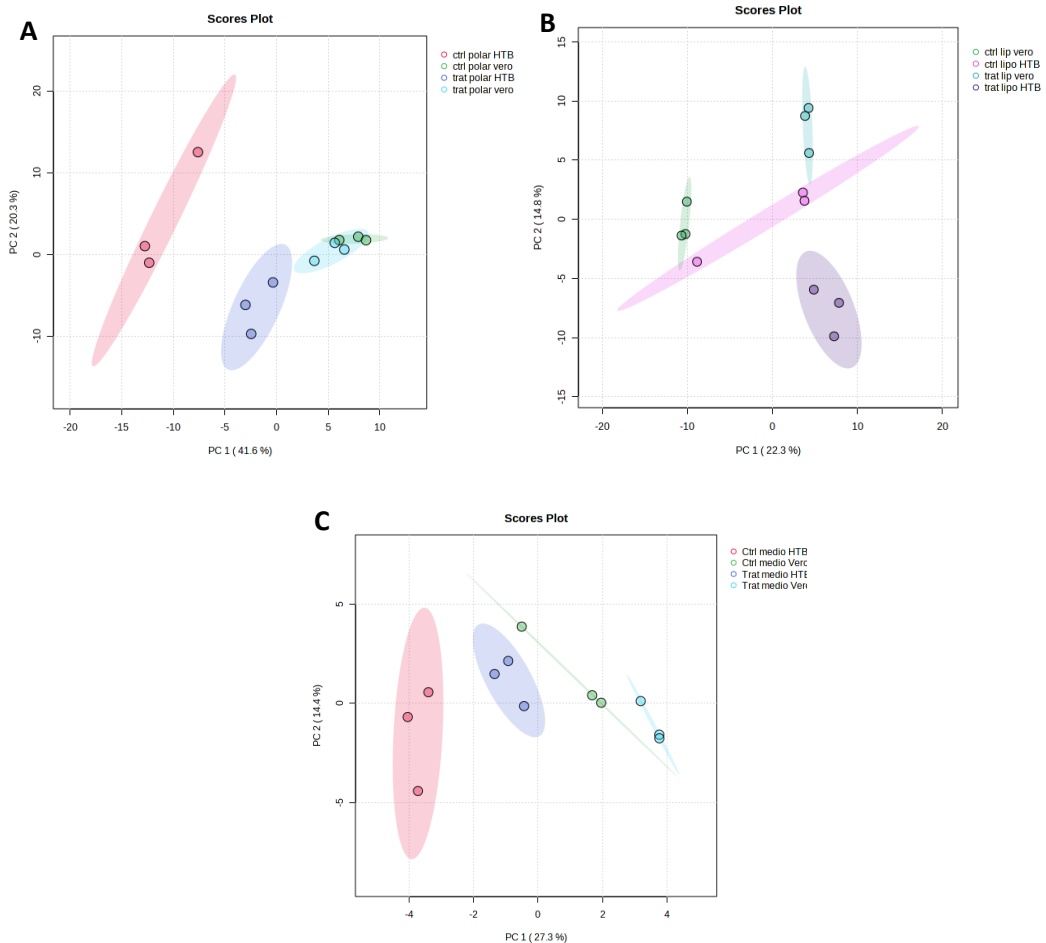


Figura 14. Análisis no dirigido de PCA del efecto del extracto de *C. hadiensis* en las células Vero y HTB 177 con y sin tratamiento. Extracto intracelular polar (A), extracto intracelular lipofílico (B) y extracto extracelular (C). Los círculos verdes son el control de células Vero, los celestes el tratamiento con el extracto vegetal, los rosas son el control de HTB 177 y los morados su respectivo tratamiento.

Realizamos el modelo supervisado sPLS-DA (Sparse Partial Least Squares Discriminant Analysis). Este proporciona un enfoque de dos etapas para la clasificación basada en PLS con selección de variables, al imponer directamente escasez en el paso de reducción de dimensiones de PLS utilizando mínimos cuadrados parciales dispersos (SPLS), mejorando así la separación de grupos. La comparación por este análisis fue realizada entre controles y muestras tratadas de los tres extractos (intracelular polar, lipofílico y extracelular) en cada tipo celular.

Los parámetros de los modelos sPLS-DA para la clasificación se evaluaron comparando su predictibilidad Q^2 (figura 15). En todos los casos, de los análisis resultó una buena separación de las muestras tratadas, con respecto a las muestras de control. En particular, la capacidad predictiva más alta (valor Q^2 de 0.7445) se encontró para el modelo de extracto lipofílico, seguido por el modelo extracelular ($Q^2 = 0.6869$), mientras que el extracto polar tuvo la capacidad predictiva más baja ($Q^2 = 0.5368$). Cabe señalar que una mayor capacidad predictiva del modelo también indica una mayor diferenciación de las clases de muestra.

También debe notarse que una dispersión razonable entre las muestras tratadas (con respecto a los controles) fue evidente en los tres casos, con el mayor valor de R^2 para el sPLS-DA obtenido del extracto lipofílico ($R^2 = 0.8994$), seguido por el extracto polar ($R^2 = 0.8994$) y por último el extracelular ($R^2 = 0.8538$). En el sPLS-DA se observa mejor el comportamiento ya visto en el PCA. Ambos grupos de las células Vero están más cerca entre sí que los

grupos de las HTB. Hay un mayor efecto del extracto en el metaboloma de las células HTB 177.

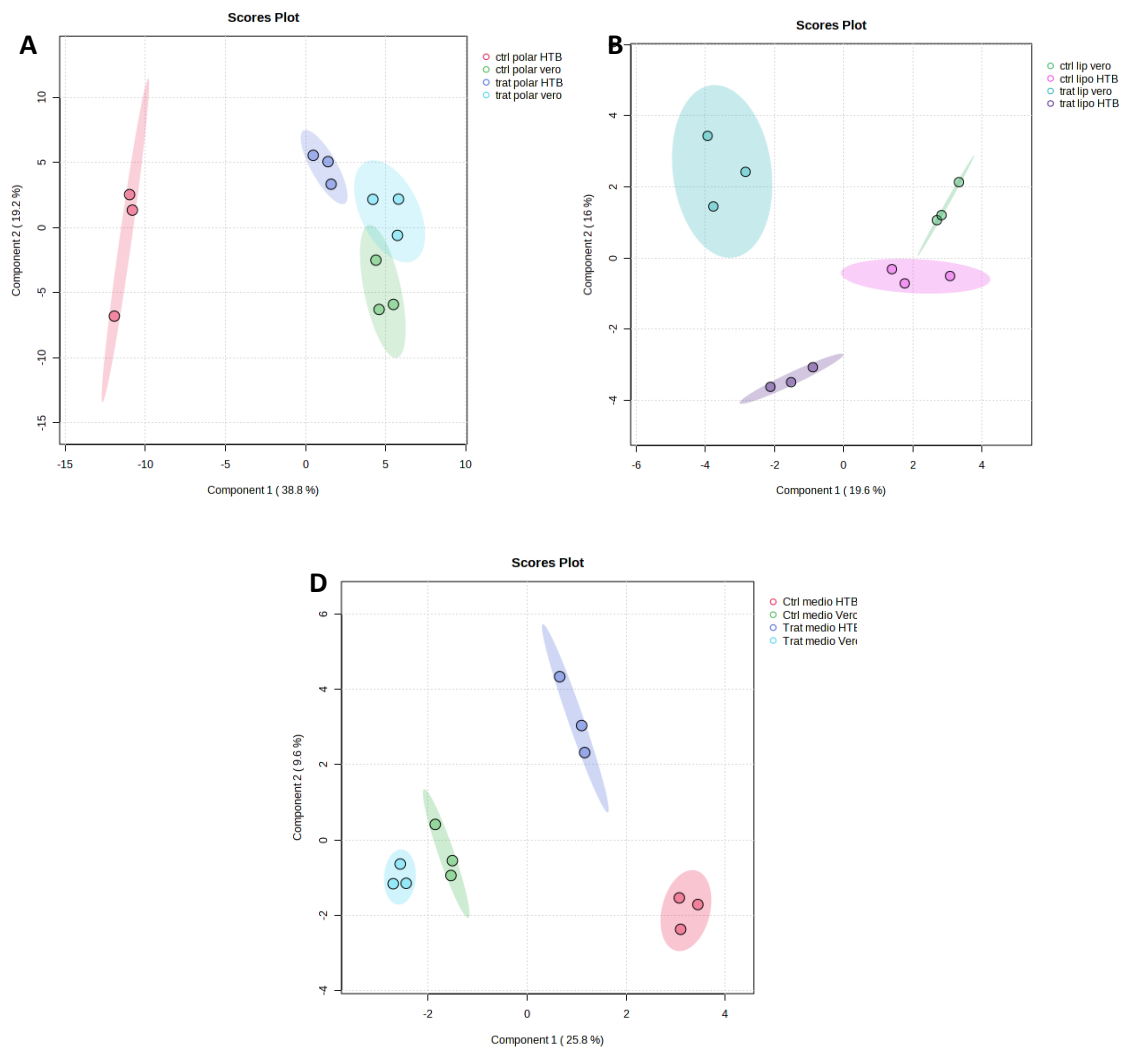


Figura 15. Análisis no dirigido de sPLS-DA del efecto del extracto de *C. hadiensis* en las células Vero y HTB 177 con y sin tratamiento. Extracto intracelular polar (A), extracto intracelular lipofílico (B) y extracto extracelular (C). Los círculos verdes son el control de células Vero, los celestes el tratamiento con el extracto vegetal, los rosas son el control de HTB 177 y los morados su respectivo tratamiento.

5.4.3 Metabolómica dirigida. Metabolitos identificados

La comparación de los desplazamientos químicos obtenidos experimentalmente en RMN y las señales específicas reportadas en condiciones similares en Chenomx y en la base de datos (HMDB) (D_2O , CCl_3D , pH 6.0, 600MHz) permitió la identificación de 34 compuestos.

Los metabolitos identificados en los espectros se encuentran en la tabla 6. Principalmente se encontraron aminoácidos, metabolitos de las rutas de glucolisis, del ciclo de Krebs, lípidos, cuerpos cetónicos y algunos otros.

Tabla 6. Nombres, desplazamiento químico y clasificación por ruta metabólica de los 34 metabolitos identificados en los extractos obtenidos de las muestras celulares.

| Ruta metabólica | Metabolito | Desplazamiento (ppm) en experimento 1D | Referencia |
|-----------------------|-----------------|--|-------------|
| Glucolisis | Glucosa | 5.23,4.64,(3.89-3.23) | HMDB0000122 |
| | Piruvato | 2.4 | HMDB0000243 |
| | Lactato | 4.1,1.3 | HMDB0000190 |
| Ciclo de Krebs | Succinato | 2.39 | HMDB0000254 |
| | Ácido cítrico | 2.42,2.52,2.66 | HMDB0000094 |
| Aminoácidos | Ácido glutámico | 2.10,2.15,2.36,3.75 | HMDB0000148 |
| | Tirosina | 6.91,7.21,3.9 | HMDB0000158 |
| | Fenilalanina | 3.13,3.99 | HMDB0000159 |
| | Alanina | 1.48 | HMDB0000161 |
| | Prolina | 1.99-2.09,2 | HMDB0000162 |
| | Treonina | 1.32,3.58 | HMDB0000167 |
| | Isoleucina | 1.02,0.99 | HMDB0000172 |
| | Lisina | 1.90.3.77 | HMDB0000182 |
| | Aspartato | 2.70,3.89,2.95,3.89 | HMDB0000191 |
| | Glutamina | 2.07-2.17,2.00-2.10 | HMDB0000641 |
| | Leucina | 0.96 | HMDB0000687 |
| | Metionina | 2.11-2.18,2.63,3.84 | HMDB0000696 |
| | Valina | 0.97,1.04 | HMDB0000883 |
| | Glicina | 3.56 | HMDB0000123 |

| | | | |
|-----------------------------|--------------------------|---------------------|--------------|
| | Betaína | 3.27,3.85 | HMDB0000043 |
| | Carnitina | 2.4,3.2,3.4,4.6 | HMDB0000062 |
| Lípidos/fosfolípidos | Colina | 3.55,4.07 | HMDB0000097 |
| | Glicerol | 3.43,3.60,3.61,3.85 | HMDB0000131 |
| | Fosfocolina | 3.21,3.59,4.16 | PubChem:1014 |
| Cuerpos cetónicos | Acetona | 2.22 | HMDB0001659 |
| | Acetoacetato | 2.3,3.4 | HMDB0304256 |
| | Ácido 2-hidroxi-butírico | 0.89,1.64,3.98 | HMDB0000008 |
| | Ácido 3-hidroxi-butírico | 1.19,2.29,2.39,4.14 | HMDB0000011 |
| Otros | Acetato | 1.91 | HMDB0000042 |
| | Creatina | 3.04,3.95 | HMDB0000064 |
| | Formiato | 8.4 | HMDB0000142 |
| | Creatinina | 3.03,4.04,4.09 | HMDB0000562 |
| | Malonato | 3.11 | HMDB0000691 |
| | Dimetilamina | 2.7 | HMDB0000087 |

5.4.4 Cuantificación relativa de los metabolitos identificados

Se utilizó el software Chenomx NMR Suite v.8.3 para la cuantificación relativa a TSP y TMS (0.05 mM) de todos los metabolitos previamente identificados. Chenomx funciona adaptando señales de su base de datos interna a las señales dentro de los espectros experimentales. Después de ajustar la señal experimental, el software calcula la concentración relativa al patrón interno correspondiente (TSP o TMS).

Los datos de concentración obtenidos se utilizaron para realizar gráficas de barras de los metabolitos de los extractos intracelular y extracelular. Se aplicó una prueba estadística One-way ANOVA aplicando la prueba Newman-Keuls para determinar la significancia.

5.4.4.1 Carbohidratos

Como se observa en la Figura 16, la glucosa intracelular disminuyó después del tratamiento en ambas líneas celulares, siendo significativo en las células HTB. En el extracto extracelular se puede ver que, al contrario del intracelular, aumentó la concentración de la glucosa en el medio. Lo que indicaría menor consumo de glucosa en las células.

5.4.4.2 Compuestos orgánicos

Los ácidos orgánicos juegan un papel central en el metabolismo primario, formando parte de la glucólisis, ciclo de Krebs y metabolismo de algunos aminoácidos. Observamos que, los niveles de algunos metabolitos intermediarios del ciclo de Krebs (ácido cítrico y succinato) disminuyeron significativamente después del tratamiento con el extracto en la línea celular HTB 177 en el extracto intracelular. Por otra parte, en células Vero ninguno de los metabolitos antes mencionados se vio afectado. Ambos metabolitos se encontraron en mayor concentración en las células de cáncer. En el extracto extracelular se observó una disminución de la concentración, en respuesta al tratamiento, de ambos metabolitos en las dos líneas celulares, pero solo el ácido cítrico presentó una disminución significativa en las células HTB 177.

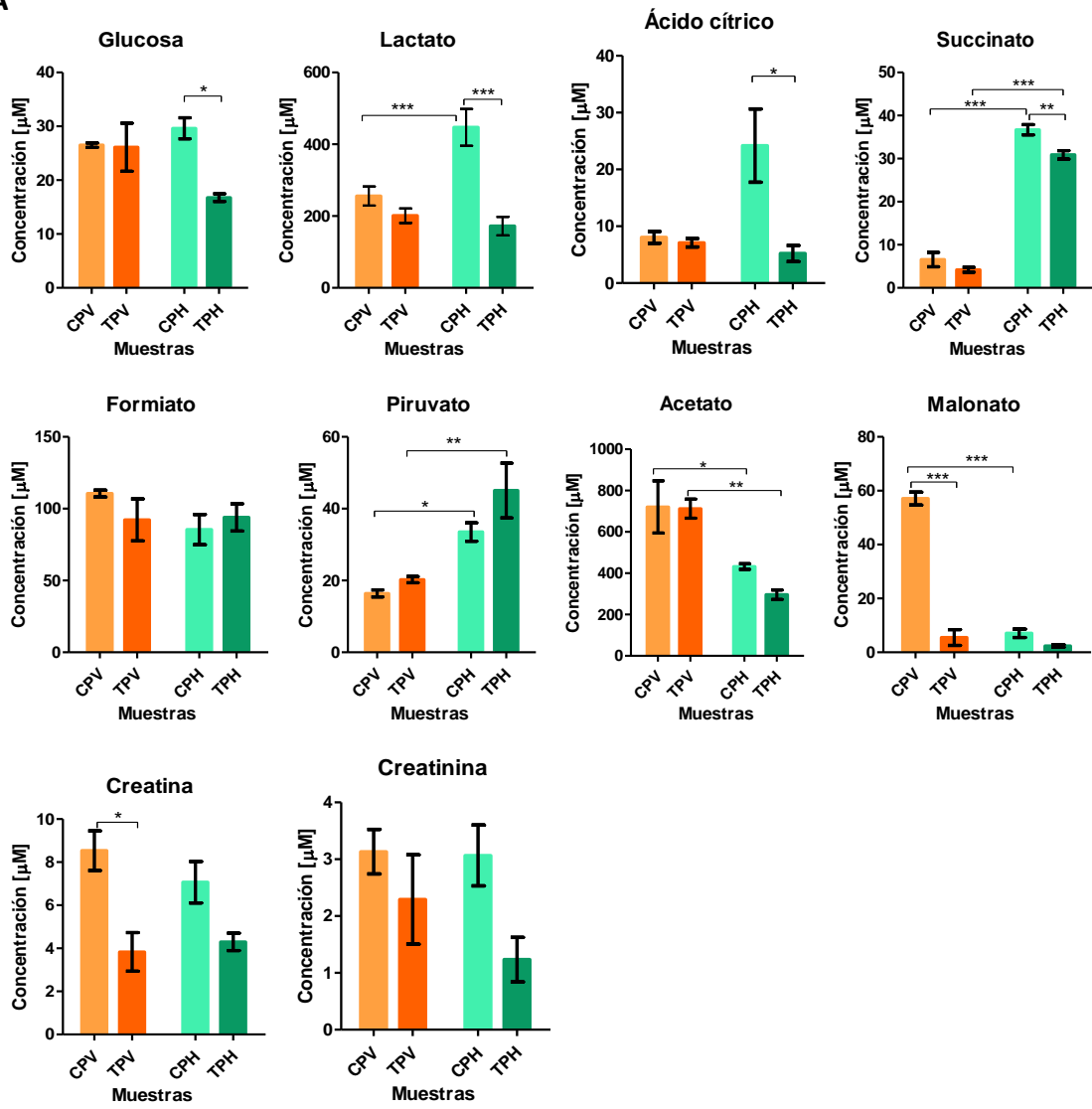
Relacionado a la ruta metabólica anterior, pudimos observar una mayor concentración de piruvato en el control del extracto intracelular de la línea cancerosa en comparación con la línea celular Vero. Además, observamos que

este metabolito mostró un aumento en la línea celular HTB después del tratamiento. Relacionado a esta misma ruta, el control de la línea HTB presentó una mayor cantidad de lactato en comparación con la línea celular Vero, esto en los extractos intracelular y extracelular. Además, observamos una clara disminución en la concentración de lactato en respuesta al tratamiento en ambos extractos, de manera estadísticamente significativa en las células HTB 177.

El formiato presentó concentraciones similares en ambas líneas celulares, sin cambios significativos. Por el contrario, en el extracto extracelular observamos mayor cantidad de formiato en las células control de HTB 177 y una disminución significativa en estas células después del tratamiento.

Otros compuestos orgánicos encontrados en el extracto intracelular, el acetato, creatinina, malonato y creatina, disminuyeron después del tratamiento en ambas líneas celulares, siendo significativa la disminución de estos dos últimos solo en la línea celular Vero. El acetato y el malonato se encontraron en mayor cantidad en el control de la línea celular Vero. En el extracto extracelular, de igual manera, estos cuatro metabolitos disminuyeron después del tratamiento de manera significativa en ambas líneas celulares (a excepción del acetato que aumentó en células Vero). A diferencia del extracto intracelular, el malonato y la creatina se encontraron en mayor concentración en las células control HTB 177 en comparación con el control de células Vero. **Figura 16.**

A



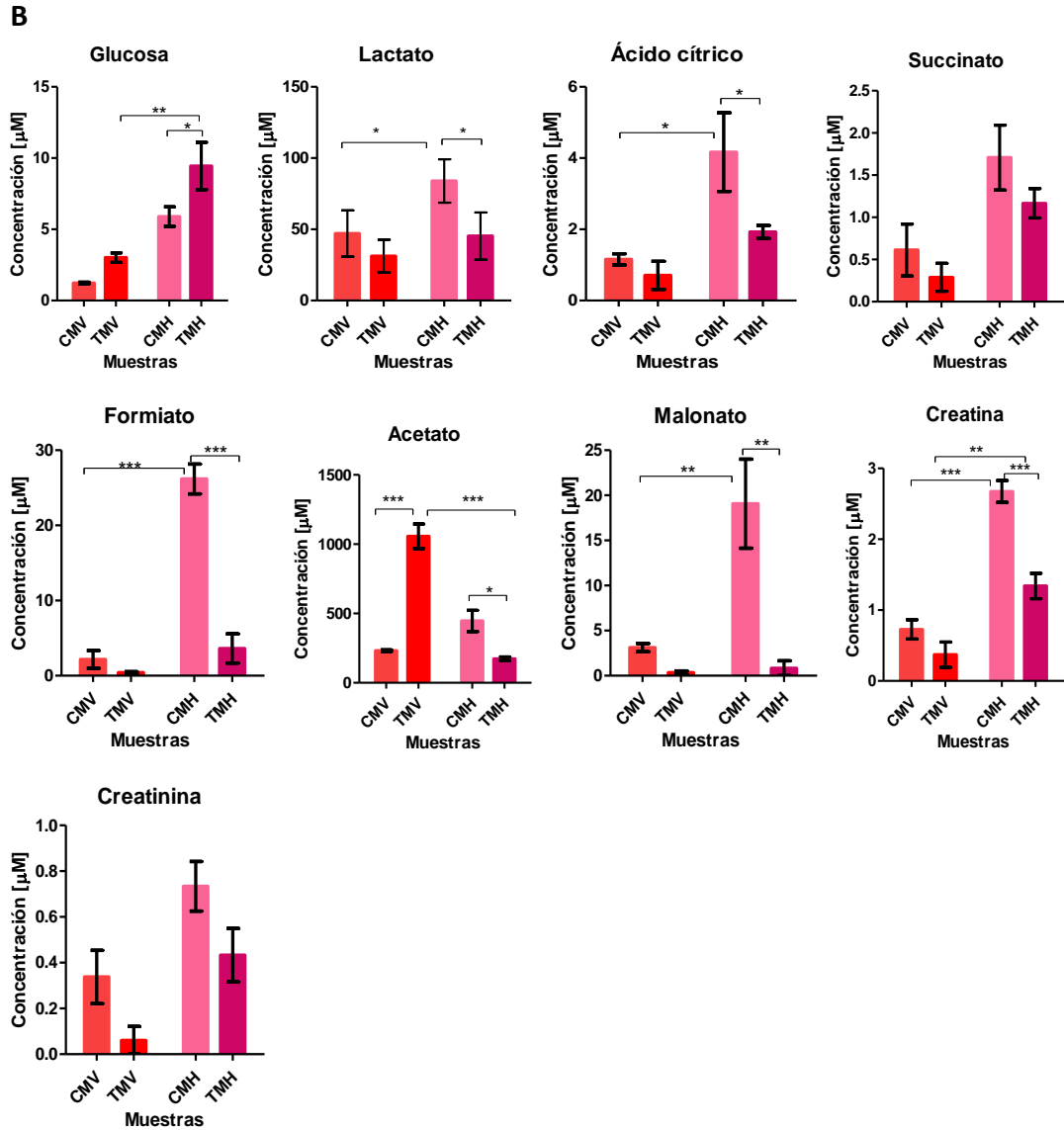


Figura 16. Concentración de carbohidratos y metabolitos orgánicos en el extracto intracelular (A) y extracelular (B). Control intracelular polar Vero (CPV), tratamiento polar Vero (TPV), control intracelular polar HTB 177 (CPH), tratamiento polar HTB 177 (TPH), control intracelular lipofílico Vero (CLV), extracto lipofílico del tratamiento de Vero (TLV), extracto lipofílico del control de HTB-177 (CLH), extracto lipofílico del tratamiento de HTB-177 (TLH), control medio extracelular Vero (CMV), tratamiento medio extracelular Vero (TMV), control medio extracelular HTB 177 (CMH), tratamiento medio extracelular HTB 177 (TMH). Las barras con *, ** y ***

indican $P < 0.05$, $P < 0.01$ y $P < 0.001$, respectivamente. (Los picos de los corchetes indican cuales muestras se están comparando)

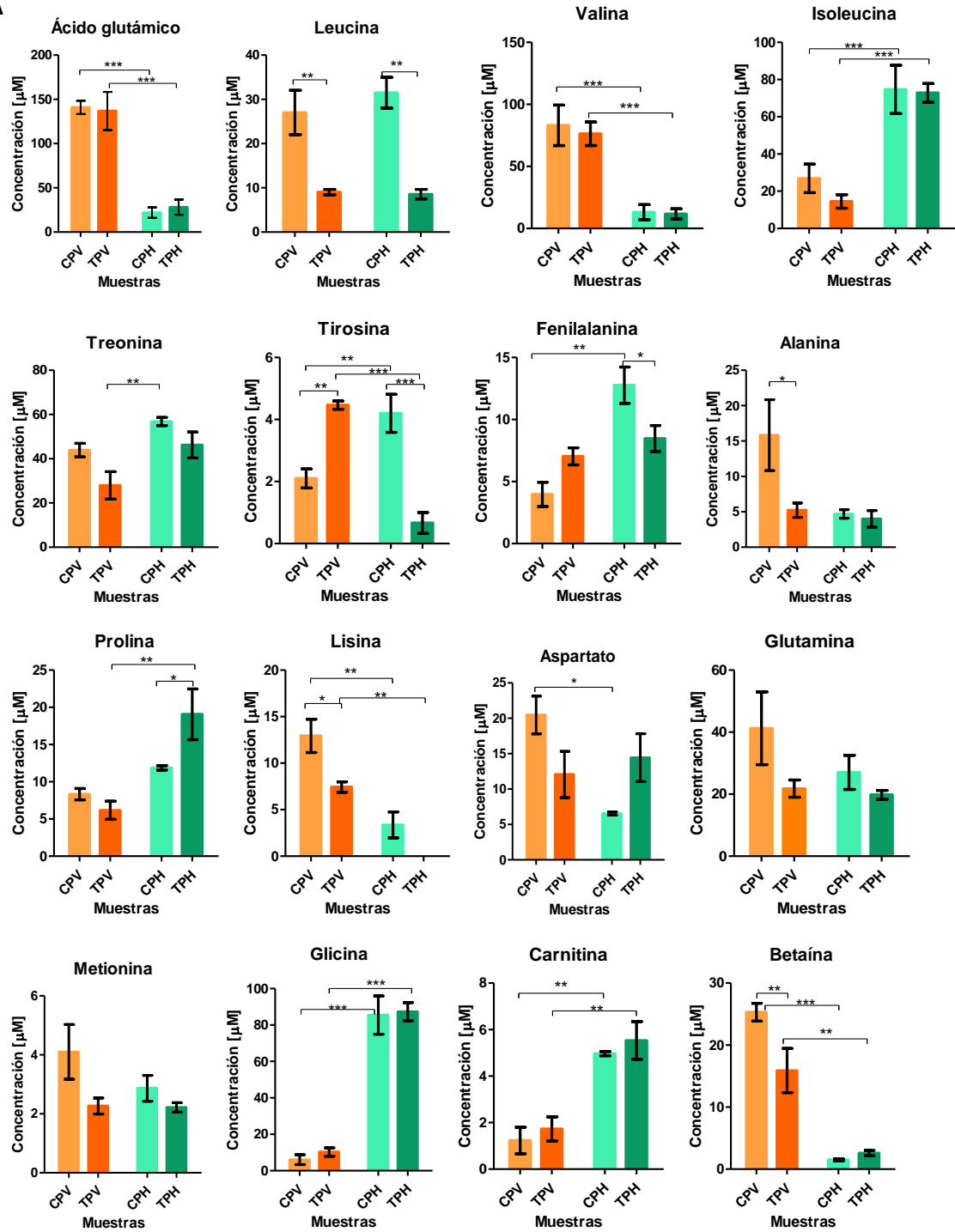
5.4.4.3 Aminoácidos

En el extracto intracelular observamos que, en la línea celular Vero el extracto provocó una disminución significativa de los aminoácidos alanina, lisina, betaína y leucina, este último tuvo un comportamiento similar en las células HTB-177 donde también hubo una disminución significativa. La concentración de tirosina y fenilalanina disminuyó en respuesta al tratamiento en las células cancerígenas.

Se observó un aumento significativo de la tirosina en las células Vero, que como se mencionó, en las células HTB tuvo un efecto contrario. En esta misma línea celular, se encontró un aumento significativo de prolina después del tratamiento (figura 17).

Por otro lado, en el extracto extracelular del cultivo de células Vero se observó solo la disminución significativa de la metionina y treonina, este último también tuvo una disminución significativa en las células HTB, en donde previo al tratamiento se encontraba en mayor concentración comparado con las células sanas. Además, en las células de cáncer disminuyó significativamente la concentración extracelular de los aminoácidos glutamina, alanina, aspartato y carnitina, se observó un aumento significativo de prolina y leucina (figura 17).

A



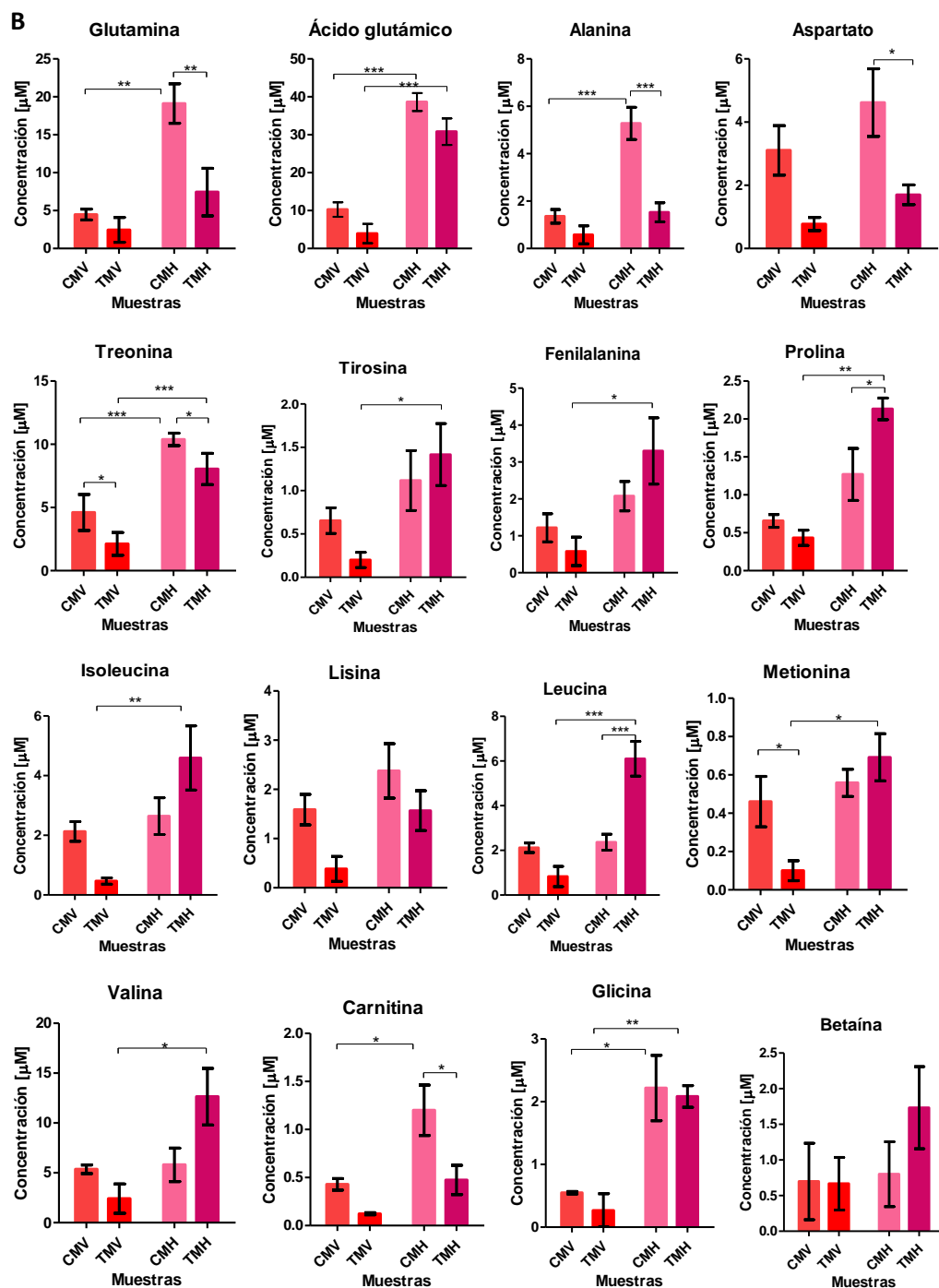


Figura 17. Concentración de aminoácidos en el extracto intracelular (A) y extracelular (B). Control intracelular polar Vero (CPV), tratamiento polar Vero (TPV), control intracelular polar HTB 177 (CPH), tratamiento polar HTB 177 (TPH), control intracelular lipofílico Vero (CLV), extracto lipofílico del tratamiento de Vero (TLV), extracto lipofílico del control de HTB-177 (CLH),

extracto lipofílico del tratamiento de HTB-177 (TLH), control medio extracelular Vero (CMV), tratamiento medio extracelular Vero (TMV), control medio extracelular HTB 177 (CMH), tratamiento medio extracelular HTB 177 (TMH). Las barras con *, ** y *** indican $P < 0.05$, $P < 0.01$ y $P < 0.001$, respectivamente. (Los picos de los corchetes indican cuales muestras se están comparando)

5.4.4.4 Cuerpos cetónicos

Se identificaron cuatro cuerpos cetónicos en los extractos. En el extracto intracelular lipofílico de células Vero hubo un aumento significativo del metabolito del ácido 3-hidroxi-butírico. Este metabolito en las células HTB se encontró en menor concentración y disminuyó después del tratamiento. Por otro lado, hubo un aumento del ácido 2-hidroxi-butírico en ambas líneas celulares, siendo significativo en las células de cáncer (figura 18).

En el extracto extracelular se observó una disminución del metabolito ácido 3-hidroxi-butírico siendo significativa para ambas líneas celulares y el ácido 2-hidroxi-butírico siendo significativa en las células HTB 177 (figura 18). Estos dos metabolitos se encontraron en mayor concentración en las células HTB antes del tratamiento en comparación con la línea Vero, y disminuyeron después del tratamiento hasta llegar a una concentración similar a el control de células Vero.

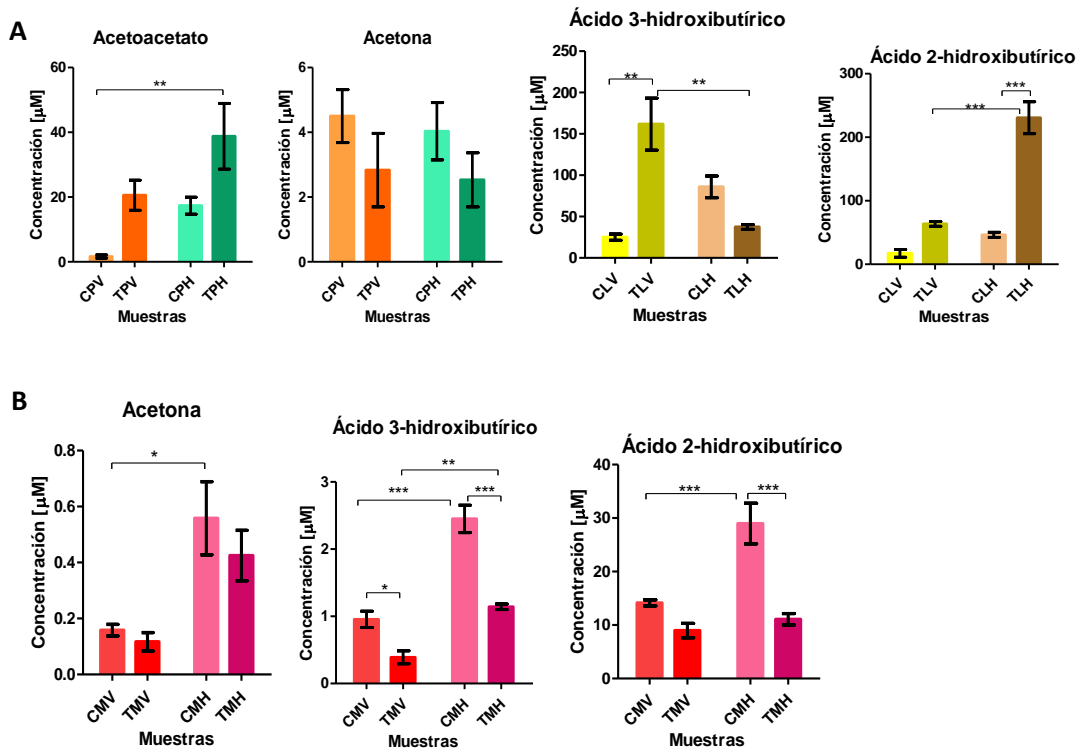


Figura 18. Concentración de cuerpos cetónicos en el extracto intracelular (A) y extracelular (B). Control intracelular polar Vero (CPV), tratamiento polar Vero (TPV), control intracelular polar HTB 177 (CPH), tratamiento polar HTB 177 (TPH), control intracelular lipofílico Vero (CLV), extracto lipofílico del tratamiento de Vero (TLV), extracto lipofílico del control de HTB-177 (CLH), extracto lipofílico del tratamiento de HTB-177 (TLH), control medio extracelular Vero (CMV), tratamiento medio extracelular Vero (TMV), control medio extracelular HTB 177 (CMH), tratamiento medio extracelular HTB 177 (TMH). Las barras con *, ** y *** indican $P < 0.05$, $P < 0.01$ y $P < 0.001$, respectivamente. (Los picos de los corchetes indican cuales muestras se están comparando)

5.4.4.5 Alcoholes

Se encontró un polialcohol en las muestras de extractos, el glicerol. En el extracto intracelular en la línea celular Vero este disminuye significativamente y se encontró en mayor concentración que en las células HTB. En el extracto extracelular se encontró una disminución significativa del glicerol en las células Vero, por el contrario, en las células HTB se observó un aumento significativo después del tratamiento. Este metabolito se encontraba en una mayor concentración en el extracto extracelular de las células HTB 177 (figura 19).

5.4.4.6 Aminas

Se identificaron 3 metabolitos con grupo funcional amina, la colina, fosfocolina y dimetilamina. En el extracto intracelular lipofílico de la línea celular HTB se encontró un aumento significativo de la colina después del tratamiento. La fosfocolina y dimetilamina intracelular disminuyeron significativamente en ambas líneas celulares, encontrándose la fosfocolina en mayor concentración en las células HTB.

En el medio extracelular la dimetilamina disminuyó significativamente después del tratamiento en las células HTB-177, encontrándose en mayor concentración en estas antes del tratamiento con el extracto (figura 19)

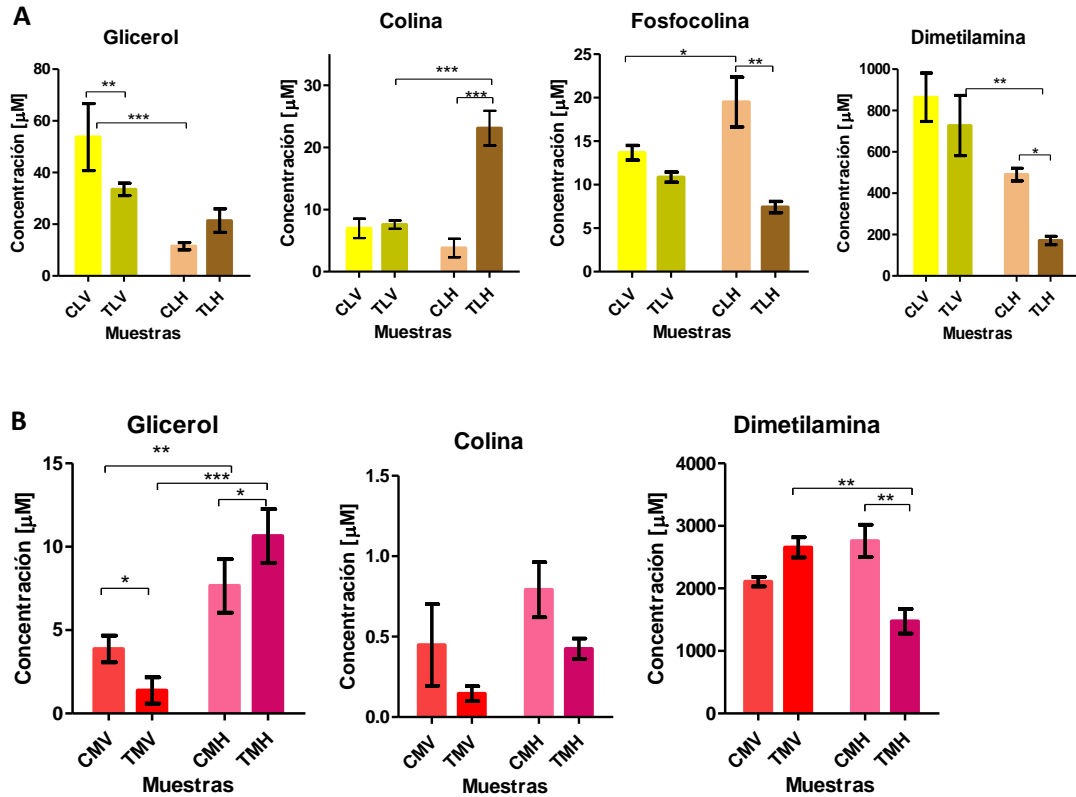


Figura 19. Concentración metabolitos alcoholes y aminas en el extracto intracelular (A) y extracelular (B). Control intracelular lipofílico Vero (CLV), extracto lipofílico del tratamiento de Vero (TLV), extracto lipofílico del control de HTB-177 (CLH), extracto lipofílico del tratamiento de HTB-177 (TLH), control medio extracelular Vero (CMV), tratamiento medio extracelular Vero (TMV), control medio extracelular HTB 177 (CMH), tratamiento medio extracelular HTB 177 (TMH). Las barras con *, ** y *** indican $P < 0.05$, $P < 0.01$ y $P < 0.001$, respectivamente. (Los picos de los corchetes indican cuales muestras se están comparando)

Para analizar de una manera más visual los cambios en el metabolismo se realizó un gráfico de *fold change*, este análisis describe cuánto cambia una cantidad entre una medición original y una posterior, en este caso el tratamiento.

La comparación de los metabolitos entre células tratadas y controles se obtuvo considerando significativa la relación FC (fold change) con un valor de $p < 0.05$ (Figura 20 y 21). Los fold change se calcularon utilizando la fórmula \log_2 para la relación de los valores de concentración de los metabolitos de los extractos. $FC > 0$ indica aumento del contenido del metabolito, mientras que < 0 indica que disminuye.

Observamos que en el extracto intracelular de Vero después del tratamiento aumentó significativamente la concentración de los metabolitos ácido 3-hidroxi-butírico, tirosina, y acetoacetato. Metabolitos como malonato, leucina, lisina, alanina, creatina, betaína disminuyeron significativamente (figura 20 A).

Por otra parte, en las células HTB 177 los metabolitos que mostraron un aumento significativo después del tratamiento fueron la colina, ácido 2-hidroxi-butírico, malonato y prolina. Los metabolitos que disminuyeron significativamente fueron fosfocolina, dimetilamina, leucina, succinato, lactato, fenilalanina, tirosina, glucosa y ácido cítrico comparados con el control (figura 20 B).

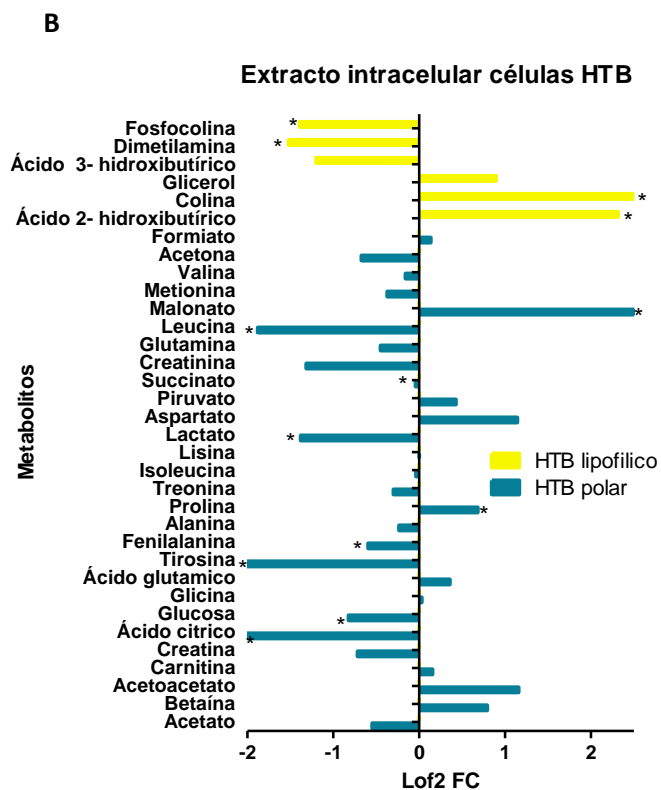
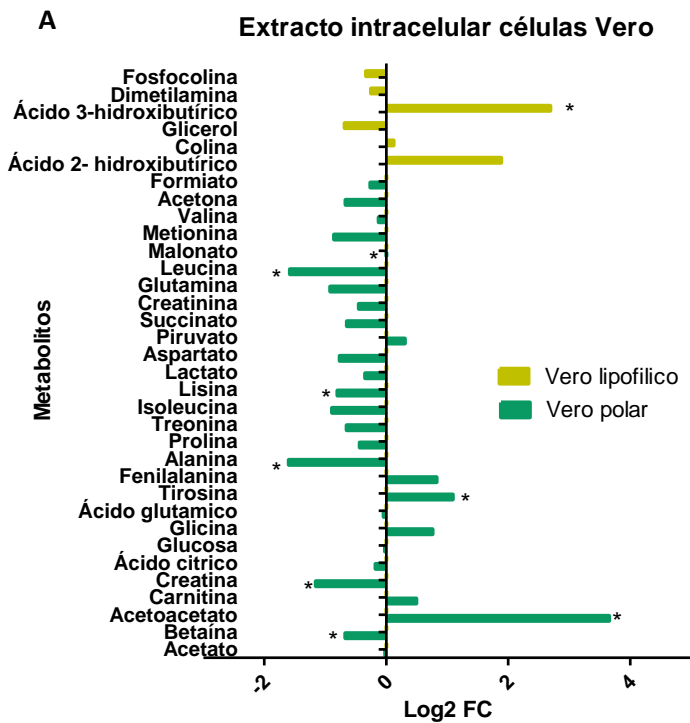
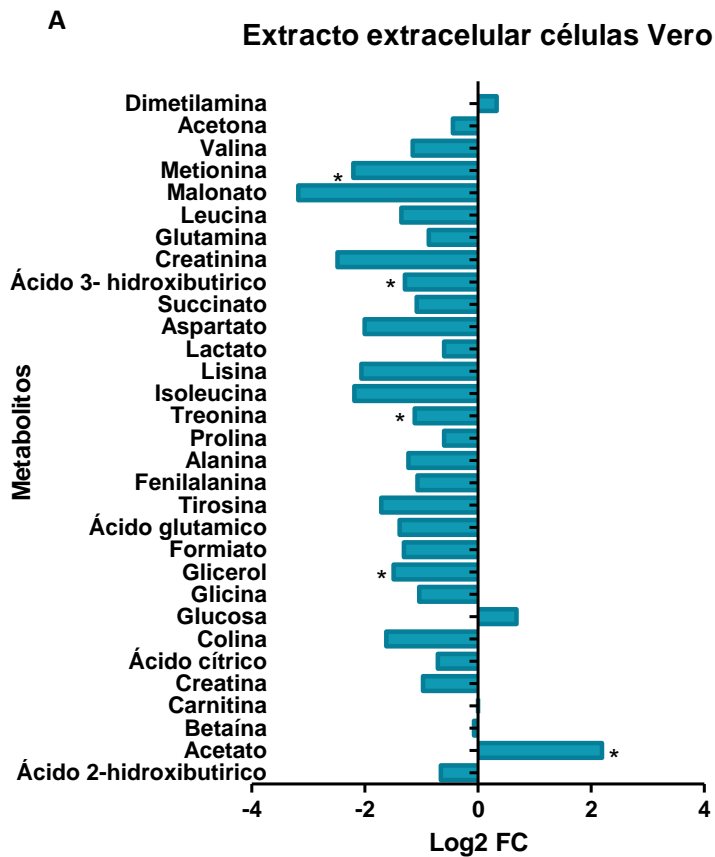


Figura 20. Comparación de metabolitos diferenciales entre muestras tratadas y los controles de los extractos intracelulares polar y lipofílico de células Vero (A) y HTB-177 (B). El asterisco (*) indica los metabolitos que tienen Log₂(FC) con valor p < 0,05.

En el medio extracelular de células Vero observamos un aumento significativo del acetato. Los metabolitos que disminuyeron significativamente fueron la metionina, ácido 3-hidroxi-butírico, treonina y glicerol (figura 21 A). Por otro lado, en la línea celular HTB 177 se observó un aumento significativo de leucina, prolina, glicerol y glucosa. La dimetilamina, malonato, glutamina, ácido 3-hidroxi-butírico, aspartato, lactato, treonina, alanina, formiato, ácido cítrico, creatina, carnitina, acetato y ácido 2-hidroxi-butírico disminuyeron significativamente (figura 21 B).



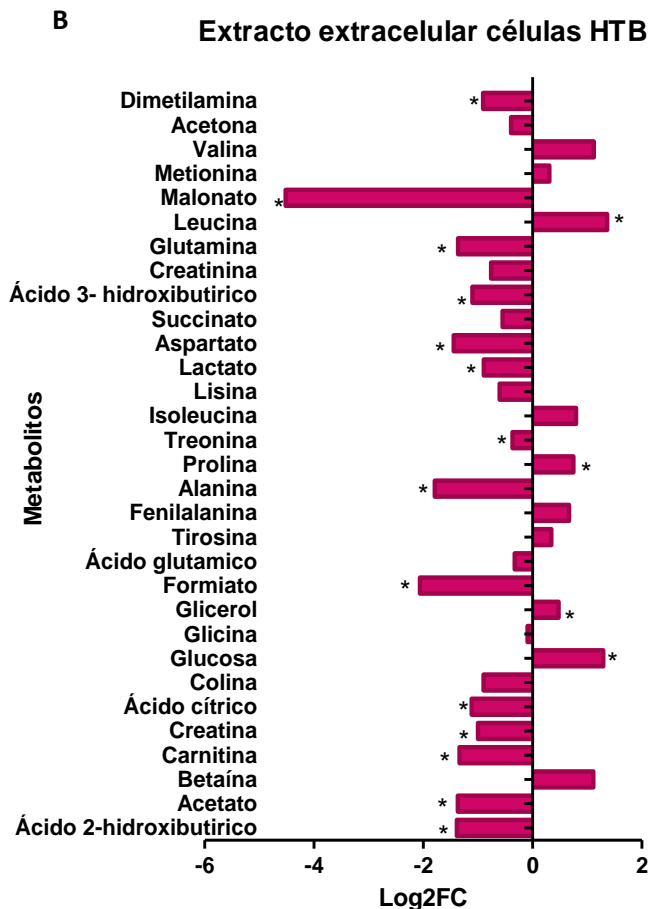


Figura 21. Comparación de metabolitos diferenciales entre muestras tratadas y los controles de los extractos extracelular de células Vero (A) y HTB-177 (B). El asterisco (*) indica los metabolitos que tienen Log2(FC) con valor $p < 0,05$.

5.4.7 Análisis multivariado (MVDA) dirigido

A partir de los datos obtenidos de la identificación y cuantificación de los metabolitos se llevó a cabo un análisis utilizando los datos de concentración de cada metabolito identificado en los extractos de las células Vero y HTB-177 (tratadas y no tratadas). En este análisis utilizamos los métodos PCA y oPLS-DA del análisis multivariado.

En la figura 22 se muestran los PCA con los datos de concentración de los metabolitos identificados de los extractos intracelulares polar y lipofílico de las células Vero y HTB-177, así como del medio de cultivo (extracto extracelular). En los tres extractos se observa una clara separación entre los grupos control y tratamiento, evidenciando que el tratamiento realmente tiene un efecto sobre el metabolismo de las células. La separación entre los controles de células vero y la línea cancerígena también es muy evidente confirmando el metabolismo distinto de la célula tumoral. Comparando cada línea celular tratada con su respectivo control, observamos que, la separación entre la línea celular vero sin tratar y tratada es mucho menos grande en los extractos polar y lipofílico que la separación entre las células HTB-177 tratadas y sin tratar. Esto nos indica un menor efecto del extracto en las células normales en comparación con el efecto más marcado observado en las cancerígenas. Por otro lado, en el medio extracelular se observa un acercamiento de grupo control de células vero con las células HTB 177 tratadas.

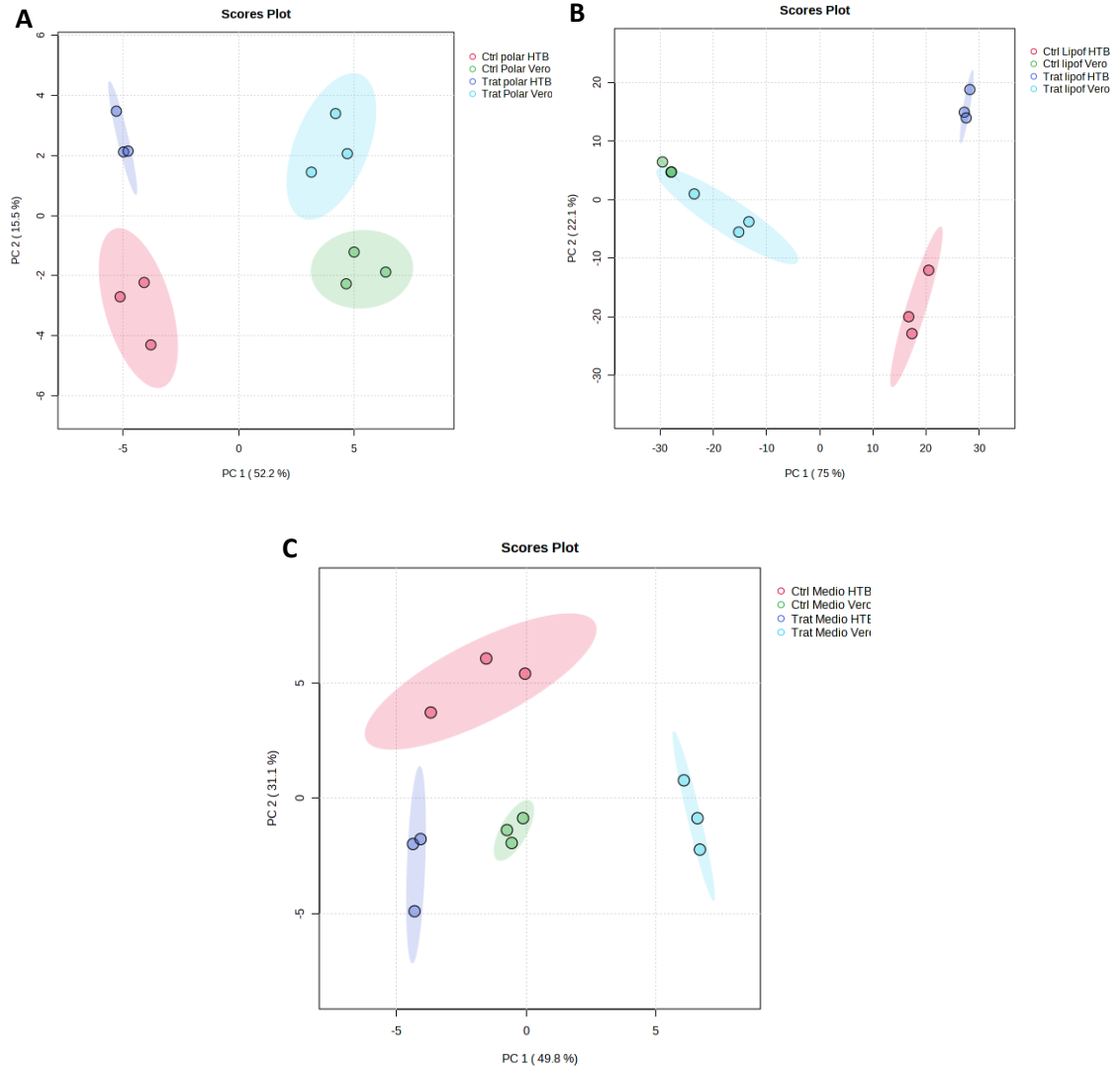
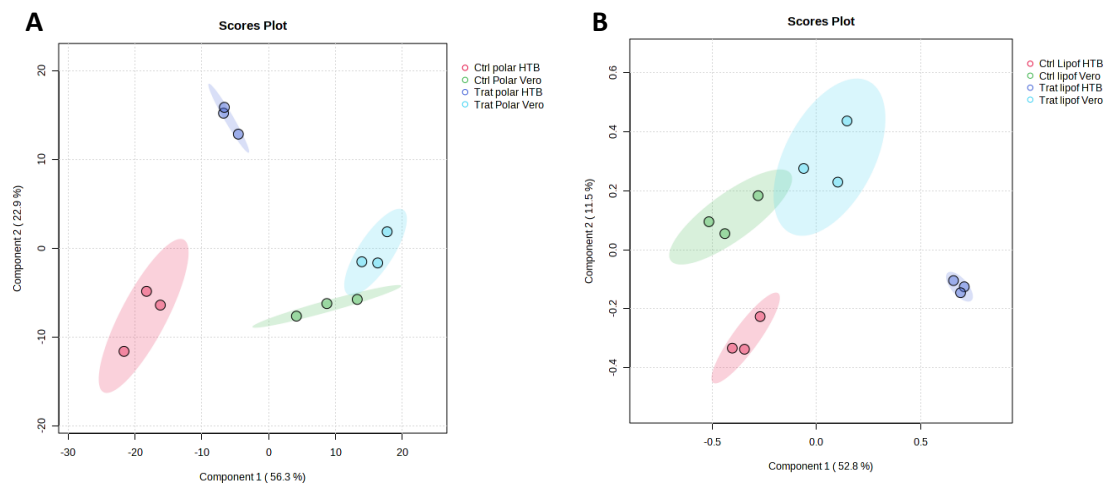


Figura 22. Análisis dirigido de PCA del extracto polar de células Vero y HTB 177 (A), análisis del extracto lipofílico (B) y extracto extracelular (C). Donde los círculos verdes son el control de células Vero, celestes el tratamiento, los rosas son el control de HTB 177 y los morados el tratamiento.

Para el análisis dirigido también se utilizó el sPLS-DA comparando la predictibilidad Q2. La capacidad predictiva más alta (valor Q2 de 0.8409) se encontró para el modelo de extracto polar, seguido por el modelo del extracto extracelular (Q2 = 0.8335), mientras que el extracto lipofílico tuvo la capacidad predictiva más baja (Q2 = 0.7921). Los tres extractos mostraron una muy buena capacidad predictiva.

De igual manera presentaron una dispersión evidente entre las muestras tratadas (con respecto a los controles), con el mayor valor de R2 para el sPLS-DA obtenido del extracto polar (R2 = 0.9572), seguido por el extracto lipofílico (R2 = 0.91981) y por último el extracelular (R2 = 0.9057). En el sPLS-DA se observa mejor el comportamiento ya visto en el PCA. Al igual que en análisis no dirigido, ambos grupos de las células Vero están más cerca entre sí que los grupos de las HTB y hay un mayor efecto del extracto en el metaboloma de las células HTB 177.



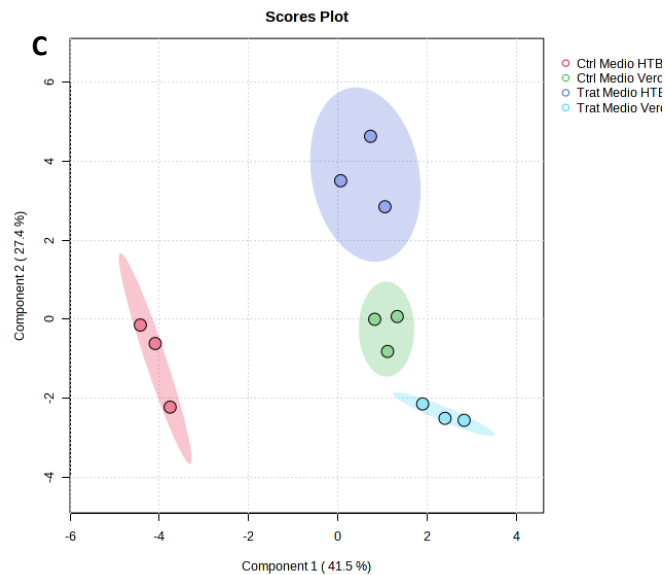


Figura 23. Análisis dirigido sPLS-DA del extracto polar de células Vero y HTB 177 (A), análisis del extracto lipofílico de células Vero y HTB-177 (B), análisis extracelular de células Vero y HTB 177 (C). Donde los círculos rosas son las réplicas de los controles y los verdes las réplicas de los tratamientos.

5.4.5 Metabolitos diferenciales

Los metabolitos diferenciales son aquellos que muestran diferentes concentraciones entre los grupos control y tratados, por lo que son los metabolitos que se vieron más afectados. Estos son de importancia ya que nos indicarían las vías metabólicas en las que actuó el extracto. Para identificar estos metabolitos se utilizaron las puntuaciones de importancia variable en la proyección (VIP). Los metabolitos con puntajes VIP más altos son los más

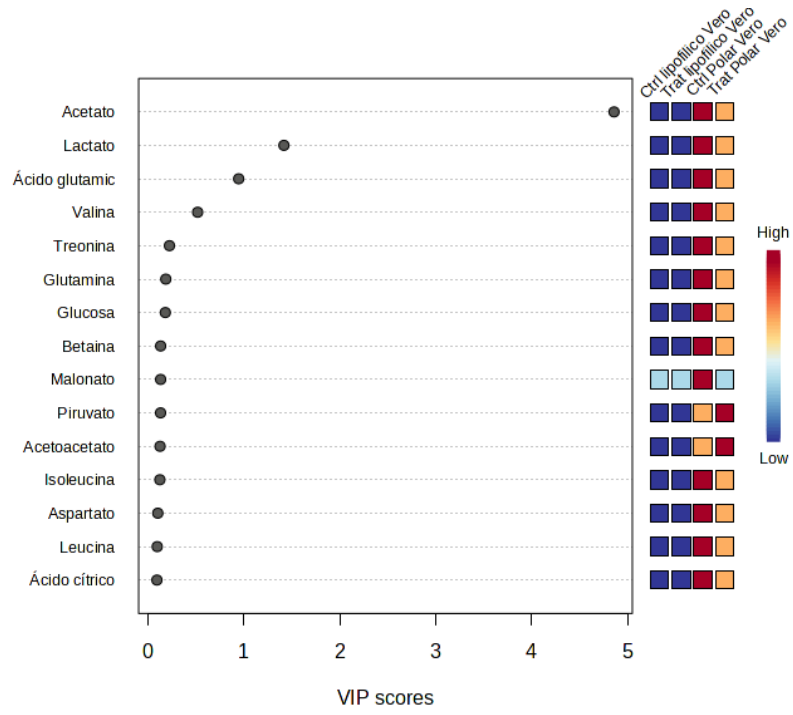
importantes para contribuir a la separación entre los dos grupos. Los puntajes VIP más bajos tienen menos influencia en el modelo.

En la proyección VIP de metabolitos del extracto intracelular de células Vero (figura 24 A) se observó que los principales metabolitos diferenciales son el acetato con un valor mayor a 4, el lactato y ácido glutámico, que también representan una influencia con valores VIP cercanos a 2.

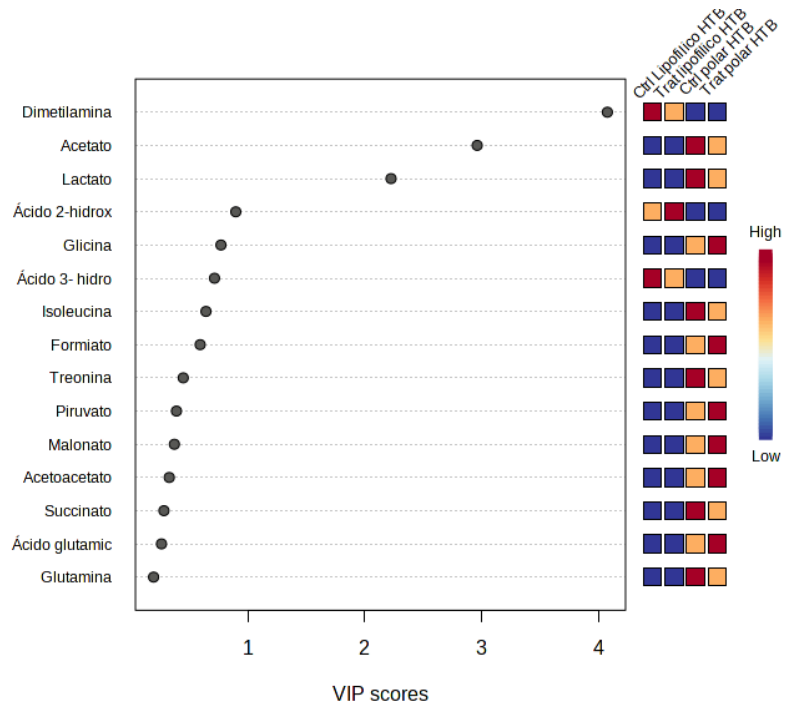
En el extracto intracelular de la línea celular HTB (figura 24 B) se observó que la dimetilamina tuvo un valor alto cercano a 4, lo que nos indica que tiene una influencia alta en el modelo. El lactato y el acetato se encuentran cercanos a 3 que también es un valor alto en influencia.

En el extracto extracelular de células Vero (figura 24 C) se observa que, al igual que el extracto intracelular polar, el acetato es de los principales en la proyección, teniendo un valor VIP arriba de 4. La dimetilamina en este extracto alcanzó un valor de 3. Por otro lado, en las células HTB (figura 24 D) la dimetilamina alcanzó un valor VIP de 5 superando a las células Vero. El lactato es el segundo metabolito que tiene influencia en el modelo, teniendo un arriba de 1, seguido del ácido acético.

A



B



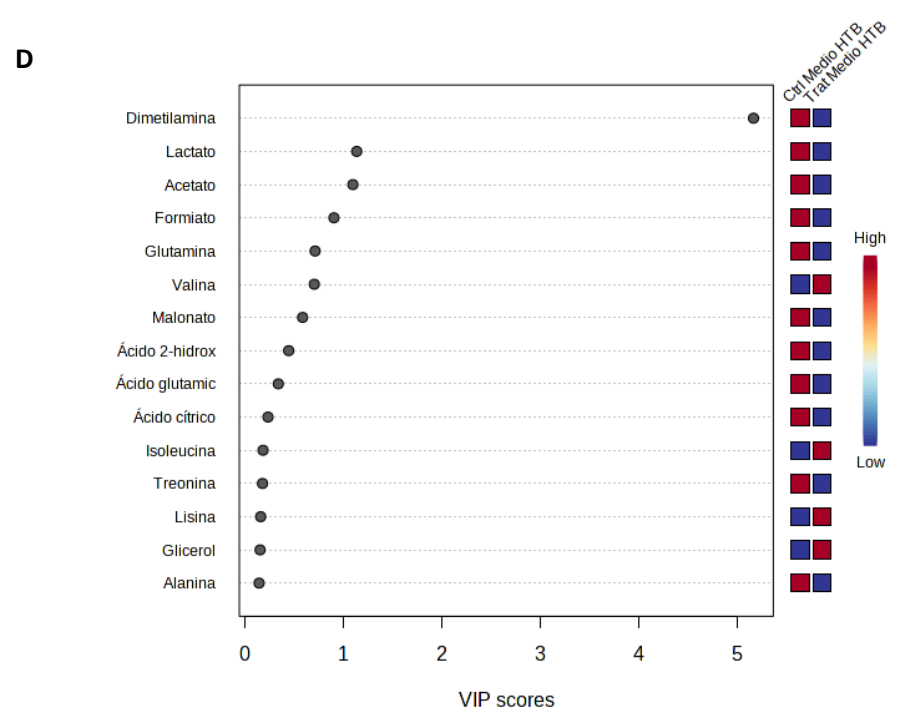
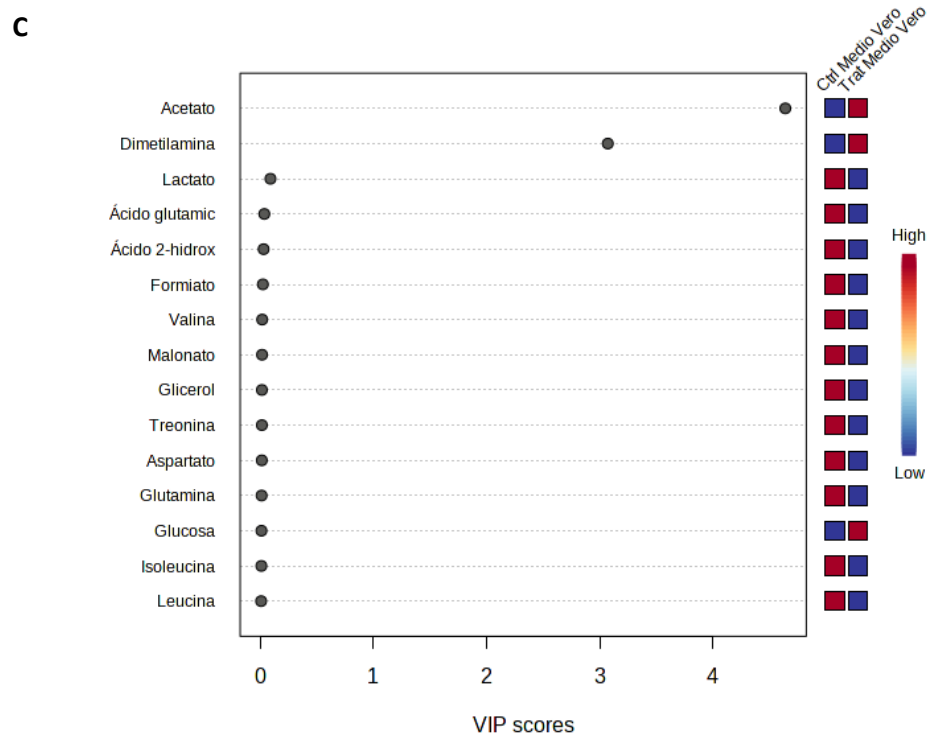


Figura 24. Importancia variable en la proyección (VIP). Metabolitos variables en los extractos intracelulares y extracelulares de células control y tratadas de Vero (A y C) y HTB-177 (B y D). Los recuadros coloreados a la derecha indican las concentraciones relativas del metabolito correspondiente en cada grupo en estudio.

5.4.6 Heatmap

El *heatmap* es una herramienta que ayuda a visualizar fácilmente los patrones cambiantes en las concentraciones de metabolitos de las muestras control y tratamiento de cada extracto estudiado.

Para ver esta variación en la concentración de cada metabolito, se realizó una codificación por colores, desde el azul a rojo oscuro que representa un aumento en la concentración relativa obtenida. Cada columna representa una muestra y cada fila representa un metabolito.

En la figura 25 se observa que los metabolitos que se encontraron en la fracción lipofílica del extracto intracelular (alcohol, aminas, 2 cuerpos cetónicos y un ácido orgánico) están en mayor concentración en las células Vero y disminuyen después del tratamiento (a excepción de los cuerpos cetónicos). Por el contrario, en las células HTB 177 tienen poca concentración de los compuestos antes mencionados, mostraron un aumento en la concentración el ácido 2-hidroxibutírico y la colina, además de disminuir la fosfocolina después del tratamiento.

Por otro lado, en la fracción polar intracelular, observamos una alta concentración algunos aminoácidos en las células Vero en comparación con las células HTB 177. Se observa que los metabolitos más concentrados en la fracción polar de las células de cáncer son de las vías más importantes la glucosa y lactato (glucolisis), succinato y aminoácidos como isoleucina, leucina,

fenilalanina, tirosina (importantes en el ciclo de Krebs). Estos metabolitos disminuyen después del tratamiento y otros metabolitos importantes de estas vías aumentan, como lo son, el ácido cítrico y el piruvato (figura 25).

En la figura 26 se observa una clara diferencia entre la línea celular Vero y HTB 177. En la línea celular de cáncer la mayoría de los metabolitos extracelulares esta aumentada antes del tratamiento con el extracto. Los metabolitos que la célula cancerígena excreta al medio como lo son el lactato, el acetato, formiato y succinato disminuyeron después del tratamiento. Se muestra claramente un aumento de metabolitos como la glucosa, isoleucina, leucina, fenilalanina, tirosina, prolina, valina, que como se mencionó anteriormente son importantes en la glucolisis y ciclo de Krebs.

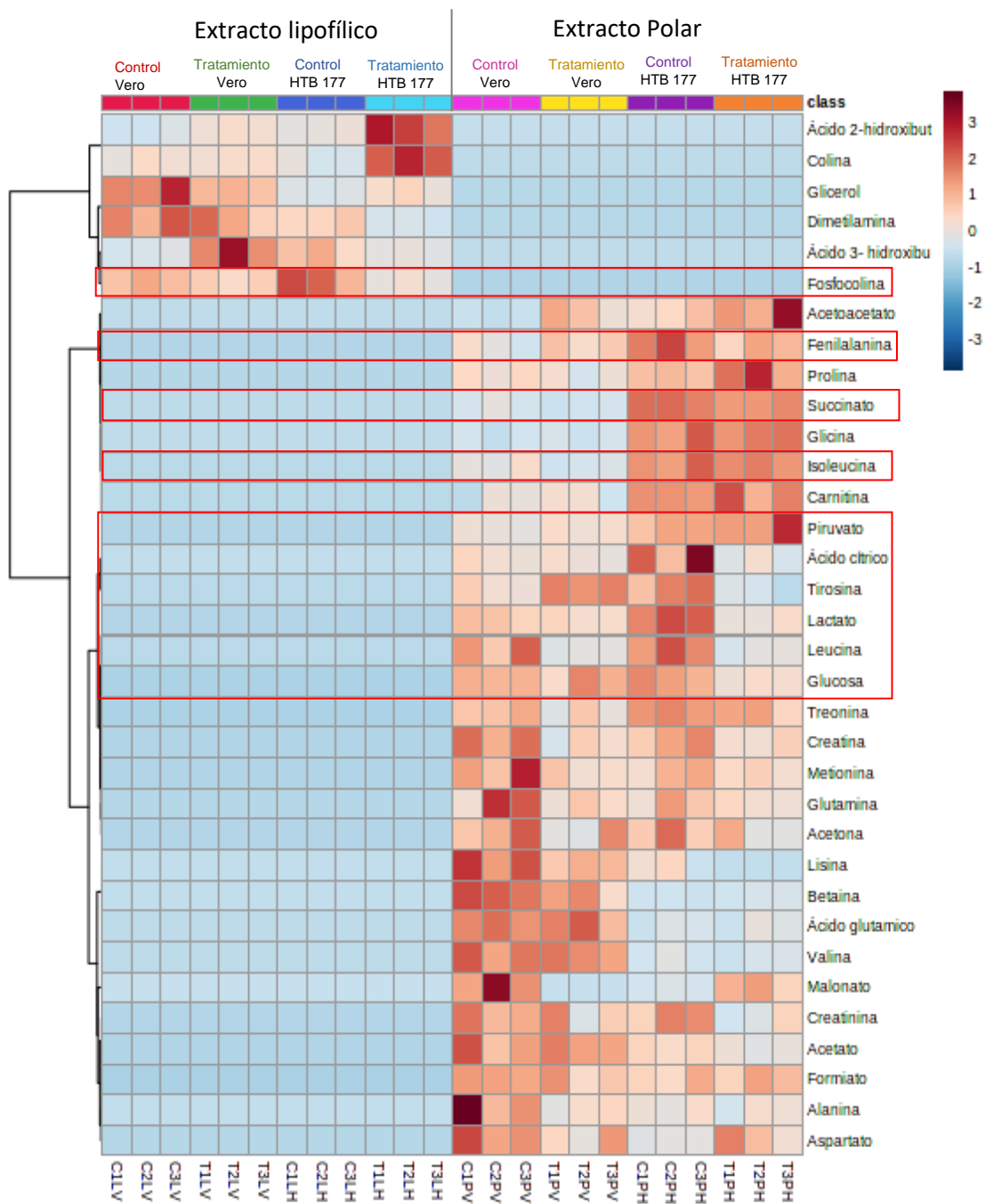


Figura 25. Heatmap donde se visualizan los perfiles metabólicos intracelulares polares y lipofílicos de células Vero y HTB-177.

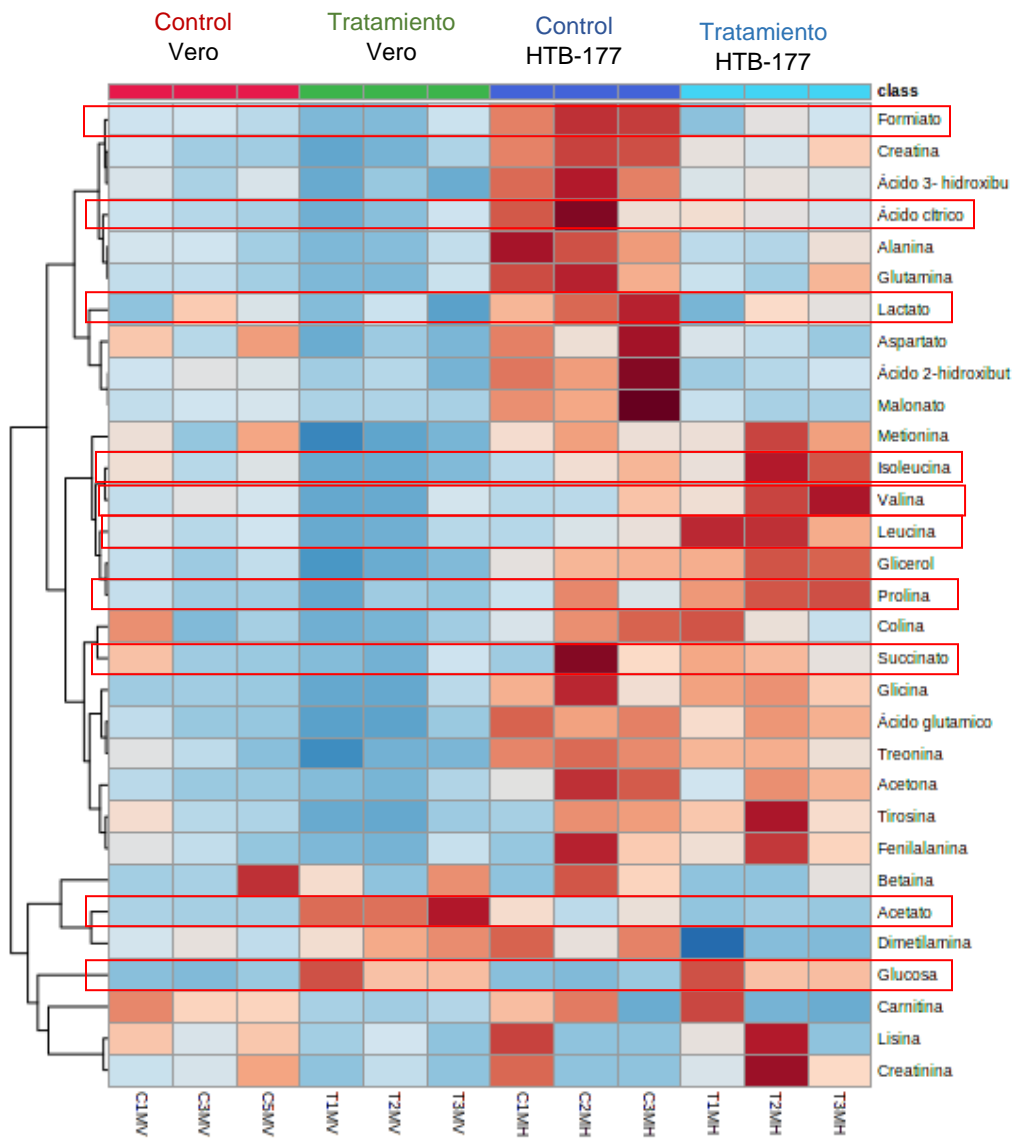


Figura 26. Heatmap donde se visualizan los perfiles metabólicos extracelulares de células Vero y HTB-177.

CAPITULO 6.

DISCUSIÓN

6.1 Evaluación de la capacidad citotóxica y anticancerígena *in vitro*

Menon y colaboradores, estudiaron la actividad del extracto metanólico de *C. hadiensis* en células HeLa, observaron que el extracto vegetal presentó actividad anticancerígena *in vitro* y obtuvieron una IC₅₀ de 141.3 µg/mL a las 48 horas de exposición⁶⁷. En este trabajo obtuvimos una concentración Inhibitoria 50 de 192.85 µg/mL específica para las células HTB-177 a las 48h de exposición.

La actividad del extracto metanólico de *C.hadiensis* puede deberse a la alta cantidad de compuestos fenólicos que posee la planta. Se sabe que este tipo de compuestos poseen actividad anticancerígena⁷³. Según un estudio fitoquímico realizado por Ji, H y colaboradores, esta planta posee metabolitos secundarios de tipo terpenos, flavonoides y ácidos fenólicos. En el extracto metanólico se han logrado identificar algunos metabolitos secundarios como son luteolina 7-O-glucurónido y ácido rosmarínico ¹. A estos compuestos, en especial al ácido rosmarínico, se les han atribuido actividades biológicas tales

como la actividad anticancerígena. Este compuesto aislado se ha probado en líneas celulares tumorales como lo son la línea celular de cáncer de hígado humano, HepG2, la línea celular de cáncer de ovario humano A2780, y las células de cáncer de próstata (PCa, PC-3 y DU145)⁷³.

Para determinar qué tan toxico es el extracto para las células sanas, se hizo un ensayo de citotoxicidad en células no cancerígenas.

La citotoxicidad del extracto sobre las células Vero fue menor que para las células de cáncer, con un valor de significancia de $p=0.0472$, por lo que el extracto mostró ser más activo contra células cancerosas. Para medir que tan selectivo es el extracto, se determinó el índice de selectividad.

El índice de selectividad (IS) es una relación que mide la ventana entre la citotoxicidad y actividad anticancerígena de un compuesto determinado. La evaluación del valor IS para cualquier investigación sobre fármacos a base de extractos vegetales y/o compuestos aislados es importante para determinar si se puede continuar con las investigaciones adicionales. Cuanto mayor sea la relación IS, teóricamente más efectiva es su actividad hacia las células cancerosas⁷⁴.

El índice de selectividad del extracto hacia las células cancerosas HTB-177, fue de 3.20. Según Prayong y colaboradores, un índice de selectividad mayor a 3 indica una alta selectividad⁷⁴, por lo que esto indica una alta afinidad del extracto hacia las células cancerígenas HTB-177.

Por otro lado, el fármaco de referencia vincristina, que es un anticancerígeno utilizado en terapia, se empleó para determinar tanto la citotoxicidad como la actividad anticancerígena *in vitro* y comparar dichas actividades con el extracto vegetal. La vincristina mostró de igual manera ser más citotóxico hacia las células cancerosas HTB-177 y en menor medida a las células Vero, con un valor de significancia de $p=0.0003$. El extracto mostro una tendencia similar a la vincristina en cuanto a actividad anticancerígena y citotoxicidad, disminuyendo la viabilidad celular conforme se aumenta la concentración, teniendo un efecto menos tóxico a concentraciones menores a comparación de la vincristina.

El extracto al presentar una actividad con tendencia similar a la vincristina y además mostrar menor citotoxicidad que está en las células no cancerígenas, nos indica que, *C. hadiensis*, podría ser una planta con potencial para el estudio y obtención de nuevas quimioterapias basadas en fitoquímicos.

6.2 Análisis del metaboloma por ^1H RMN

El estudio de los efectos de las plantas para la prevención y cura de diferentes enfermedades es un área de creciente interés para la comunidad científica. El cáncer y su metabolismo ha aumentado el interés de investigadores que buscan nuevos tratamientos para esta enfermedad. Se han demostrado cambios en el metabolismo celular de cáncer por metabolitos secundarios de plantas como es el caso de Liu y colaboradores, que utilizaron la berberina extraída de la planta *Hydrastis canadensis* para tratar líneas celulares de cáncer de mama, colon y

cervical, observando que la berberina disminuyó el consumo de glucosa, e inhibió enzimas lipogénicas^{75,48}. Han y colaboradores utilizaron el ácido rosmarínico extraído de la planta *Rosmarinus Officinalis*, en líneas celulares de cáncer de colon, observaron que el ácido rosmarínico disminuyó el consumo de glucosa y la producción de lactato en el metabolismo celular⁴⁵. Este metabolito se encuentra presente en el extracto de *C. hadiensis* y se obtuvieron resultados similares como se describirá a continuación.

Los espectros obtenidos por ¹H RMN muestran cambios visibles en el metaboloma de ambas líneas celulares tratadas y no tratadas. Observamos un cambio más marcado en las células de cáncer HTB-177 tras el tratamiento con el extracto metanólico de *C. hadiensis*. Algunos de los cambios más notables se observaron en las regiones de carbohidratos y alifáticos, correspondientes a metabolitos de la glucólisis, ciclo de Krebs y aminoácidos. Estos efectos nos indican que sí existe una reprogramación o modificación en el metaboloma de la célula.

Tanto el análisis de metabolómica no dirigido PCA y sPLS-DA como el dirigido realizado en conjunto con los datos de los espectros de RMN mostró una separación de los grupos, evidenciando los efectos del extracto, siendo un poco más marcado en las células HTB-177. En contraste con el patrón de agrupamiento un poco más estrecho que se muestra en los extractos de las células Vero, el patrón de agrupamiento de los extractos de células HTB-177 está algo disperso. Este hallazgo es consistente con los resultados obtenidos en otros estudios metabolómicos en células de cáncer donde se informan datos

sobre la comparación de los componentes extracelulares e intracelulares en líneas celulares en respuesta a tratamientos^{76,77}.

Para entender qué metabolitos se vieron afectados y por ende influyeron en la separación del modelo se realizó el análisis de Vip scores. Los metabolitos que contribuyeron en mayor medida en la separación de estos grupos se incluyen el acetato, lactato, ácido glutámico y la dimetilamina. Así, se puede sugerir que el tratamiento con el extracto metanólico produce cambios metabólicos que resultan en la disminución de la producción, captación y excreción de algunos metabolitos. Para probar la hipótesis, además, se realizó un *heatmap* en donde se observaron cambios en la concentración de los metabolitos implicados en vías metabólicas de glucólisis, y ciclo de Krebs. Lo anterior indicaría una modulación del metabolismo de las células cancerígenas hacia la similitud con las células Vero⁷⁷.

6.2.1 Metabolitos y rutas metabólicas

6.2.1.1 Reducción del efecto Warburg

Se conoce que el lactato está aumentado en tumores, como consecuencia del efecto Warburg²⁵. Este efecto se define como un aumento en la tasa de absorción de glucosa y producción preferencial de lactato, incluso en presencia de oxígeno, dejando de lado la producción de energía por el metabolismo del piruvato en la mitocondria. En este estudio observamos una disminución significativa en la producción intracelular y extracelular de lactato en ambas líneas celulares. Lo anterior se reflejó en un aumento considerable en la

producción de piruvato. Además, observamos una disminución significativa de la concentración intracelular de glucosa en las células HTB-177 y un aumento extracelular de este metabolito en ambas células. Esto sugiere que el extracto tuvo un efecto regulador de la actividad glucolítica. Como se sabe, las células cancerígenas consumen más glucosa que una célula normal⁷⁸, nuestros resultados sugieren que el extracto logró inhibir en alguna parte del proceso la absorción de glucosa y el uso de la misma por medio de la glucólisis. Esto aumentó la concentración de glucosa en el exterior y afectó la producción de lactato. Por lo que, ambos metabolitos disminuyeron en el interior de la célula, observándose así la inhibición del efecto Warburg. En trabajos previos se ha reportado que el ácido rosmarínico, que como se mencionó es uno de los metabolitos secundarios presentes en la planta, tiene este efecto anti-Warburg⁴⁵, nuestros resultados podrían deberse a la posible presencia de este metabolito en el extracto.

6.2.1.2 Ciclo de Krebs

Otra de las vías que se ven afectadas y modificadas en el cáncer de pulmón, es ciclo de Krebs, el cual se ve regulado a la baja. En las células cancerígenas, esta ruta metabólica se ve afectada negativamente disminuyendo la producción de algunos metabolitos y energía, esto derivado del efecto Warburg. Las células cancerosas necesitan producir ácidos grasos para poder dividirse y reponer su membrana. Satisfacer la necesidad extra de lípidos a través de una mayor síntesis de citrato intracelular, probablemente requiera la reversión y el

truncamiento del ciclo de Krebs⁷⁹. Se puede deducir que, para producir un exceso de citrato, las células cancerosas se privan de un mecanismo eficaz de suministro de ATP como es el ciclo de Krebs para dirigirse a una glucólisis aeróbica (efecto Warburg)⁷⁹. Este efecto permite además que las células cancerosas consuman grandes cantidades de glucosa sin producir niveles nocivos de citrato⁸⁰. . En este estudio observamos una alta concentración de ácido cítrico en la línea celular HTB-177 y una disminución significativa después del tratamiento. Los niveles reducidos de citrato citosólico encontrados en nuestros resultados después del tratamiento sugieren una disponibilidad limitada de este metabolito para respaldar la síntesis de lípidos⁸¹ y por lo tanto la división celular acelerada. Lo anterior sugiere la regulación de la lipogénesis y del ciclo de Krebs y por tanto la disminución del efecto Warburg. Esto significaría un cambio hacia un metabolismo no cancerígeno o normal.

Otro de los metabolitos importantes en las células tumorales es el succinato. Este metabolito, que se encontraba en cantidades elevadas en las células tumorales, mostró una reducción significativa en las células HTB-177 tanto intracelular como extracelular después del tratamiento. Se ha considerado al succinato como oncometabolito y biomarcador del cáncer ya que el exceso de succinato en el citoplasma de las células cancerosas se secreta al medio extracelular donde promueve la migración de células cancerosas y la metástasis del cáncer⁸². Como el ciclo de Krebs se encuentra regulado a la baja, la mayor parte de la producción de succinato se da por parte de la glutaminólisis, debido a que proviene del α -cetoglutarato. La glutamina y el

glutamato no mostraron una diferencia significativa después del tratamiento, por lo que la explicación de porque disminuyó la concentración de succinato en nuestro estudio puede deberse al malonato.

El malonato intracelular y extracelular disminuyó en ambas células siendo significativo en las células HTB-177. El malonato es un inhibidor competitivo de la enzima succinato deshidrogenasa, lo que produce una acumulación de succinato al inhibir la transformación de este a fumarato⁸³. La disminución de la concentración del malonato explicaría en parte la disminución de succinato. Se ha visto que en el cáncer hay mutaciones que provocan una baja producción de la succinato deshidrogenasa⁸⁴, lo que explica también la acumulación de succinato en la célula.

6.2.1.3 Metabolismo de aminoácidos

Se encontró una disminución sustancial, después del tratamiento, en varios aminoácidos, treonina, isoleucina, lisina, leucina, fenilalanina y tirosina, en ambas líneas celulares en el extracto intracelular, siendo significativa la disminución de estas últimas tres. Se ha reportado que los niveles de estos aminoácidos están aumentados en el cáncer de pulmón, este comportamiento lo pudimos observar en las células HTB 177 antes del tratamiento. Se ha documentado que existe una regulación a la baja de los genes involucrados en el metabolismo de estos aminoácidos dentro de los tumores del cáncer de pulmón. Lo anterior sugiere una disminución en la capacidad de las células de cáncer de pulmón para metabolizar estos aminoácidos⁸⁵. Nuestros resultados

sugieren que las células cancerígenas después del tratamiento regresan o activan de nuevo el metabolismo de estos aminoácidos.

En el extracto extracelular (correspondiente al medio de cultivo) encontramos un aumento en la concentración de aminoácidos como la isoleucina, leucina, fenilalanina, tirosina, prolina, valina, que como se mencionó anteriormente son importantes en el ciclo de Krebs. Estos metabolitos los encontramos en el medio extracelular en mayor concentración después del tratamiento, lo que indicaría una menor incorporación de estas moléculas a las células cancerosas. LAT1 (transportador de aminoácidos tipo 1) es uno de los transportadores de aminoácidos más estudiados para el desarrollo de fármacos contra el cáncer. Muchos estudios han demostrado que LAT1 está sobre-expresado y desempeña un papel fundamental en ciertos tipos de cáncer⁸⁶, como lo es el cáncer de pulmón. La inhibición de la actividad de LAT1 conduce a una disminución intracelular de los aminoácidos. Lo anterior explicaría la disminución observada en el extracto intracelular y por ende el aumento de concentración en el extracto extracelular.

6.2.1.4 Metabolismo de lípidos

Se encontraron 4 metabolitos cetónicos en las células de cáncer de pulmón 2-hidroxiacetato, 3-hidroxiacetato, acetoacetato y acetona. Todos disminuyeron en concentración en las células HTB-177 en ambos extractos (intracelular y extracelular) después del tratamiento excepto el acetoacetato y el ácido 2-hidroxiacético intracelular. Se han reportado niveles elevados de todos los

cuerpos cetónicos en pacientes con cáncer de pulmón ya que son características comunes del metabolismo del cáncer⁸⁵, el aumento de estos cuerpos cetónicos se debe a la oxidación de ácidos grasos regulada positivamente⁸⁷, estos son liberados al medio ya que pueden ser utilizados como fuente de energía en ausencia de glucosa en la sangre, en particular el 3-hidroxibutirato⁸⁸. Por lo que la disminución de estos metabolitos en nuestro estudio sugiere que las células están reprogramándose a un metabolismo normal.

Encontramos que el acetato extracelular en las células HTB-177 disminuyó, mientras que en las células Vero aumentó después del tratamiento. Así mismo, observamos una disminución del acetato intracelular en la línea HTB-177 y ningún cambio en Vero. El acetato es un producto del acetil-CoA, en la célula cancerígena apoya a la producción de energía y síntesis de lípidos para el crecimiento celular. Se ha reportado que las células cancerígenas excretan acetato al medio para que este sea utilizado por células adyacentes que son pobres en nutrientes⁸⁹. Nuestro resultado sugiere que, el extracto de *C.hadiensis* pudo disminuir esa comunicación entre las células con el acetato y el suministro de energía para su crecimiento.

La betaína es un donante de grupos metilo proveniente de la colina. Participa en la biosíntesis de carnitina y, debido a esto, la betaína puede estar relacionada con la β -oxidación de ácidos grasos⁹⁰. En el extracto intracelular se encontró en mayor concentración en las células Vero y observamos una

disminución significativa después del tratamiento. En las células HTB-177 la concentración de betaína fue mucho menor que en las células Vero, y mostro un ligero aumento después de ser tratadas con el extracto. En el extracto extracelular se encontró una menor concentración del metabolito, sin cambios significativos. En estudios anteriores, se ha demostrado que la betaína se encuentra disminuida en cáncer de pulmón⁸⁵. Aunque aún no se sabe la razón de porque disminuye la betaína en las células cancerosas se cree que puede ser debido a que este es un agente donador de metilo que se encarga de reducir la homocisteína. Investigaciones previas han demostrado que al estar disminuida la betaína se acumula homocisteína la cual se ha relacionado con una mayor incidencia del cáncer⁹¹. Kar y colaboradores demostraron que la betaína adicionada exógenamente disminuyó la proliferación de células de cáncer de prostata⁹². Todo lo anterior indica que, las células cancerígenas prefieren una concentración baja de betaína ya que esta podría ayudar a disminuir la proliferación celular. El tratamiento con el extracto aumentó la betaína intracelular en las células HTB-177 esto es un efecto positivo que disminuiría la proliferación celular.

En cuanto a los metabolitos dimetilamina y fosfocolina, hubo una disminución en ambas líneas celulares después del tratamiento, siendo significativo en la línea de cáncer. Encontramos en las células HTB-177 mayor concentración de fosfocolina. La producción de fosfocolina ocurre a través de la fosforilación de colina por la enzima colina quinasa en el primer paso de la síntesis de fosfatidilcolina, el principal fosfolípido de la membrana celular. Se sabe que la

colina quinasa está elevada en tumores muy activos debido a la proliferación rápida⁸⁵, ya que utiliza grandes cantidades de colina para producir fosfocolina para la síntesis de los fosfolípidos de membrana en demanda a la proliferación celular. Nuestros resultados muestran que después del tratamiento con el extracto metanólico, disminuyó la concentración de fosfocolina y aumentó la colina. Lo anterior sugiere que el extracto regularizó o disminuyó esta vía de síntesis de fosfolípidos necesaria para las células cancerígenas. Además, se observó una disminución del glicerol en las células Vero y un ligero aumento en las células HTB-177 después del tratamiento. El glicerol forma parte de la síntesis de lípidos por lo que el extracto pudo alterar esta parte importante del metabolismo en las células de cáncer.

6.2.1.5 Otras rutas metabólicas

La creatina y creatinina provienen del metabolismo de la glicina, la concentración de estos dos metabolitos disminuyó en ambos extractos (intra y extracelular) en ambas líneas celulares. Se ha reportado que ambos metabolitos se encuentran aumentados en las células de cáncer de pulmón, tal y como lo observamos en nuestros resultados. El aumento de los niveles de creatina en los tejidos tumorales conduce a un aumento en la producción de ATP, que se asocia con el proceso altamente energético de crecimiento y proliferación tumoral⁹³. Nuestros resultados sugieren que el tratamiento con el

extracto puede alterar este proceso de obtención de energía afectando a la célula cancerígena y por tanto disminuyendo su proliferación.

El formiato, proveniente del metabolismo de la serina, se encontró en mayor concentración en el extracto extracelular de las células HTB-177, éstas, una vez tratadas con el extracto, disminuyeron significativamente la producción de formiato. La producción excesiva de formiato da como resultado la liberación de este al medio. Algunos estudios han encontrado que la tasa de producción de carbono supera la demanda de las células cancerosas. Esta evidencia sugiere que la producción y la demanda de unidades carbono en las células en proliferación pueden no estar reguladas lo que conlleva a un exceso de producción de formiato que se manifiesta como un desbordamiento de este hacia el exterior de las células. Aunque no ha sido comprobado, se cree que el catabolismo de un carbono de serina con producción excesiva de formiato puede contribuir a la generación de energía en las células cancerosas⁹⁴.

Por último, la glicina se mantuvo sin alteraciones en ambas células y sus extractos. Sin embargo, pudimos observar una diferencia en concentración entre ambas líneas celulares, en Vero se encontró en menor concentración en comparación con HTB-177 en donde la concentración estaba aumentada. Investigaciones recientes han demostrado que la captación y el catabolismo de la glicina pueden promover la tumorigenesis y la malignidad⁹⁵, sin embargo, el extracto no altero su producción.

Detectamos una diferencia en la respuesta generada al tratamiento con el extracto de *C. hadiensis* entre las dos líneas celulares empleadas. Nuestros datos demuestran que el extracto afecta mucho más a células cancerosas que a las células sanas.

En general, nuestros resultados sugieren que el extracto metanólico de *C. hadiensis* normaliza algunos puntos del perfil metabólico de las células de cáncer de pulmón HTB-177 mediante la modulación de procesos metabólicos clave. Se sabe que la alteración de las vías como la glucólisis, ciclo de Krebs y síntesis de lípidos, contribuyen al desarrollo y progresión del cáncer de pulmón³⁸. Como se muestra en la **figura 27**, el efecto del extracto se ejerce a través de una sinergia de efectos multiobjetivo. El extracto, actúa en varios puntos clave del metabolismo de las células, como el metabolismo de la glucosa al contrarrestar el efecto Warburg, el anabolismo de proteínas al disminuir el nivel de aminoácidos y la biosíntesis de membrana al reducir la fosfocolina. En conjunto, estos efectos proporcionan una base bioquímica para el efecto citostático de *C. hadiensis* en células de HTB-177.

Estos hallazgos identifican una base metabólica para la regulación del metabolismo mediada por el extracto metanólico de la planta *C. hadiensis* y en las células cancerosas y guían el camino para futuras investigaciones sobre los múltiples mecanismos por los cuales los extractos de esta planta ejercen tales efectos. Esto genera nuevos enfoques farmacéuticos para mejorar el tratamiento de los tumores.

Los metabolitos secundarios han evolucionado con fines de defensa contra diferentes categorías de agresores. Por este motivo, se cree que los metabolitos actúan en diversos objetivos en los sistemas biológicos. La acción sinérgica de muchos fitoquímicos puede proporcionar herramientas eficaces en el manejo de enfermedades, incluido el cáncer.

En el caso de *C. hadiensis*, la sinergia de varios metabolitos secundarios, como terpenos, flavonoides y compuestos fenólicos, explicaría la regulación del metabolismo tumoral y la actividad citostática observada. *C. hadiensis* por tanto una planta con potencial para nuevos enfoques en farmacología. Puede ofrecer oportunidades para desarrollar nuevas terapias efectivas para el cáncer de pulmón mediante la integración de protocolos de medicamentos establecidos con formulaciones derivadas de plantas.

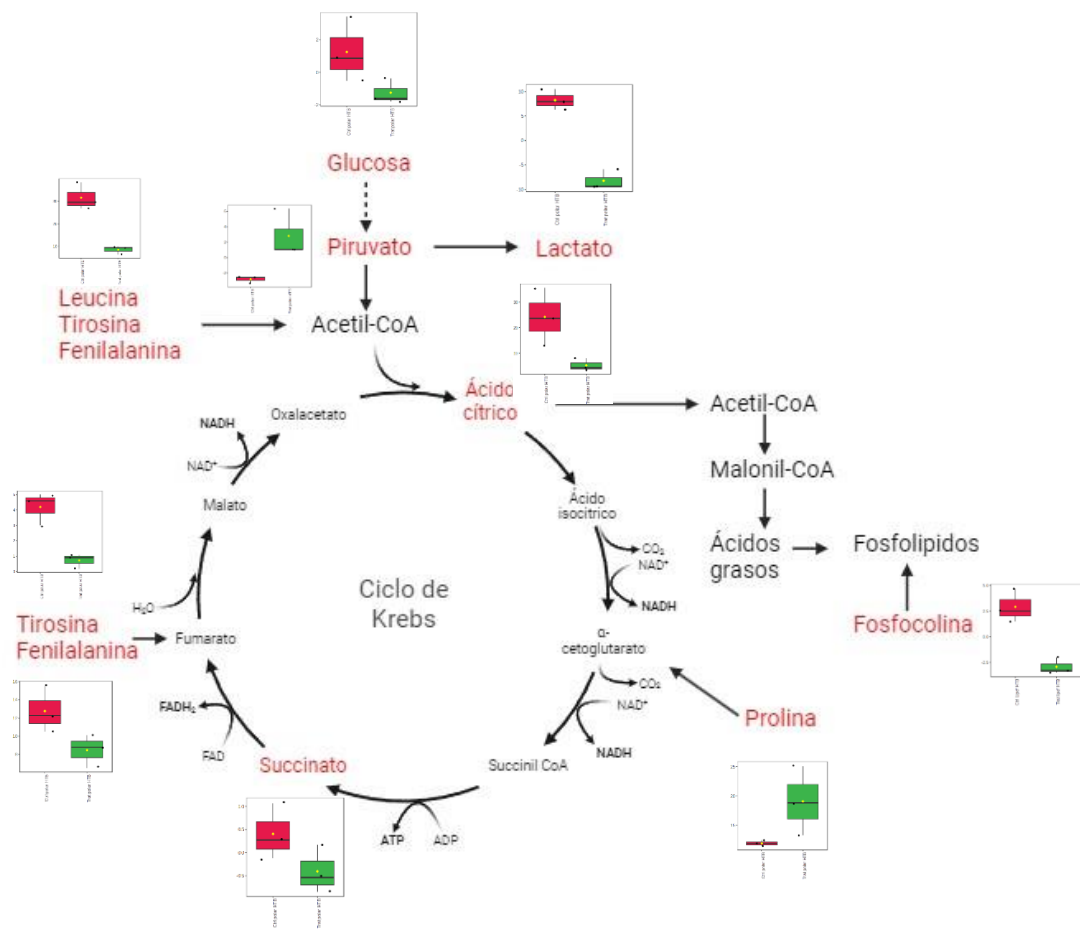


Figura 27. Mapa metabólico de principales vías afectadas en células HTB-177. Barra roja control y tratamiento barra verde. Fosfocolina metabolito encontrado en el extracto intracelular no polar. Glucosa, piruvato, lactato, ácido cítrico, succinato, prolina, tirosina, fenilalanina y leucina corresponden a metabolitos del extracto intracelular polar.

CAPITULO 7.

CONCLUSIONES

- El extracto metanólico de *C. hadiensis* mostró moderada actividad anticancerígena *in vitro* sobre las células HTB-177 de cáncer de pulmón de manera dependiente de dosis, presentando un IC₅₀ de 192.85 µg/ml.
- El extracto metanólico de *C. hadiensis* mostró baja citotoxicidad en células Vero, necesitándose más de 500 µg/ml para obtener la IC₅₀.
- El extracto metanólico de *C. hadiensis* es más selectivo hacia las células de cáncer que hacia las células Vero presentando un índice de selectividad de 3.20.
- El extracto presentó un comportamiento similar a la vincristina conforme se aumenta la concentración, tanto en la actividad anticancerígena *in vitro* como citotóxica disminuyen de manera dependiente de dosis.
- En el análisis metabólico se identificaron un total de 34 metabolitos primarios, observando variaciones de la concentración en los diferentes extractos.
- El cambio principal en el metabolismo se observó en función de los metabolitos intracelulares y extracelulares de las células HTB-177

mientras que en las células Vero parecen ser menos evidentes, como lo indican las visualizaciones de PCA y del *heatmap*.

- El análisis metabolómico reveló que el tratamiento con el extracto metanólico de *C. hadiensis* interfirió en el metabolismo energético, la síntesis de fosfolípidos de membrana y el metabolismo de los aminoácidos.
- El metabolismo energético en las células se vio afectado debido a la inhibición del efecto Warburg y la regulación del ciclo de Krebs. La síntesis de fosfolípidos se vio afectada debido a la disminución de la producción de fosfocolina y el metabolismo de aminoácidos se activó o se reguló de nuevo después del tratamiento.
- La hipótesis se acepta ya que el extracto mostró una actividad anticancerígena *in vitro* y afectó el metabolismo de las células de cáncer de pulmón HTB 177.

CAPITULO 8.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ji, H. S. *et al.* Low-density lipoprotein-antioxidant flavonoids and a phenolic ester from *Plectranthus hadiensis* var. *tomentosus*. *Appl. Biol. Chem.* **62**, 1–12 (2019).
2. International Agency for Research on Cancer & World Health Organization. Cancer: world. *Globocan 2020* **419**, 1–2 (2020).
3. The global cancer Observatory, W. H. O. Cancer: Mexico. *Globocan* **929**, 29–30 (2020).
4. Más Toro, D. *et al.* Preliminary analysis of secondary metabolites in mixed powders of leaves of medicinal plants. *Rev. Cuba. Plantas Med.* **22**, 1–9 (2017).
5. Schlaepfer L, M. J. Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Rev. Mex. Ciencias Farm.* **41**, 18–27 (2010).
6. Jain C, Khatana S, Vijayvergia R. Bioactivity of secondary metabolites of various plants: A review. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **10**, 494–504 (2019).
7. Lukhoba, C. W., Simmonds, M. S. J. & Paton, A. J. *Plectranthus*: A review of ethnobotanical uses. *J. Ethnopharmacol.* **103**, 1–24 (2006).

8. Orabi, K. Y., Abaza, M. S., Luqmani, Y. A. & Al-Attiyah, R. Psiadin and plectranthone selectively inhibit colorectal carcinoma cells proliferation via modulating cyclins signaling and apoptotic pathways. *PLoS One* **16**, (2021).
9. Maczka, W., Winska, K. & Grabarczyk, M. One Hundred Faces of Geraniol. *Molecules* **25**, (2020).
10. Jin, M. *et al.* Ayanin, a natural flavonoid inhibitor of Caseinolytic protease, is a promising therapeutic agent to combat methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Biochem. Pharmacol.* **217**, 115814 (2023).
11. Li, Y. J. *et al.* Flavonoids casticin and chrysosplenol D from *Artemisia annua* L. inhibit inflammation in vitro and in vivo. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **286**, 151–158 (2015).
12. Guerrero, M. F., Puebla, P., Carrón, R., Martín, M. L. & Román, L. S. Quercetin 3,7-dimethyl ether: a vasorelaxant flavonoid isolated from *Croton schiedeanus* Schlecht. *J. Pharm. Pharmacol.* **54**, 1373–1378 (2002).
13. Ramchandani, S., Naz, I., Lee, J. H., Rashid Khan, M. & Ahn, K. S. molecules An Overview of the Potential Antineoplastic Effects of Casticin. doi:10.3390/molecules25061287.
14. Ma, Q., Jiang, J. G., Zhang, X. M. & Zhu, W. Identification of luteolin 7-O- β -D-glucuronide from *Cirsium japonicum* and its anti-inflammatory

- mechanism. *J. Funct. Foods* **46**, 521–528 (2018).
15. Anwar, S. *et al.* Rosmarinic Acid exhibits Anticancer Effects via MARK4 Inhibition. *Sci. RepoRtS* | **10**, 10300 (2020).
 16. Oteng Mintah, S. *et al.* Medicinal Plants for Treatment of Prevalent Diseases. in *Pharmacognosy - Medicinal Plants* (2019).
 17. Ahamed, A. *et al.* Molecular perspective and anticancer activity of medicinal plants. *Saudi J. Biol. Sci.* **27**, 666–675 (2020).
 18. Majumder, M. *et al.* Ricinus communis L. fruit extract inhibits migration/invasion, induces apoptosis in breast cancer cells and arrests tumor progression in vivo. *Sci. Rep.* **9**, 1–14 (2019).
 19. Singh Asha, Masoodi, M., Nabi, N. & Ashraf, I. Medicinal plants as combating strategy against cancer: A review. *Int. J. Sci. Res. Rev.* **7**, 427–446 (2019).
 20. Garnham, R., Scott, E., Livermore, K. E. & Munkley, J. ST6GAL1: A key player in cancer. *Oncology Letters* vol. 18 983–989 (2019).
 21. Hanahan D, Weinberg R. Biology Hallmarks of Cancer. *Holland-Frei Cancer Med.* **01**, 1–4 (2017).
 22. Keibler, M. A. *et al.* Metabolic requirements for cancer cell proliferation. *Cancer Metab.* **4**, 16 (2016).
 23. Weyandt, J. D., Thompson, C. B., Giaccia, A. J. & Rathmell, W. K. Metabolic Alterations in Cancer and Their Potential as Therapeutic

- Targets. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. B.* **37**, 825–832 (2017).
24. Kumar, D. (Ed.). *Cancer stem cell metabolism: A potential target for cancer therapy. Molecular Cancer* vol. 15 (2020).
 25. Weber, G. F. Time and circumstances: Cancer cell metabolism at various stages of disease progression. *Front. Oncol.* **6**, 1–9 (2016).
 26. Lundø, K., Trauelsen, M., Pedersen, S. F. & Schwartz, T. W. Why Warburg Works: Lactate Controls Immune Evasion through GPR81. *Cell Metab.* **31**, 666–668 (2020).
 27. Cluntun, A. A., Lukey, M. J., Cerione, R. A. & Locasale, J. W. Glutamine Metabolism in Cancer: Understanding the Heterogeneity. *Trends Cancer* **3**, 169–180 (2017).
 28. Wishart, D. S. Metabolomics for investigating physiological and pathophysiological processes. *Physiol. Rev.* **99**, 1819–1875 (2019).
 29. Zhao, T., Mu, X. & You, Q. Succinate: An initiator in tumorigenesis and progression. *Oncotarget* **8**, 53819–53828 (2017).
 30. Grimalizzi, F. & Arranz, L. Multiple faces of succinate beyond metabolism in blood. *Haematologica* **103**, 1586–1592 (2018).
 31. Jin, L. & Zhou, Y. Crucial role of the pentose phosphate pathway in malignant tumors (review). *Oncol. Lett.* **17**, 4213–4221 (2019).
 32. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Biological Hallmarks of Cancer. in *Holland-Frei Cancer Medicine* 7–16 (American Cancer Society, 2017).

33. Kato, Y. *et al.* Acidic extracellular microenvironment and cancer. *Cancer Cell Int.* **13**, (2013).
34. Zhou, J. *et al.* Lactate potentiates angiogenesis and neurogenesis in experimental intracerebral hemorrhage. *Exp. Mol. Med.* **50**, 1 (2018).
35. Liu, Y. & Yang, C. Oncometabolites in cancer: Current understanding and challenges. *Cancer Res.* **81**, 2820–2823 (2021).
36. Benito, A., Diaz-Moralli, S., Coy, J. F., Centelles, J. J. & Cascante, M. Role of the Pentose Phosphate Pathway in Tumour Metabolism. in *Tumor cell metabolism* 143–164 (Springer-Verlag Vienna, 2015).
37. Wu, R., Galan-Acosta, L. & Norberg, E. Glucose metabolism provide distinct prosurvival benefits to non-small cell lung carcinomas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **460**, 572–577 (2015).
38. Chang, L., Fang, S. & Gu, W. The molecular mechanism of metabolic remodeling in lung cancer. *J. Cancer* **11**, 1403–1411 (2020).
39. Starobova, H. & Vetter, I. Pathophysiology of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Front. Mol. Neurosci.* **10**, (2017).
40. Sinha, B. K., Tokar, E. J. & Bushel, P. R. Elucidation of Mechanisms of Topotecan-Induced Cell Death in Human Breast MCF-7 Cancer Cells by Gene Expression Analysis. *Front. Genet.* **11**, 1–12 (2020).
41. Nemade, H. *et al.* Cell death mechanisms of the anti-cancer drug etoposide on human cardiomyocytes isolated from pluripotent stem cells.

Arch. Toxicol. **92**, 1507–1524 (2018).

42. Fakhri, S., Moradi, S. Z., Farzaei, M. H. & Bishayee, A. Modulation of dysregulated cancer metabolism by plant secondary metabolites: A mechanistic review. *Semin. Cancer Biol.* 1–30 (2020).
43. Khan, A., Siddiqui, S., Husain, S. & Mazurek, S. Phytochemicals targeting metabolic reprogramming in cancer : an assessment of role , mechanisms , pathways and therapeutic relevance. (2020).
44. Hernández, J. F. *et al.* A cytotoxic *Petiveria alliacea* dry extract induces ATP depletion and decreases β -F1-ATPase expression in breast cancer cells and promotes survival in tumor-bearing mice. *Rev. Bras. Farmacogn.* **27**, 306–314 (2017).
45. Han, S. *et al.* Anti-warburg effect of rosmarinic acid via miR-155 in gastric cancer cells. *Drug Des. Devel. Ther.* **9**, 2695–2703 (2015).
46. Chou, H.-C. *et al.* Proteomic and redox-proteomic analysis of berberine-induced cytotoxicity in breast cancer cells. *J. Proteomics* **75**, 3158–3176 (2012).
47. Li, Z., Li, H., Lu, Y., Yang, P. & Li, Z. *Berberine Inhibited the Proliferation of Cancer Cells by Suppressing the Activity of Tumor Pyruvate Kinase M2.* *NPC Natural Product Communications* vol. 12 (2017).
48. Liu, Y. *et al.* Berberine suppresses colon cancer cell proliferation by inhibiting the SCAP/SREBP-1 signaling pathway-mediated lipogenesis. *Biochem. Pharmacol.* **174**, (2020).

49. Pramanik, K. C., Boreddy, S. R. & Srivastava, S. K. Role of Mitochondrial Electron Transport Chain Complexes in Capsaicin Mediated Oxidative Stress Leading to Apoptosis in Pancreatic Cancer Cells. *PLoS One* **6**, 20151 (2011).
50. Impheng, H., Pongcharoen, S., Richert, L., Pekthong, D. & Srisawang, P. The Selective Target of Capsaicin on FASN Expression and De Novo Fatty Acid Synthesis Mediated through ROS Generation Triggers Apoptosis in HepG2 Cells. *PLoS One* **9**, e107842 (2014).
51. Guo, G. *et al.* N-methylhemeanthidine chloride, a novel Amaryllidaceae alkaloid, inhibits pancreatic cancer cell proliferation via down-regulating AKT activation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **280**, 475–483 (2014).
52. Fang, J., -Yang Bao, Y., Zhou, S. H. & Fan, J. Apigenin inhibits the proliferation of adenoid cystic carcinoma via suppression of glucose transporter-1. *Mol. Med. Rep.* **12**, 6461 (2015).
53. Xiaping Chen , Hang Xu, Xinhua Yu, Xue Wang, Xiaohu Zhu, X. X. Apigenin inhibits in vitro and in vivo tumorigenesis in cisplatin-resistant colon cancer cells by inducing autophagy, programmed cell death and targeting m-TOR/PI3K/Akt signalling pathway - PubMed. *J BUON* **2**, 488–493 (2019).
54. Yoon-Mi Lee, et al. Inhibition of glutamine utilization sensitizes lung cancer cells to apigenin-induced apoptosis resulting from metabolic and oxidative stress. *Int. J. Oncol.* **48**, 399–408 (2016).

55. Uifălean, A. *et al.* The impact of soy isoflavones on MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells using a global metabolomic approach. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1–17 (2016).
56. Li, W. *et al.* Deguelin inhibits non-small cell lung cancer via down-regulating Hexokinases II-mediated glycolysis. *Oncotarget* **8**, 32586 (2017).
57. Javier A Menendez , Alejandro Vazquez-Martin, Cristina Oliveras-Ferraros, Rocio Garcia-Villalba, Alegria Carrasco-Pancorbo, Alberto Fernandez-Gutierrez, A. S.-C. Analyzing effects of extra-virgin olive oil polyphenols on breast cancer-associated fatty acid synthase protein expression using reverse-phase protein microarrays - PubMed. *Int J Mol Med* **4**, 433–9 (2008).
58. Brusselmans, K., Vrolix, R., Verhoeven, G. & Swinnen, J. V. Induction of Cancer Cell Apoptosis by Flavonoids Is Associated with Their Ability to Inhibit Fatty Acid Synthase Activity. *J. Biol. Chem.* **280**, 5636–5645 (2005).
59. Hu, Y., Qi, Y., Liu, H., Fan, G. & Chai, Y. Effects of celastrol on human cervical cancer cells as revealed by ion-trap gas chromatography-mass spectrometry based metabolic profiling. *Biochim. Biophys. Acta* **1830**, 2779–2789 (2013).
60. Lee, J. S. *et al.* Anticancer activity of pristimerin in epidermal growth factor receptor 2-positive SKBR3 human breast cancer cells. *Biol. Pharm. Bull.*

- 36**, 316–325 (2013).
61. Sorice, A. *et al.* Potential Anticancer Effects of Polyphenols from Chestnut Shell Extracts: Modulation of Cell Growth, and Cytokinomic and Metabolomic Profiles. *Molecules* **21**, (2016).
 62. Noorolahi, S. M. *et al.* Metabolomic profiling of cancer cells to Aloe vera extract by ¹H NMR spectroscopy. *J. Metabolomics* **2**, 1 (2016).
 63. Malekzadeh, R., Arjmand, M., Hajihosseini, R., Vaziri, A. & Zamani, Z. Evaluation of the Anticancer Effect of Xanthium Strumarium Root Extract on Human Epithelial Ovarian Cancer Cells Using ¹H NMR-Based Metabolomics. *J. Sci. Islam. Repub. Iran* **31**, 205–212 (2020).
 64. Rosidah, P. A. Z. H. Cytotoxic Effect of n-Hexane, Ethylacetate and Ethanol Extracts of *Plectranthus amboinicus*, (Lour.) Spreng.) on HeLa and Vero Cells Lines | Semantic Scholar. *Int. J. PharmTech Res.* **6**, 1806–1809 (2014).
 65. Muniyandi, K. *et al.* Antioxidant and anticancer activities of *Plectranthus stocksii* Hook. f. leaf and stem extracts. *Agric. Nat. Resour.* **51**, 63–73 (2017).
 66. Matias, D. *et al.* Comparison Study of Different Extracts of *Plectranthus madagascariensis*, *P. neochilus* and the Rare *P. porcatus* (Lamiaceae): Chemical Characterization, Antioxidant, Antimicrobial and Cytotoxic Activities. *Biomolecules* **9**, 179 (2019).
 67. Menon, D. B., Sasikumar, J. M. & Latha, K. Anti inflammatory and cytotoxic

- activity of methanolic extract of *Plectranthus hadiensis* stem. *Pharmacologyonline* **3**, 275–282 (2011).
68. Menon, D. B. & Gopalakrishnan, V. K. Terpenoids isolated from the shoot of *plectranthus hadiensis* induces apoptosis in human colon cancer cells via the mitochondria-dependent pathway. *Nutr. Cancer* **67**, 697–705 (2015).
 69. Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. of Immunological Methods* **65**, 55–63 (1983).
 70. Saborano, R. *et al.* A framework for tracer-based metabolism in mammalian cells by NMR. *Sci. Rep.* **9**, 1–13 (2019).
 71. Wishart DS, Jewison T, Guo AC, Wilson M, Knox C, *et al.* Human Metabolome database. <https://hmdb.ca/>.
 72. Velásquez-Valle, R. *et al.* Revealing the ¹H NMR metabolome of mirasol chili peppers (*Capsicum annuum*) infected by *Candidatus Phytoplasma trifolii*. *Food Res. Int.* **131**, (2020).
 73. Nadeem, M. *et al.* Therapeutic potential of rosmarinic acid: A comprehensive review. *Appl.Sci* **9**, (2019).
 74. Prayong, P., Barusrux, S. & Weerapreeyakul, N. Cytotoxic activity screening of some indigenous Thai plants. *Fitoterapia* **79**, 598–601 (2008).

75. Yin, J., Xing, H. & Ye, J. Efficacy of Berberine in Patients with Type 2 Diabetes. *Metabolism*. **57**, 712 (2008).
76. Abdul-Hamid, N. A. *et al.* ¹H-NMR-based metabolomics to investigate the effects of Phoenix dactylifera seed extracts in LPS-IFN- γ -induced RAW 264.7 cells. *Food Res. Int.* **125**, (2019).
77. Hussein, H. A. *et al.* Cytotoxicity and ¹H NMR metabolomics analyses of microalgal extracts for synergistic application with Tamoxifen on breast cancer cells with reduced toxicity against Vero cells. (2022) doi:10.1016/j.heliyon.2022.e09192.
78. Adekola, K., Rosen, S. T., Shanmugam, M. & Lurie, R. H. Glucose transporters in cancer metabolism HHS Public Access. *Curr Opin Oncol* **24**, 650–654 (2012).
79. Parkinson, E. K. *et al.* Extracellular citrate and metabolic adaptations of cancer cells. **1**, 3.
80. Philippe Icard, H. L. The reduced concentration of citrate in cancer cells: An indicator of cancer aggressiveness and a possible therapeutic target. *Drug Resist. Updat.* **30**, 63 (2017).
81. Moreno, P. *et al.* Metabolomic profiling of human lung tumor tissues – nucleotide metabolism as a candidate for therapeutic interventions and biomarkers. *Mol. Oncol.* **12**, 1778–1796 (2018).
82. Casas-Benito, A., Martínez-Herrero, S. & Martínez, A. Succinate-Directed Approaches for Warburg Effect-Targeted Cancer Management, an

- Alternative to Current Treatments? *Cancers (Basel)*. **15**, (2023).
83. Yu, S. K. Malonate metabolism: biochemistry, molecular biology, physiology, and industrial application. *J. Biochem. Mol. Biol.* **35**, 443–451 (2002).
 84. Li, T., Copeland, C. & Le, A. Glutamine Metabolism in Cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1311**, 17–38 (2021).
 85. Bamji-Stocke, S., Victor Van Berkel, -, Miller, D. M., Hermann, · & Frieboes, B. A review of metabolism-associated biomarkers in lung cancer diagnosis and treatment. *Metabolomics* **14**, 81 (123AD).
 86. N. Yothaisong, et al. Inhibition of I-type amino acid transporter 1 activity as a new therapeutic target for cholangiocarcinoma treatment. *Tumor Biol.* (2016).
 87. Hilvo, M. *et al.* Accumulated metabolites of hydroxybutyric acid serve as diagnostic and prognostic biomarkers of ovarian high-grade serous carcinomas. *Cancer Res.* **76**, 796 (2016).
 88. Mierziak, J., Burgberger, M. & Wojtasik, W. 3-Hydroxybutyrate as a Metabolite and a Signal Molecule Regulating Processes of Living Organisms. *Biomolecules* **11**, 1–21 (2021).
 89. Bose, S. V. R. & Locasale, J. W. Acetate Metabolism in Physiology, Cancer, and Beyond. *Cell Press* **9**, 9 (2019).
 90. Li, S., Wang, H., Wang, X., Wang, Y. & Feng, J. Betaine affects muscle

lipid metabolism via regulating the fatty acid uptake and oxidation in finishing pig. doi:10.1186/s40104-017-0200-6.

91. Hasan, T. *et al.* Disturbed homocysteine metabolism is associated with cancer. *Exp. Mol. Med.* **51**, (2019).
92. Kar, F., Hacıoglu, C., Kacar, S., Sahinturk, V. & Kanbak, G. Betaine suppresses cell proliferation by increasing oxidative stress-mediated apoptosis and inflammation in DU-145 human prostate cancer cell line. *Cell Stress Chaperones* **24**, 871–881 (2019).
93. Puchades-Carrasco, L. *et al.* Serum metabolomic profiling facilitates the non-invasive identification of metabolic biomarkers associated with the onset and progression of non-small cell lung cancer. *Oncotarget* **7**, 12904–12916 (2016).
94. Johannes Meiser, 1 Sergey Tumanov, 1, 2 Oliver Maddocks, 2 Christiaan Fred Labuschagne, *et al.* Serine one-carbon catabolism with formate overflow. *Sci. Adv.* **2**, 10 (2016).
95. Amelio, I., Cutruzzolá, F., Antonov, A., Agostini, M. & Melino, G. Serine and glycine metabolism in cancer. *Trends Biochem. Sci.* **39**, 191–198 (2014).

CAPITULO 9.

ANEXOS

9.1 Preparación del medio de cultivo

Se pesan 9.57 g. de Medio Esencial Mínimo Eagle's (EMEM) y se disuelve en aproximadamente 800 mL de agua desionizada MiliQ hasta que se haya disuelto. Posteriormente se pesan 2200mg de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) y se agregan al medio hasta que se disuelva. Una vez homogénea la muestra, se agrega 1 mL de antibiótico (estreptomina). Después de que los componentes se encuentren mezclados, se mide el PH y se ajusta a 7.4, se añade el resto del agua para completar 1 litro. Posteriormente se filtra el medio de cultivo preparado. Por último, se toman alícuotas de este medio y se le añade suero fetal bovino, se deja a prueba de esterilidad por 24 horas en incubación a 37°C. Si este pasa la prueba se puede utilizar y se conserva a 4°C.

9.2 Preparación de la Solución de Buffer de Fosfatos (PBS)

Se pesan 8 g de cloruro de sodio y se le añaden 250 mL de agua MiliQ hasta su completa disolución. Después se pesa 1.44 gr de fosfato dibásico de sodio y se

agrega a la solución de cloruro de sodio, se agregan además 250 mL de agua MiliQ, se deja disolver, posteriormente se pesa 0.20 g de cloruro de potasio a la solución anterior y se adicionan 250 mL más de agua MiliQ, se deja disolver y por último se pesa 0.24 g de fosfato dibásico de potasio a la misma solución y se agrega el restante de agua MiliQ correspondiente para completar 1 L. Se ajusta el pH a 7.4 y finalmente se esteriliza para su utilización.