

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTINEOPLÁSICA *IN VITRO* DE
LOS EXTRACTOS METANÓLICOS DE *Sechium edule*
(Jacq.)(Swartz)var.*nigrum spinosum* y *Vernonia greggii* NANOENCAPSULADO
SOBRE CÉLULAS TUMORALES HUMANAS.**

POR

CD JISELL ALVAREZ SANDOVAL

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN MANEJO Y APROVECHAMIENTO INTEGRAL DE
RECURSOS BIÓTICOS**

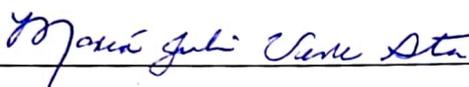
2024

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTINEOPLÁSICA *IN VITRO* DE
LOS EXTRACTOS METANÓLICOS DE *Sechium edule*
(Jacq.)(Swartz)var.*nigrum spinosum* y *Vernonia greggii* NANOENCAPSULADO
SOBRE CÉLULAS TUMORALES HUMANAS.**

Comité de Tesis



Dr. Abelardo Chávez Montes
Presidente



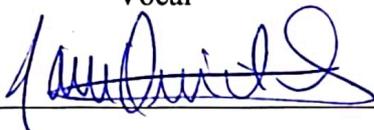
Dra. María Julia Verde Star
Secretario



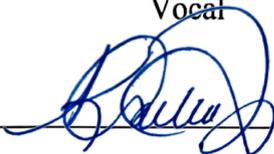
Dra. Sandra Loruhama Castillo Hernández
Vocal



Dr. Eduardo Sánchez García
Vocal



Dr. Ramiro Quintanilla Licea
Vocal



Dra. Katiushka Arévalo Nino
Subdirectora de posgrado



**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTINEOPLÁSICA *IN VITRO* DE
LOS EXTRACTOS METANÓLICOS DE *Sechium edule*
(Jacq.)(Swartz)var.*nigrum spinosum* y *Vernonia greggii* NANOENCAPSULADO
SOBRE CÉLULAS TUMORALES HUMANAS.**

Dirección de Tesis



Dr. Abelardo Chávez Montes
Director



Dr. Adolfo Soto Domínguez
Director externo

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

AGRADECIMIENTOS



Agradezco principalmente, a la Universidad Autónoma de Nuevo León, a la Facultad de Ciencias Biológicas de la misma casa de estudios, así como a la Subdirección de Posgrado de dicha Facultad, por brindarme su paciencia y apoyo durante el transcurso de mis estudios, así mismo, extendo mi agradecimiento al Departamento de Histología y Química Analítica de la Facultad de Medicina, UANL, por abrirme las puertas de su laboratorio y apoyo para la realización de la presente Investigación.



Sin ser menos importante, agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), por la beca No. 822976, que me fue asignada como apoyo para la realización de mis estudios, y por ende, la realización de este trabajo

DEDICATORIA

Este trabajo me gustaría dedicarlo a Dios por permitirme vivir esta etapa de mi vida, además de brindarme la fortaleza y la paciencia que necesito, por permitirme la dicha de disfrutar esta etapa de mi vida.

A mi familia, mis padres Hugo Alvarez Díaz y Luz María Sandoval Moya, que día con día me han apoyado desde siempre, en cada decisión y cada novedad con la que salgo, en las medidas que pueden, a mi hermana Leslie Alvarez por cada momento, risa, y conversación que hemos tenido, pero en especial por nuestro mutuo apoyo.

Agradezco profundamente a mi estimado comité de tesis, pero en especial al Dr. Abelardo Chávez Montes, quien me ha brindado la oportunidad de hacer este trabajo posible, muchas gracias por su apoyo, su confianza, las lecciones y los conocimientos que me ha brindado, además de brindarme nuevas perspectivas sobre el mundo que nos rodea, y permitirme ser parte de su equipo y abrirme las puertas de su laboratorio.

También quisiera dedicarlo y agradecer a los amables compañeros que conocí en mi paso por el laboratorio de química e histología, que con su disposición y ánimos crearon un ambiente ameno, en especial a mis compañeras: Alma, Andrea y Lumi, quienes siempre me han recordado de diferentes maneras lo que es la amabilidad, comprensión, tolerancia y la libertad, muchas gracias por las risas y pláticas compartidas así como experiencias.

A mis mentores que me han alentado e impulsado a seguir adelante todo este tiempo, gracias por su comprensión, consideración y estima, Dr. Adolfo, Dra. Rocío, Dr. Ray, M.C. Gloria, Dr. Joel, Dra. Osvelia, Dra. Hortencia, Dr. Eduardo, Dra. Sandra, Dr. Ramiro, Dra. Julia y Dr. Uziel.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. <i>Sechium edule</i> var. <i>nigrum spinosum</i>	3
2.1.1. Taxonomía y características botánica de <i>Sechium edule</i>	3
2.1.2. Requerimientos climáticos para <i>Sechium edule</i>	4
2.1.3. Perfil fitoquímico de <i>Sechium edule</i>	4
2.2. <i>Vernonia greggii</i>	5
2.2.1. Taxonomía y características botánica de <i>Vernonia greggii</i>	5
2.2.2. Perfil fitoquímico de <i>Vernonia greggii</i>	6
2.3. Técnicas para obtención de extractos de plantas	6
2.4. Nanomedicina y nanopartículas	7
2.4.1. Clasificación de nanopartículas y sus características	8
2.5. Cáncer	11
2.6. Cáncer de cuello uterino	12
4. HIPÓTESIS	14
5. OBJETIVO DEL TRABAJO.....	15
5.1. Objetivo general	15
5.2. Objetivos específicos	15
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
6.1. Material vegetal y procedencia	16

6.2. Reactivos y químicos	16
6.3. Preparación del extracto	16
6.4.Elaboración de nanopartículas PLGA	17
6.4.1. Caracterización de nanopartículas	18
6.5. Cromatografía líquida de alto rendimiento- espectrometría acoplado a masas (HPLC-MS).....	20
6.6.Ensayos de viabilidad celular	22
6.6.1.Ensayo de citotoxicidad con MTT	22
6.6.2. Ensayo de contraste de núcleos con DAPI.....	24
6.7. Actividad hemolítica	24
6.8. Consentimiento ético	25
7. DISEÑO EXPERIMENTAL	26
8. RESULTADOS.....	27
8.1. Rendimientos y perfil fitoquímico preliminar del extracto de <i>Sechium edule</i> y <i>Vernonia greggii</i>	27
8.2. Perfil fitoquímico preliminar y su caracterización mediante HPLC-MS	28
8.3. Curva de calibración de <i>S.edule</i> y <i>V.greggii</i>	30
8.4. Efecto citotóxico de <i>S.edule</i> var. <i>nigrum spinosum</i> y <i>V.greggii</i>	31
9. DISCUSIÓN.....	42
10. CONCLUSIONES	46
11. PERSPECTIVAS	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.....	3
Tabla 2.....	5
Tabla 3.....	7
Tabla 4.....	27
Tabla 5.....	28
Tabla 6.....	31
Tabla 7.....	35
Tabla 8.....	40
Tabla 9.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.....	20
Figura 2.....	23
Figura 3.....	24
Figura 4.....	29
Figura 5.....	29
Figura 6	32
Figura 7	33
Figura 8	34
Figura 9.....	34
Figura 10.....	36
Figura 11.....	37
Figura 12	38
Figura 13.....	38

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

$\mu\text{g/mL}$: Microgramos sobre mililitro

IC_{50} : Concentración Inhibitoria Media

VC: Viabilidad celular

DMEM: Medio de Eagle Modificado por Dubelcco

SFB: Suero Fetal Bovino

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

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

NP: Nanopartículas

nm: Nanómetros

PDI: Índice de polidispersidad

ζ : Potencial Z

ee %: Eficiencia de encapsulación

dl %: Porcentaje de carga

ABS: Absorbancia

$\lambda_{\text{máx}}$: Lambda máxima

RESUMEN

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTINEOPLÁSICA *IN VITRO* DE LOS EXTRACTOS METANÓLICOS DE *Sechium edule* (Jacq.)(Swartz)var.*nigrum spinosum* y *Vernonia greggii* NANOENCAPSULADO SOBRE CÉLULAS TUMORALES HUMANAS.

Actualmente, es relevante la implementación de la medicina tradicional para el tratamiento de diversas enfermedades. *Sechium edule* (Jacq.)(Swartz) (Chayote) es una planta trepadora que produce un fruto que le da a esta especie el nombre común de Chayote, *Sechium edule* (Jacq.)(Swartz) var *nigrum spinosum*, el cual ha reportado tener propiedades quimioterapéuticas. Por su parte, *Vernonia greggii*, una planta de la cual hay nula información, sin embargo, pertenece a la familia *Asteraceae*, la cual se caracteriza por mostrar importante actividad biológica. El objetivo de este estudio fue determinar la actividad antineoplásica de nanopartículas cargadas con extracto metanólico de *Sechium edule* (Me-S.e) y extracto metanólico de *V.greggii* (Me-V.g) sobre células de cáncer de cuello uterino humano HeLa. Para ello se caracterizó el perfil cromatográfico de los extractos por medio de HPLC- MS. Mediante el ensayo de MTT y contraste de núcleos DAPI se evaluó el porcentaje de viabilidad celular (VC) de los linajes celulares HaCat (queratinocitos epidérmicos humanos) y HeLa. Los tratamientos control utilizados fueron negativo (medio de cultivo fresco), positivo (Doxorubicina). Los datos se analizaron mediante un ANOVA con comparación de medias de Tukey en el software Graphpad Prism9, y el IC₅₀ fue calculado con el programa ATT Bioquest, IC₅₀ calculator. Se encontró que Me-S.e libre fue citotóxico sólo a partir de 4 mg/mL, mientras que nanoencapsulado su citotoxicidad fue a 650 µg/mL siendo similar a las nanopartículas blanco. Por otro lado, Me-V.g, presentó citotoxicidad a partir de 200 µg/mL, ambos extractos sobre HeLa; por lo que, se decidió fraccionar Me-V.g en metanol, agua destilada y hexano (F-Me, F-Ac y F-He); F-Me fue citotóxico a partir de 6 µg/mL, F-He a partir de 100 µg/mL y F-Ac a partir de 300 µg/mL. F-Me nanoencapsulado fue citotóxico a partir de 200 µg/mL, las

nanopartículas blanco no fueron tóxicas. Así mismo, se encontró que F-Me no es hemolítico, pero nanoencapsulada es hemolítica sólo a 800 y 1000 µg/mL.

Palabras claves: *Sechium edule*, *Vernonia greggii*, extracto metanólico, nanoencapsulado.

ABSTRACT

DETERMINATION OF THE IN VITRO ANTINEOPLASTIC ACTIVITY OF METHANOLIC EXTRACTS OF *Sechium edule* (Jacq.) (Swartz) var. *nigrum spinosum* and *Vernonia greggii* NANOENCAPSULATION ON HUMAN TUMOR CELLS.

Currently, the implementation of traditional medicine for the treatment of various diseases is relevant. *Sechium edule* (Jacq.) (Swartz) (Chayote) it's a climbing plant that produces a fruit that gives this species the common name of Chayote, *Sechium edule* (Jacq.) (Swartz) var *nigrum spinosum*, which has been reported to have chemotherapeutic properties. On the other hand, *Vernonia greggii*, a plant about which there is no information, however, belongs to the *Asteraceae* family, which is characterized by showing important biological activity. The objective of this study was to determine the antineoplastic activity of nanoparticles loaded with methanolic extract of *Sechium edule* (Me-*S.e*) and methanolic extract of *V.greggii* (Me-*V.g*) on cervical human cancer cells HeLa. To this end, the chromatographic profile of the extracts was characterized by HPLC-MS. The MTT and DAPI nucleus contrast assay evaluated the percentage of cell viability (VC) of the HaCat (human epidermal keratinocytes) and HeLa cell lineages. The control treatments used were negative (fresh culture medium), positive (Doxorubicin). The data were analyzed using an ANOVA with Tukey mean comparison in the Graphpad Prism9 software, and the IC₅₀ was calculated with the ATT Bioquest program, IC₅₀ calculator. It was found that free *Me-S.e* was cytotoxic only from 4 mg/mL, while nanoencapsulated its cytotoxicity was at 650 µg/mL being similar to the target nanoparticles. On the other hand, *Me-V.g* presented cytotoxicity from 200 µg/mL both extracts on HeLa; therefore, it was decided to fractionate Me-*V.g* into methanol, distilled water and hexane (F-Me, F-Ac and F-He); F-Me was cytotoxic from 6 µg/mL, F-He from 100 µg/mL and F-Ac from 300 µg/mL. Nanoencapsulated F-Me was cytotoxic from 200 µg/mL, the target nanoparticles were non-toxic. Likewise, it was found that F-Me is not hemolytic, but nanoencapsulated it is hemolytic only at 800 and 1000 µg/mL.

Keywords: *Sechium edule*, *Vernonia greggii*, methanolic extract, nanoencapsulated

1. INTRODUCCIÓN

La medicina tradicional ha sido relevante en los últimos años debido a las propiedades y actividades biológicas que desempeñan las plantas, siendo objeto de estudio como auxiliar en tratamientos médicos. De los tejidos de la planta, sean sus hojas, flores, tallos, semilla, o, pulpa en caso de frutos, al ser tratados, pueden ser estudiadas sus propiedades biológicas, encontrando las biomoléculas secundarias a partir de recursos vegetales, y de esta manera puedan ser considerados para el tratamiento de enfermedades crónicas con las que el ser humano debe lidiar.

En el presente estudio se evaluaron dos vegetales de diferentes familias; uno de ellos fue *Sechium edule* (Jacq.)(Swartz) var *nigrum spinosum* mediante el uso de su fruto y semilla, comúnmente conocido como Chayote con espinas, de la familia de las Cucurbitaceas, al ser una fruta del grupo de hortalizas con diferentes variedades, se facilita su obtención comercial. El chayote ha sido utilizado en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica (Pu et al. 2021). Además de *Vernonia greggii*, cuyas flores, tallos y hojas fueron utilizados. Poco se sabe de los beneficios que puede aportar esta especie, a pesar de esto, la familia de las *Asteráceas* han demostrado una amplia gama de actividades biológicas entre los cuales se conocen antiinflamatoria, antioxidante, citotóxico e incluso antifúngico e insecticida (Sobrinho et al. 2015).

La nanotecnología aprovecha las propiedades de los sistemas a nanoescala, su aplicación puede crear o modificar materiales que van desde 1 y 100 nanómetros (nm) (Sim y Wong 2021). La nanomedicina deriva de este campo, tiene como ventajas su aplicación el diagnóstico, prevención y su implementación como coadyuvante en el tratamiento de enfermedades.

La administración de fármacos mediante el uso de nanopartículas permite una administración controlada y dirigida, mejoran la solubilidad y disponibilidad de los fármacos, además de mejorar su biodisponibilidad.

El aumento en la eficacia de los fármacos quimioterapéuticos respecto a su focalización tumoral, permite la mejora en cuanto a la farmacocinética y

farmacodinámica. Los quimioterapéuticos nanoencapsulados tienen a su favor el efecto de permeación y retención mejorado (EPR) siendo una estrategia eficaz contra el cáncer (Malik et al. 2023a, 2023b).

Por otro lado, el cáncer es una enfermedad crónica que degenera la salud de quien lo padece. La proliferación de células cancerosas, la alteración de las células y tejidos sanos alteran las funciones corporales normales, desencadenando fallas orgánicas, dolor entre otras perturbaciones a la calidad de vida relacionadas con el cáncer (Brown et al. 2023). Esta enfermedad tiene impacto en la economía de los pacientes ya que a menudo no pueden seguir el ritmo de empleos a tiempo completo, lo que dificulta pagar facturas, comida o incluso el mantener su hogar (Alzehr et al. 2022).

A pesar de ser una enfermedad que cuenta con tratamiento, varios escenarios nos pueden ayudar a entender el incremento en los decesos, entre ellos se encuentran: casos donde el tumor afecta órganos vitales, el tratamiento y sus efectos secundarios que pueden ser fatales, el tratamiento quirúrgico y sus posibles complicaciones con posible desenlace fatal (Dillekås et al. 2019). Según la base de datos de GLOBOCAN, en el año 2022 a nivel mundial, sobre cáncer en general, se estimaron 19,976,499 incidencias, además de estimarse 9,743,832 decesos; aunado a esto, respecto al cáncer de cuello uterino se reportaron 662, 301 casos nuevos y 348, 874 decesos.

Por otro lado, en el 2020, México, se estimaron 9, 439 casos nuevos, además de 4, 335 decesos, convirtiéndose en el segundo tipo de cáncer que afecta a las mujeres (Muñoz et al. 2022)

Con lo anterior expuesto, esta investigación aborda dos líneas de investigación: la medicina herbolaria y la nanotecnología, determinando la citotoxicidad de los extractos metanólicos de *Sechium edule* y *Vernonia greggii*.

2. ANTECEDENTES

2.1. *Sechium edule* var. *nigrum spinosum*

2.1.1. Taxonomía y características botánica de *Sechium edule*

México es uno de los países con mega diversidad dentro de América Latina donde abunda una gama de diversidad vegetal a nivel global. Se tiene registro de que hay alrededor de 35,000 especies de plantas, las cuáles se les da un uso medicinal en nuestro país (García Alvarado et al. 2001). Entre esos recursos bióticos se encuentra el chayote, cuyo nombre científico es *Sechium edule*, es uno de los frutos de los cuáles México es de los mayores productores, específicamente los estados de Chiapas, Puebla, Veracruz, Oaxaca. *S. edule* cuenta con 10 variedades y son diversos en cuanto a forma, color, textura y sabor. Su taxonomía se describe en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Taxonomía de *Sechium edule*

Reino	Vegetal
Subreino	Embryophyta
División	Anthophyta
Clase	Dicotyledoneae
Orden	Cucúrbitales
Familia	Cucurbitáceae
Subfamilia	Sicyoideae
Género	<i>Sechium</i>

Según lo descrito por Avedaño en el 2010, el fruto de *S. edule* var. *nigrum spinosum* es color verde claro a verde oscuro, grande, piriforme de 5.8 a 17.1 cm de longitud, 5.0 a 12.2 cm de ancho, 3.6 a 9.7 cm de grosor, densamente espinoso (media a alta), cinco costillas no muy marcadas, hendidura basal muy marcada, pubescencia muy baja en pedúnculo, mesocarpio verde claro a verde oscuro, sabor neutro a ligeramente dulce (6.43 °Bx) y fibra muy adherida. Las variedades corresponden al número de horas de luz del día.

2.1.2. Requerimientos climáticos para *Sechium edule*

El rango de temperatura ideal para el cultivo del chayote es de entre 26°C; la variedad *nigrum spinosum* crece óptimamente en zonas de valles altos de entre 2,000 a 2,800 metros sobre el nivel del mar, el periodo de tiempo de fructificación es corto, no mayor a 4 meses, los periodos de tiempo donde ocurren heladas en estas zonas pueden eliminar la parte aérea de la planta. Su tiempo de crecimiento se mantiene constante, de entre 6 a 18 días después de la antesis (Avedaño 2010).

2.1.3. Perfil fitoquímico de *Sechium edule*

Las plantas dentro de la familia Cucurbitaceae, presentan taninos, carbohidratos, resinas, saponinas, fitoesteroles, carotenoides y los principales los cuales son, los triterpenos cucurbitacinas (Pulok 2022).

Dentro de las características fitoquímicas que se han encontrado en *S. edule*, se han encontrado que están presentes alcaloides no fenólicos, saponinas, esteroides, triterpenos e incluso ocho flavonoides glicosilados, entre estos, muchos han sido relacionados con poseer actividad antitumoral (Iñiguez- Luna et al. 2021). Además de contener también, peroxidases, polifenoles y cucurbitacinas (Aguñiga et al. 2015).

Salazar et al. (2017), en un estudio, encontraron el extracto metanólico de una nueva variedad de *Sechium edule*, “Perla Negra”, donde fueron identificados mediante cromatografía de capa fina (TLC) y cromatografía de columna (CC) los terpenos y flavonoides. Los compuestos identificados mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) fueron Curcubitacinas B, D, E y I para las fracciones de terpenos; y Rutina, Floricidina, Miricetina, Quercitina, Naringenina, Floretina, Apigenina y Galangina para las fracciones de flavonoides.

Se ha encontrado que al utilizar la semilla de *S. edule*, esta tiene la capacidad de inhibir la proliferación de células HeLa mediante la desactivación de la función ribosómica, otorgándole un valor quimioterapéutico, dicha proteína se conoce como “sequiumina” (Wu et al. 1998).

En cuanto a su actividad biológica, Aguiñiga et al. (2017), utilizaron precisamente las hojas, tallos y semillas de *Sechium edule* (Jacq.)var *nigrum spinosum* con los que se obtuvo un extracto metanólico y se evaluó el efecto anti proliferativo de este en células leucémicas P388 MNCBM (células mononucleares de la médula ósea) a una concentración entre 40 y 2370 µg/mL. El extracto inhibió la proliferación de células leucémicas P388 y de las células normales, pero fue más marcada en las células leucémicas. Los valores IC₅₀ obtenidos fueron respectivamente 927 y 1911 µg/mL para la línea celular leucémica P388 y MNCBM; el extracto indujo la apoptosis sólo de células leucémicas y se encontró que hubo un efecto antioxidante.

2.2. *Vernonia greggii*

2.2.1. Taxonomía y características botánica de *Vernonia greggii*

En esta familia se encuentran de 1600 a 2500 especies, desde hace siglos se usan con fines medicinales, se consideran rica fuente de insulina, y se atribuyen actividades antioxidantes, antimicrobiana y antiinflamatoria. Las Asteraceas comúnmente se encuentran en hábitats forestales, pastizales y en zonas tropicales. La morfología puede variar, en algunos casos las especies son arbustos, árboles de 30 m, hierbas perennes; mientras que sus hojas son distintas, suelen ser grandes o pequeñas, espinosas o carecer de ellas. Regularmente suelen estar cubiertas por vellosidades, además de que la mayoría contiene un racimo plano de flores (Rolnik y Olas 2021). La taxonomía de *Vernonia greggii* se puede apreciar en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Taxonomía de *Vernonia greggii*

Reino	Vegetal
División	Tracheophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Género	Vernonia
Especie	V. greggii

2.2.2. Perfil fitoquímico de *Vernonia greggii*

Hasta ahora, antecedentes reportan que las plantas de la familia *Asteraceae* presentan ácidos fenólicos, flavonoides, acetilenos, triterpenos, se caracterizan por ser una fuente rica en lactonas sesquiterpénicas (Rolnik y Olan 2021).

Las plantas del género *Vernonia* contienen compuestos con actividad biológica en los que destacan los alcaloides, flavonoides, terpenoides, carotenoides y taninos esteroideo, también se le atribuyen propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, antitumorales, entre otras (Mishra et al. 2023) . Las lactonas sesquiterpénicas son las biomoléculas secundarias más comunes en el género *Vernonia* se caracterizan por tener un doble enlace endocíclico 7 y un grupo acetato C-13 conocidos como glaucolidos e hirsutinolidas, esta biomolécula se asocia con actividad biológica por la presencia de α -metileno- δ -lactona (Lopes J.L. 1991).

El género *Vernonia* ha sido estudiado por sus propiedades quimioprotectoras y anticancer, las siguientes especies con estas propiedades son: *V. antihelminthica*, de sus frutos secos deriva el Isorhamnetin, el cual inhibe la proliferación y la migración de PANC-1 (células de adenocarcinoma pancreático), causa el arresto de la fase S del ciclo celular, además de disminuir los niveles de fosforilación de MEK y las quinasas reguladas por señalización extracelular (ERK) de la ruta Ras/MAPK. Esta ruta está involucrada en la proliferación celular, apoptosis y diferenciación (Gonzatto et al. 2022).

2.3. Técnicas para obtención de extractos de plantas

La **Tabla 3** presenta los diferentes procedimientos técnicos de Odukoya et al. (2022) en la obtención del extracto de plantas.

Tabla 3. Técnicas para la obtención del extracto de plantas

Concocciones	Preparación acuosa, se debe remojar (3 días) o hervir (15 a 20 min) en agua.
Decocciones	Preparación acuosa que involucra hervir (15 a 20 min) en agua hasta que el volumen del agua se haya reducido a la mitad. También hay decocción fuerte, decocción seca o por tintura.
Maceración	La planta puede usarse en polvo fino, y se remoja en el solvente dentro de un contenedor tapado, a temperatura ambiente, durante 3 días o más, con agitaciones frecuentes. La mezcla se debe presionar o colar mediante filtración.
Infusión	La planta en cuestión (fresca o seca) se remoja en agua caliente por 10 min.
Polvo	Después de secarse, la planta se tritura en un polvo uniforme fino.

2.4. Nanomedicina y nanopartículas

La nanomedicina, se caracteriza por el uso de nano transportadores, y debido a las propiedades fisicoquímicas que poseen estos sistemas de liberación, ha causado un interés en cuanto al manejo quimioterapéutico para el tratamiento contra el cáncer. Antecedentes reportan que desde la década anterior se ha implementado el uso de nanopartículas para complementar la terapia fotodinámica como tratamiento contra el cáncer (Roblero-Bartolón et al. 2014).

La aplicación de la nanotecnología en la medicina, ha demostrado ser una alternativa para la administración de fármacos, debido a la necesidad de superar las barreras biológicas mediante dichos nanotransportadores, que dirigen activos o fármacos poco solubles en agua, protegiéndoles en su trayecto por el torrente sanguíneo. Su relación superficie/volumen incrementa el efecto del principio activo en el objetivo, y su morfología permite que llegue al sitio de interés (Cardoso et al. 2022). Por lo cual, su

objetivo, más que encontrar nuevas moléculas, es mejorar la administración y biodisponibilidad del medicamento o principio activo.

2.4.1. Clasificación de nanopartículas y sus características

Las nanopartículas pueden clasificarse según sus dimensiones, su composición química y su morfología.

En cuanto a su dimensión, existe un rango de tamaño nanométrico, el cuál es de entre 10- 100 nm. En cuanto a su dimensión se dividen en cuatro tipos: a) Zero (clasificadas como cero dimensionales 0 D, o puntos cuánticos QD, son los más utilizados y tienen una amplia aplicación en electrónicos por su capacidad de mejoramiento óptico; b) Partículas de una sola dimensión comprimidas en una dimensión fuera del rango de tamaño nanométrico, otras dimensiones en la escala de rango son uni dimensional (1D). Sirven como los principales bloques de construcción de nanoestructuras; c) Partículas de dos dimensiones (tienen dos dimensiones fuera del rango de tamaño nanométrico). Tienen la característica de ser delgadas películas, nanohojas y nanocorevestimiento, tienen aplicaciones sobre nanosensores o nanoreactores) y las nanopartículas tridimensionales.

Basado en su composición química, inorgánicas, *las nanopartículas metálicas*, metal puro, más usadas en campo biomédico, entre los metales más comunes están el oro, plata, cobre, hierro, cadmio, cobalto, nanopartículas de platino y plomo. Por otro lado, los óxidos de metal son aún más químicamente estables que los metales. *Las nanopartículas a base de óxido de metal* más comunes de usar son óxido de zinc (ZnO), óxido de hierro (FeO, Fe₂O₃, Fe₃O₄), óxido de aluminio (Al₂O₃), sílica (SiO₂), óxido de cobre II (CuO), óxido de magnesio (MgO), óxido de níquel (NiO), óxido de titanio (TiO₂), óxido de cerio (CeO₂), y dióxido de zirconio (ZrO₂).

Nanopartículas a base de carbón, entre ellas se encuentran los diamantes, grafeno, nanotubo de carbón (CNT), carbón nano fibras (CNF), carbón negro, puntos de carbón.

Nanopartículas cerámicas, compuestas por sólidos inorgánicos (eg. Óxidos, carburos, fosfatos, y carbonatos de metales, y metaloides), están conformados con poros, y estos evitan de degradación.

Por otro lado, las nanopartículas **orgánicas**, las cuales son ideales para la distribución de fármacos, no son tóxicas, son biodegradables y biocompatibles, pueden ser lipídicas, las cuales son capaces de transportar moléculas hidrofóbicas, hidrofílicas y anfipáticas.

Finalmente las nanopartículas *poliméricas*, económicas, biodegradables, no tóxicas (Khan y Hossein 2022). Según Ahlawat et al. (2018) dichas nanopartículas pueden tener un tamaño de entre 10 y 1000 nm, compuestas por polímeros y copolímeros que protegen el fármaco, puede encapsularlo al interior de partícula o ser absorbidos en la superficie, unidos químicamente a la superficie; Las nanopartículas poliméricas pueden dividirse en: nanocápsulas (su núcleo es aceitoso y la superficie exterior es polimérica, el fármaco puede ser encapsulado por el núcleo, o ser absorbido por la superficie), o nanoesferas (ambos, la superficie exterior y el núcleo constan de material polimérico, el fármaco se retiene u absorbe por la estructura polimérica).

La morfología de las nanopartículas es diversa, pueden ser: esférica, hexagonal, hélice, forma de prisma, cilíndrica, plana, tubular, etc (Khan y Hossein 2022).

El tamaño de la partícula y el índice de polidispersidad (PDI) son importantes factores físicos los cuales influyen en la captación celular. Un ejemplo, es la vasculatura del tejido tumoral, tiene mayor permeabilidad y alta densidad vascular; esto favorece la acumulación de agentes quimioterapéuticos de alto peso molecular en el tejido tumoral, esto es conocido como efecto de retención y permeabilidad mejorada (EPR); hay literatura que indica que los nanotransportadores menores de 200 nm pueden pasar mediante transporte pasivo por medio del EPR (Danaei et al.2018).

Con lo mencionado anteriormente, dentro de las ventajas que tienen los nanosistemas como medio de liberación, debido a su estructura y tamaño, es la forma en la que localizan a las células tumorales, y esto se conoce “acumulación pasiva” y “acumulación activa”.

La acumulación pasiva, toma lugar al momento en que las células tumorales, al crecer rápido y sin algún control, por medio de la angiogénesis como estimulación, se obtiene una arquitectura deficiente que presenta fenestraciones que miden entre 10 a 800 nm. Además de tener un deficiente drenaje linfático, lo cual da lugar a un efecto de

permeabilidad y retención aumentada; esto permite que los nanosistemas puedan llegar fácilmente a las células tumorales, entrando por los poros que se encuentren entre el tejido y permaneciendo allí. Así mismo, se pueden alcanzar concentraciones del nanosistema 10 veces más alto en células tumorales comparado con células de tejido sano.

Por otro lado, en la acumulación activa, las células tumorales, al sobre expresar ciertos receptores de membrana, los cuales favorecen un descontrolado crecimiento; teniendo esto en cuenta, el nanosistema puede llevar en su superficie un ligando (péptido, proteína etc) el cual localiza al receptor, lo reconoce, y ya estando en el tejido tumoral, empezará a liberar su carga terapéutica (Rojas et al. 2016).

En un estudio, donde se realizó una revisión literaria sobre la actualización de fármacos en la nanomedicina que han sido aprobados en los últimos años, encontramos que entre ellos destaca la nanopartícula de quimioterapia Vyxeos® (Anselmo y Mitragotri 2019) para su aplicación en el tratamiento de la LMA-t (Leucemia mieloide aguda relacionada con la terapia) y MDS (síndrome mielodisplásico), ambas categorías se designan como “AML- MRC”. Su formulación es liposomal, proporción molar fija 1:5 de los fármacos antineoplásicos daunorrubicina y citarabina. La membrana del liposoma contiene: diestearoil fosfatidilcolina, diestearoil fosfatidilglicerol y colesterol, su respectiva proporción molar fue de 7:2:1. Fue probado en 309 pacientes de los cuales 153 recibieron Vyxeos y 156 recibieron la medicación sin la nanopartícula. Vyxeos® fue suministrado vía IV, (daunorrubicina 44 mg/m² - citarabina 100 mg/m²) al estar en circulación, ambos antineoplásicos se quedan dentro de la partícula, y al entrar en contacto con la célula, los liposomas se degradan. La daunorrubicina y citarabina dañan el DNA, generando la muerte celular. Los pacientes tratados con Vyxeos® tuvieron un 38% más de respuesta completa, comparado con un 26% de los pacientes control; así mismo, después de 30 días aplicado el tratamiento, hubo menos muertes 30 días posterior la dosis del tratamiento (10% frente 17%). Las reacciones adversas que se manifestaron fueron: hemorragia en el SNC, infección e insuficiencia respiratoria (Krauss et al. 2019).

Dentro de los nanomateriales orgánicos, este estudio tiene principal interés en la poli(D, L- lactida-co-glicolida) (PLGA), siendo un polímero biocompatible,

biodegradable, está aprobado por la FDA para administrar fármacos mediante nanopartículas (Lim et al. 2022).

En el estudio realizado por Amjadi et al. 2013, cuyo objetivo fue evaluar la actividad anticancerígena de nanopartículas poliméricas cargadas con Doxorubicina, y controlar la tasa de liberación del fármaco, utilizando el PLGA con diferente peso molecular (PM), los cuales fueron 50:50, 75:25 (láctido/glicólido) usando la técnica de doble emulsión. Por un espectro de transmisión FTIR encontraron que la Doxorubicina estaba encapsulada en las nanopartículas de PLGA 50, ya que la superposición de los grupos hidroxilo y amina mostró su presencia. Al caracterizar las nanopartículas obtuvieron tamaños de entre 320 a 370 nm, utilizando concentraciones de Doxorubicina de 5, 10 y 20 %w/w. Se observó además una diferencia en la eficacia de encapsulación, si el contenido de láctido a glicólido aumentaba, disminuía la eficacia de PLGA 50 (48%) y PLGA 75 (38%). Al encapsular el fármaco, aumentaron la carga de este y la porción de glicólido, esto favoreció el efecto antitumoral sobre las células de fibrosarcoma de ratón (L929), la CL_{50} del fármaco fue de $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$

2.5.Cáncer

Según GLOBOCAN, en el año 2020 en México, se registraron 195, 499 casos nuevos de cáncer en ambos sexos en una población estimada de 128, 932, 753 personas de ambos sexos.

En el mismo año, se reportaron 9,439 casos nuevos de cáncer de cuello uterino, de los cuales se estimaron 4,335 decesos. A su vez, se reportaron 6,955 casos nuevos de leucemia, de los cuales se estimaron 4,786 decesos, siendo que casi el 50% de los casos nuevos terminaron en deceso.

El cáncer es el resultado de un proceso que se desarrolla a largo plazos, siendo una sucesión larga y compleja que conlleva cambios genéticos, permitiendo que las células precancerosas adquieran características que conlleven al crecimiento maligno de las células tumorales. En este suceso, son importantes dos categorías de genes, que controlan el ciclo celular, en el que se realiza el crecimiento celular y su división. Los protooncogenes se encargan de fomentar la división celular; mientras que los genes

supresores de tumores los inhiben. Estos al sufrir una mutación, en caso de los protooncogenes se transforman en oncogenes, estimulando una división excesiva celular, y los genes supresores de tumores son inactivados, evitando la inhibición de la división celular (National Institutes of Health US 2007). Las células que proliferaron descontroladamente se agrupan según su órgano u tejido (Krieghoff et al. 2017).

2.6. Cáncer de cuello uterino

El cáncer de cuello uterino es una enfermedad que se caracteriza por una afectación en las células que se encuentran en el cuello uterino, que se encuentra en la parte inferior del útero que se conecta con la vagina.

Al principio, las lesiones, son pequeñas, por lo tanto, dificulta su diagnóstico y pueden pasar años, incluso llegar a un estado avanzado de la enfermedad, en la cual las lesiones se observen a simple vista. Los síntomas se caracterizan como, sangrado anormal. Se considera que hay diversos factores que puedan desencadenar esta enfermedad.

Se ha demostrado, que, entre los factores de riesgo más importantes, se encuentra la creciente incidencia de infección por el virus del papiloma humano (VPH), la cual aumenta la incidencia de esta enfermedad entre las mujeres más jóvenes (Shrestha et al. 2018).

En un estudio, se evaluó el efecto que tienen las nanopartículas de quitosano que contienen extracto de plantas, en este caso *S. edule*, sobre las células del linaje HeLa. No se detectó que el quitosano afectara la actividad antiproliferativa del extracto; las nanopartículas cargadas con extracto mostraron una inhibición celular IC_{50} de 8 $\mu\text{g/mL}$ (Salazar et al. 2022).

3. JUSTIFICACIÓN

Tomando en cuenta que el cáncer sigue siendo un problema a nivel mundial y que representa el riesgo de convertirse en una de las principales causas de muerte incluso con la existencia de tratamientos farmacológicos. Además, los pacientes que han sobrevivido al cáncer sufren durante y después del tratamiento diversos efectos adversos graves. Por otro lado, los pacientes con recuperación completa, al tener una recaída, suelen existir una resistencia de las células tumorales al tratamiento convencional, lo que representa una respuesta deficiente al tratamiento, y conlleva a cambiar las dosis administradas en el tratamiento u otras opciones. Por todo ello, se deben valorar alternativas que conlleven a un tratamiento eficaz.

La medicina herbolaria, ha sido empleada mundialmente en diversas comunidades como alternativa a la medicina alopática, debido a factores como bajo costo, la disponibilidad de recursos y su aplicación para tratar diversas enfermedades. México cuenta con varias especies vegetales, las cuáles contienen componentes que poseen actividades biológicas que suelen beneficiar a los humanos, a estas biomoléculas secundarias se les confieren propiedades como lo son: antioxidantes, antibacterianas, antiinflamatorias, antitumoral, entre otras. La presente investigación, considera el estudio de dos vegetales para evaluar su efecto citotóxico, tanto del fruto y semilla de *Sechium edule* var. *nigrum spinosum* y las hojas, flores y tallos de *V.greggii*, ya que antecedentes reportan que en estos órganos se encuentran compuestos a los que atribuyen propiedades anticancerígenas.

Por otro lado, los nanomateriales han despertado el interés en diferentes áreas de la medicina para la mejora de tratamientos convencionales y para el estudio de nuevos fármacos a base de plantas, además transportar moléculas naturales, protegiendo el principio activo durante su trayecto hacia las células diana. Se espera encontrar actividad citotóxica por parte de los extractos y potenciarla con su nanoencapsulación, contribuyendo de esta manera al conocimiento de nuevas alternativas para combatir el cáncer de cuello uterino.

4. HIPÓTESIS

Los extractos de *Sechium edule* (Jacq.)(Swartz) var.*nigrum spinosum* o *Vernonia greggii* presentan mayor actividad antineoplásica sobre células tumorales humanas cuando están incorporados en nanopartículas poliméricas biodegradables.

5. OBJETIVO DEL TRABAJO

5.1. Objetivo general

Determinar la actividad citotóxica de nanopartículas cargadas con extracto metanólico de *Sechium edule* (Jacq.)(Swartz) var. *nigrum spinosum* o *Vernonia greggii* sobre los linajes celulares HaCat (Queratinocitos epidérmicos humanos) y HeLa (cáncer de cuello uterino humano)

5.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar los extractos metanólicos de *S. edule* y *V.greggii*.
2. Estandarizar la técnica de nanoencapsulamiento para el extracto metanólico de *S. edule* y *V.greggii*.
3. Caracterización de las nanopartículas poliméricas.
4. Evaluar la citotoxicidad sobre los linajes celulares de HaCat y HeLa

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Material vegetal y procedencia

El fruto de *Sechium edule* (Jacq.)(Swartz) var *nigrum spinosum* debido a que es comestible, se adquirió en un mercado local ubicado en el centro de la ciudad de Monterrey, NL, el proveedor informó que proviene de San Luis Potosí, México. Por otro lado, *Vernonia greggii* fue recolectada en la Sierra Madre Oriental, N.L, México (25°22'00"N 100°33'00"O / 25.36666667, -100.55) en Enero 2023, y fue almacenada en el Herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, cuyo voucher de identificación es No. 25590.

6.2. Reactivos y químicos

Todos los solventes adquiridos fueron de grado analítico. Acetona, Advanced DMEM 1X, Agua Destilada, Antibiótico-Antimicótico 100x, Dimetilsulfóxido (DMSO), Isopropanol, L-Glutamina 200 mM, Metanol (MeOH), n-Hexano, PBS 1X, Suero Fetal Bovino (SFB) inactivado 4 % v/v (CTR Scientific ®), Resomer ®RG 756 s Poly (D,L-Lactico-co-glicólico) Mw 75,000 ~115,000 (PLGA 75:25), Azul de tiazolil Bromuro de tetrazolio (MTT) 98% Sigma-Aldrich ® (Merck KGaA, Darmstadt,Germany), nonidet-P40 (NP40).

6.3. Preparación del extracto

En cuanto el extracto metanólico del chayote, fueron removidas las espinas y la cáscara, y fue cortado en piezas pequeñas, provenientes del fruto y semilla. Se llevó a un horno de secado a 45°C durante 5 días, hasta notar que los fragmentos fueron deshidratados; posteriormente se trituraron hasta obtener un polvo fino, esto para permitir una amplia difusión del solvente entre los restos del fruto y tomar la mayor cantidad posible de sus compuestos. Obteniendo 43g de materia vegetal.

El polvo obtenido del material vegetal se distribuyó como 20 g del fruto en 100 mL de metanol 99% (MeOH) y durante 2 días a temperatura ambiente, con agitación de 30 RPM x min, el solvente se filtró y cambió 2 veces al día cada 4 h, esto debido a que el solvente después de cierto tiempo pierde su efectividad para extraer los compuestos

activos de la fruta, hasta que el producto macerado no presentó color. Posteriormente, se separó el extracto del solvente en el rotavapor (Heidolph, Laborota 4003) a 28 °C, 100 RPM bajo presión reducida. Para el extracto metanólico de *V.greggii* se utilizaron las hojas, tallos y flores de la planta, una vez recolectada la planta, se prensó con el propósito de desecar la planta y posteriormente triturarla para llevarse a maceración, la extracción se realizó con 93 g de *V.greggii* con las mismas condiciones para el método de maceración utilizado previamente con el chayote con espinas. Ambos extractos se secaron a 30°C durante dos días, posterior a esto, fueron almacenados en refrigeración hasta su uso. El rendimiento del extracto se obtuvo con la fórmula a continuación, basado en la fórmula utilizada por Treviño- Garza et al. 2023:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} \times 100$$

6.4.Elaboración de nanopartículas PLGA

Debido a que el extracto metanólico de *S.edule* y *V.greggii* resultaron no ser solubles en agua, se optó por el método de Nanoprecipitación, que por medio de la inyección de una fase orgánica en una acuosa, sin necesitar tensoactivo, permite la obtención de nanopartículas hechas del polímero PLGA, la metodología fue basada en lo reportado por (Chávez- Montes et al. 2022), con modificaciones en las condiciones utilizadas para las fases orgánica y acuosa.

Para preparar la fase orgánica, se pesaron en una balanza analítica 12 mg del extracto metanólico de *Sechium edule*, disuelto en 1 mL de MeOH, 60 mg de PLGA disuelto en 10 mL de Acetona, posteriormente ambos polímero y extracto fueron homogeneizados y la solución de la fase orgánica se inyectó en la fase acuosa (12 mL agua destilada). Para *V.greggii*, los 12 mg de extracto fueron disueltos en 2 mL de Acetona, fue filtrado e incorporado a la fase orgánica y posteriormente su inyección a la fase acuosa (12 mL agua destilada). Para ambos extractos, una vez unidas ambas fases, se llevaron al rotavapor Laborota 4003 (Heidolph Instruments GmbH & Co.KG), para eliminar el solvente de la

formulación de nanopartículas por 10 min, 100 RPM, a 30°C. Posteriormente se tomaron 8 gotas del lote de nanopartículas cargadas, fueron suspendidas en agua destilada en una celda para ser leídas en el Zeta-sizer Nano-Zs90 reader (Malvern, Worcestershire, UK), donde se obtuvo el promedio del tamaño de las nanopartículas (Size- Average), en nanómetros (nm) y el índice de polidispersidad (PDI) así como el potencial Z.

6.4.1. Caracterización de nanopartículas

Como parte de la caracterización de las nanopartículas, se tomaron en cuenta los valores del Índice de polidispersidad (PDI) el cual nos indica la no uniformidad del tamaño de partículas dentro de una muestra. El rango del PDI va de 0.0 (una muestra perfectamente uniforme respecto al tamaño de la partícula), hasta 1.0 (alto nivel de polidispersidad con poblaciones con múltiples tamaños de partículas), siendo los valores de 0.2 e inferiores los más comunes y aceptables para las nanopartículas a base de polímeros (Danaei et al. 2018). Además de obtener el potencial Z, se mide el potencial electrostático que se encuentra en la doble capa eléctrica que rodea a la nanopartícula suspendida en solución. Aquellas nanopartículas que tengan un potencial z de entre -10 y + 10 mV serán consideradas como “neutras”; por otro lado, las nanopartículas con potencial z cuyo valor sea superior a +30 mV o inferior a -30 mV serán consideradas respectivamente como “fuertemente catiónicas” o “fuertemente aniónicas”. Las nanopartículas catiónicas por lo general presentan cierta toxicidad asociada con la ruptura de la pared celular (Clogston y Patri 2011).

Una vez obtenidas las nanopartículas, se midió el volumen conocido del lote de nanopartículas, se centrifugó 2 a 3 mL del lote de nanopartículas a 4°C, 25,000 RPM, durante 3 h en Allegra™ 64R Centrifuge, se obtuvo un sedimento conocido como “pellet” que constituye el extracto y polímero (masa) y sobrenadante, el cual fue utilizado para encontrar los porcentajes de ee % y dl % previamente mencionados, **Figura 1**.

La obtención del porcentaje de encapsulación (ee %) nos permitió a determinar la eficacia de nuestro método para la elaboración de nanopartículas y de carga (dl %), que permitió determinar la masa del extracto por masa de nanopartículas, se determinó la cantidad de extracto encapsulada de toda la masa del lote de nanopartículas. Para la

obtención de estos valores se usaron las siguientes fórmulas basadas en lo realizado por Elizondo- Luevano et al. 2023 como parte de la caracterización de las nanopartículas poliméricas.

Fórmula utilizada para determinar ee %:

$$Y = mx + b$$

$$ee\% = \frac{\text{Masa total del extracto}}{\text{Masa del extracto encapsulado}} \times 100$$

Fórmula utilizada para determinar dl %:

$$dl\% = \frac{\text{Masa total del lote de nanopartículas}}{\text{Masa del extracto encapsulado}} \times 100$$



Figura 1.- Elaboración de nanopartículas cargadas del extracto metanólico de *Sechium edule*

6.5. Cromatografía líquida de alto rendimiento- espectrometría acoplado a masas (HPLC-MS).

Esta técnica se usa para separar e identificar compuestos similares estructuralmente, y la espectrometría de masas es una herramienta cualitativa (Li et al. 2011).

La sensibilidad de esta técnica permite analizar fármacos anticancerígenos y sus metabolitos, además de brindar información estructural que complementa los resultados obtenidos con otros sistemas para detección, como cromatografías líquidas que usan luz ultravioleta, fluorescente, y detección electroquímica, que, aunque sensibles, carecen de especificidad. Para éste estudio, se utilizó un cromatógrafo de líquidos Alliance 2695 (Waters), el cual cuenta con desgasificador en línea, bomba cuaternaria, automuestreador, horno de microondas y detector UV-Vis de arreglo de diodos. La separación cromatográfica se realizó con una columna Discovery HS F5 (15 cm x 2.1 mm; 3.1 μ m; Supelco), empleando como fase móvil se usó ácido fórmico 0.1 % v/v y acetonitrilo conteniendo ácido fórmico al 0.1 % v/v a un flujo de 0.2 mL/ min. El gradiente de elución inició con 10 % de acetonitrilo acidificado, manteniendo 5 min y elevando a 70 % en 15 min, manteniendo 10 min y regresando al 10 % inicial en 5 min. La columna se mantuvo a 45 °C, y el volumen de inyección fue de 3 μ L. La detección se realizó de 200 a 600 nm.

Además, se realizaron análisis por cromatografía líquida- espectrometría de masas, para lo cual se empleó un cromatógrafo de líquidos de ultra alta eficiencia (UHPLC) Ultimate 3000 (Thermo Scientific Dionex) equipado con desgasificador en línea, bomba cuaternaria, automuestreador, horno de columna y detector UV-Vis, de longitud de onda variable, acoplado a un espectrómetro de masas (MS) LCQ Fleet (Thermo Scientific) que cuenta con analizador de trampa de iones. La detección se realizó por UV a 254 nm y por espectrometría de masas con una fuente de ionización de electrospray en modo positivo y negativo. La temperatura del capilar se mantuvo a 275 °C, el voltaje del capilar a 1.01 V, el tubo de lentes a 109.88 V, el gas de nebulización a 45 unidades y el auxiliar a 15. La adquisición de MS se realizó en modo de barrido completo (full scan) de m/z 100 a 2000 y también se realizaron experimentos de MS/MS para los iones más abundantes.

6.6. Ensayos de viabilidad celular

6.6.1. Ensayo de citotoxicidad con MTT

Una vez obtenidas los tratamientos de *Sechium edule* y de *V.greggii* estando libres y nanoparticulados, fueron probados sobre los linajes celulares HaCat y HeLa.

Se realizó una solución madre a una concentración 10 mg/mL, se pesaron 10 mg del extracto crudo en un tubo eppendorf, se diluyeron en 50 µl de dimetil sulfóxido (DMSO), y se homogeneizó en 950 µl de medio de cultivo, para tener una concentración de DMSO del 5%.

A partir de la solución madre, se trabajó a concentraciones de 10, 50, 100, 300 y 500 µg/mL.

Para este ensayo se incubaron 7×10^4 células en una placa de 96 pozos, durante 24 h para permitir su adhesión. Cumplidas las 24 h, al haber obtenido 80% de confluencia celular, se retiró el medio de cultivo, y sobre las células adheridas fueron aplicados los tratamientos del extracto metanólico libre y nanoencapsulado a 10, 50, 100, 300 y 500 µg/mL, y nuevamente se incubó de 24 a 48 h; 2 h antes de que termine el tiempo estimado, se tomaron micrografías para observar en el microscopio invertido algún efecto del tratamiento sobre la morfología celular. Al cumplirse el tiempo estimado se colocó una solución de 3 mg/mL de MTT [bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol- 2- il)- 2, 5- difeniltetrazolio] el cual es una sal de color amarillo, que se reduce a formazán mediante la actividad metabólica de las reductasas en la mitocondria de las células, observándose un color púrpura al momento de aplicar el revelador de MTT.

Después de 2 h se retiró el MTT para revelar con una solución de HCL 4mM, 0.40% NP40 e isopropanol con el fin de disolver los cristales de formazán generado por las células metabólicamente activas, durante 15 min con agitación constante a temperatura ambiente (TA). Posteriormente se leyó la microplaca a lectura a 590 nm, la absorbancia es proporcional a la cantidad de células que están metabólicamente activas, y es una medida indirecta de viabilidad celular. El porcentaje de viabilidad celular relativa fue basada, con modificaciones según el método utilizado según (Jiménez- Orozco et al. 2020)

donde el porcentaje de Viabilidad Celular relativa (VC%), es igual a la absorbancia de las células tratadas (ABS células tratadas) sobre la absorbancia de las células no tratadas (ABS células no tratadas) multiplicado por 100, **Figura 2.**

$$VC \% = \frac{ABS \text{ células tratadas}}{ABS \text{ células no tratadas}} \times 100$$

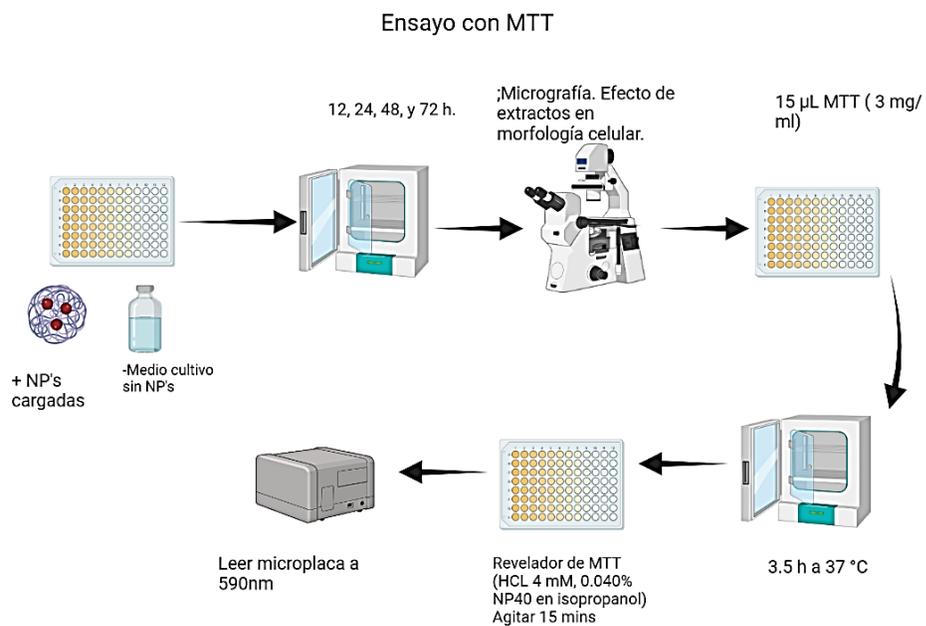


Figura 2.- Diagrama de ensayo con MTT

6.6.2. Ensayo de contraste de núcleos con DAPI

Los cultivos celulares fueron realizados en las placas de 96 pozos en las mismas condiciones y tratamientos del ensayo de MTT. Después de pasadas 24 h aplicado el tratamiento, se retiró el medio de cultivo, después se hicieron 2 lavados de 200 μ L de PBS 1x, posterior a esto, las células se fijaron con metanol/acetona relación 1:1 por 20 min a 4 °C; nuevamente se realizaron 2 lavados con PBS 1x, subsecuentemente se agregaron 70 μ L de DAPI (100 mg/mL) durante 15 min a temperatura ambiente en total oscuridad, finalmente se retiró el exceso de DAPI y se observó en el microscopio. Las fotografías fueron analizadas en el Software Image J v 1.51; en este ensayo la función del colorante fluorescente DAPI (4,6- diamidino- 2- fenilindol) se une a los ácidos nucleicos de las células adheridas, estimando así un porcentaje de células viables. **Figura 3.**

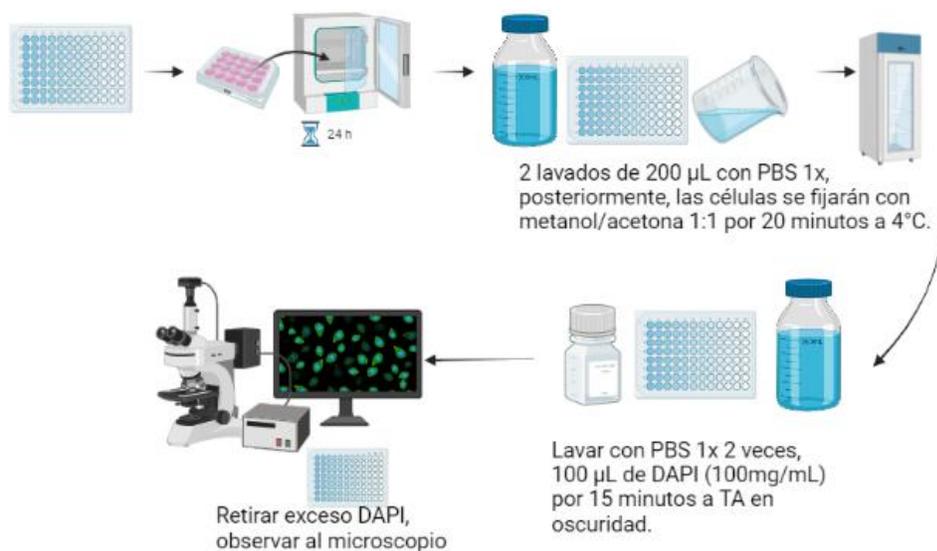


Figura 3.- Diagrama de ensayo de contraste de núcleos con DAPI.

6.7. Actividad hemolítica

Se obtuvieron 30 mL de sangre de un voluntario sano en tubos con anticoagulante (K2 EDTA) (BD Vacutainer®; Becton Dickinson & Company, Franklin Lakes, NJ, USA). Los glóbulos rojos recuperados a partir de la sangre se lavaron tres veces con Buffer de Fosfatos Salino (PBS pH 7.0) y se preparó una suspensión de eritrocitos al 5% en PBS estéril. Para la evaluación de la actividad hemolítica en tubos de 2 mL se agregaron las concentraciones de los extractos a evaluar (100 - 1,000 μ g/mL) y se adicionó la suspensión

al 5% de eritrocitos humanos (Elizondo-Luévano et al. 2021). Como control positivo de hemólisis se utilizó agua destilada y como control negativo PBS. Las muestras se incubaron por 30 min a 37 °C y posteriormente se centrifugaron a 4 °C durante 5 min a 13,000 rpm. Después de esto, se tomaron 200 µL del sobrenadante de cada tubo y se pasaron a una microplaca de 96 pozos de fondo plano para medir la densidad óptica (DO) de la hemoglobina liberada a 550 nm en un lector de microplacas. El porcentaje de hemólisis para cada muestra se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{DO_{550} \text{ Tratamiento} - DO_{550} \text{ Control negativo}}{DO_{550} \text{ Control Positivo} - DO_{550} \text{ Control negativo}} \times 100$$

6.8. Consentimiento ético

El estudio con eritrocitos humanos se realizó bajo la aprobación del comité de ética de la UANL, FCB (Número de Registro CI-08-2020) y bajo el consentimiento de donantes sanos (Se adjunta como material complementario la Carta de Consentimiento Informado para donantes de material de muestra biológica humana y la Aprobación de la Junta de Revisión Institucional), siguiendo lo establecido en la Norma Técnica Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012. No se realizaron estudios con animales.

7. DISEÑO EXPERIMENTAL

Los resultados fueron procesados mediante un análisis de varianza (ANOVA) con comparación de medias de Dunnett y Tukey con intervalo de confianza del 0.05 (95 %) en el paquete estadístico Graph Pad Prism 9. Los valores de IC₅₀ fueron obtenidos mediante AAT Bioquest, Inc. (2024, 15 de febrero). *Calculadora Quest Graph*™ IC₅₀. Bioquest de AAT. <https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>

8. RESULTADOS

8.1. Rendimientos y perfil fitoquímico preliminar del extracto de *Sechium edule* y *Vernonia greggii*.

El rendimiento obtenido del extracto metanólico de *S.edule* por medio del método de maceración fue de 35.18 % *p/p*. Posteriormente se obtuvo el rendimiento de la fracción de acetato de etilo del extracto metanólico de *S.edule*, el cual fue de 0.16 % *p/p*, el porcentaje de esa fracción presente en el extracto crudo fue de 0.45 % *p/p*. Los cuales mostraron un color verde oscuro y marrón oscuro respectivamente. Mientras que para *V.greggii* los rendimientos obtenidos mediante maceración del extracto metanólico crudo, y sus fracciones hexánica y acuosa fueron 17.98 % *p/p*, 0.06 % *p/p* y 2.99% *p/p*; así mismo, el porcentaje de esas fracciones presentes en el extracto metanólico crudo son 0.34 % *p/p* de fracción hexánica en extracto crudo, y 16.6 % *p/p* de fracción acuosa presente en extracto crudo, **Tabla 4**.

Tabla 4. Rendimiento de extracto y fracciones.

Vegetal	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Me-S.e % <i>p/p</i>	Me-V.g % <i>p/p</i>	F-Me % <i>p/p</i>	F-He % <i>p/p</i>	F-Ac. % <i>p/p</i>
<i>V. greggii</i>	93.15	16.75	-	17.98	5.92	0.06	2.99
<i>S. edule</i> var. <i>nigrum</i> <i>spinosum</i>	67.23	23.79	35.18	-	-	-	-

Extracto metanólico de *Sechium edule* (Me-S.e), Extracto metanólico de *Vernonia greggii* (Me-V.g), Fracción metanólica de *Vernonia greggii* (F-Me), Fracción de hexano (F-He) y Fracción acuosa (F-Ac).

8.2. Perfil fitoquímico preliminar y su caracterización mediante HPLC-MS

Como se muestra en la **Tabla 5**, los componentes presentes en el extracto metanólico de *S.edule* fueron esteroides y triterpenos, cumarinas, sesquiterpenolactonas, quinonas, y carbohidratos.

Por otro lado, las pruebas colorimétricas que se realizaron sobre el extracto metanólico crudo de *V. greggii*, muestran que hay una amplia gama de activos biológicos, entre los que destacan principalmente los flavonoides, esteroides y triterpenos, sesquiterpenolactonas, taninos, carbohidratos y cumarinas.

Tabla 5. Pruebas fitoquímicas preliminares de *S.edule* y *V.greggii*

Prueba	Grupo Químico	Me-				
		<i>S.e</i>	Me- <i>V.g</i>	F-Me	F-He	F-Ac
LIEBERMANN-BURCHARD	ESTEROLES, TRITERPENOS	++	++	++	+	-
NaOH	CUMARINAS	++	+	++	++	+++
BALJET	SESQUITERPENLACTONAS	++	++	+++	-	++
ÁCIDO SULFÚRICO	QUINONAS	+++	-	-	-	+++
SAPONINAS	SAPONINAS	-	-	-	-	-
SHINODA	FLAVONOIDES	-	+++	-	-	+++
COLORURO FÉRRICO	TANINOS	-	++	+++	-	+++
ANTRONA	CARBOHIDRATOS	+++	++	+++	+	+++
DRAGENDORFF	ALCALOIDES	-	-	-	-	-

Respuesta negativa (-); Respuesta ligeramente positiva (+); Respuesta positiva (++); Respuesta altamente positiva (+++). Me-*S.e*; Me-*V.g*; F-Me; F-He; F-Ac de *Vernonia greggii*.

Los extractos fueron sometidos a análisis por cromatografía de líquidos utilizando un detector UV-Vis de las señales cromatográficas, y, a cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas que además de proporcionar la relación masa carga (m/z) de los iones presentes, permitió realizar experimentos de fragmentación. A modo de ejemplo en la **figura 4** se presenta el cromatograma obtenido por UHPLC-UV-MS para F-Me y en la **figura 5** se muestran el espectro de masas correspondiente a las señales cromatográficas obtenidas cromatográficas observadas.

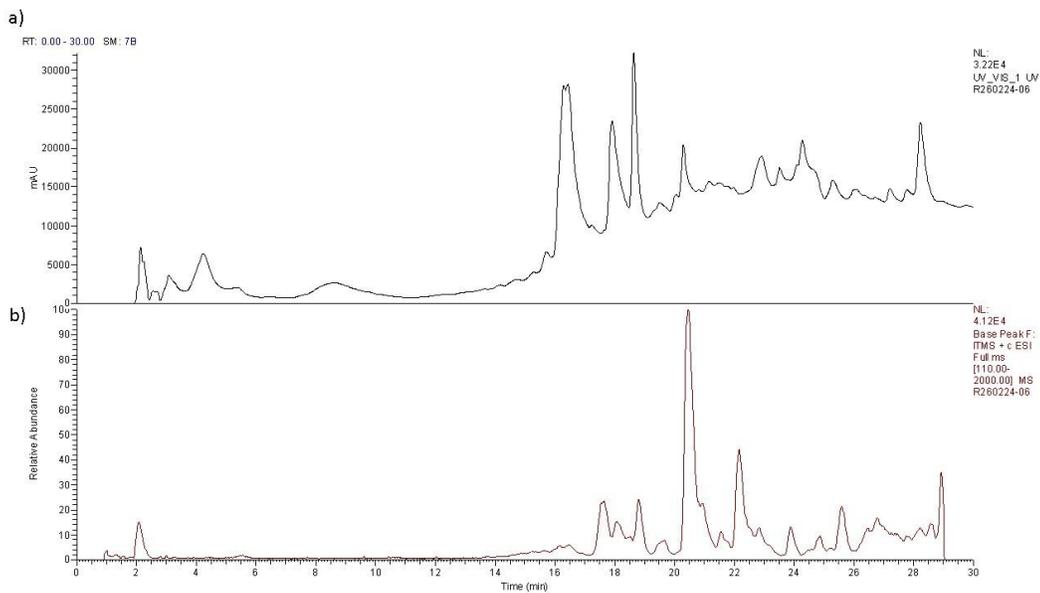


Figura 4. Comatograma obtenido para F-Me con el método descrito en la sección 6.5. a) Detección UV 254 nm, b) MS, full scan, 100-2000 m/z.

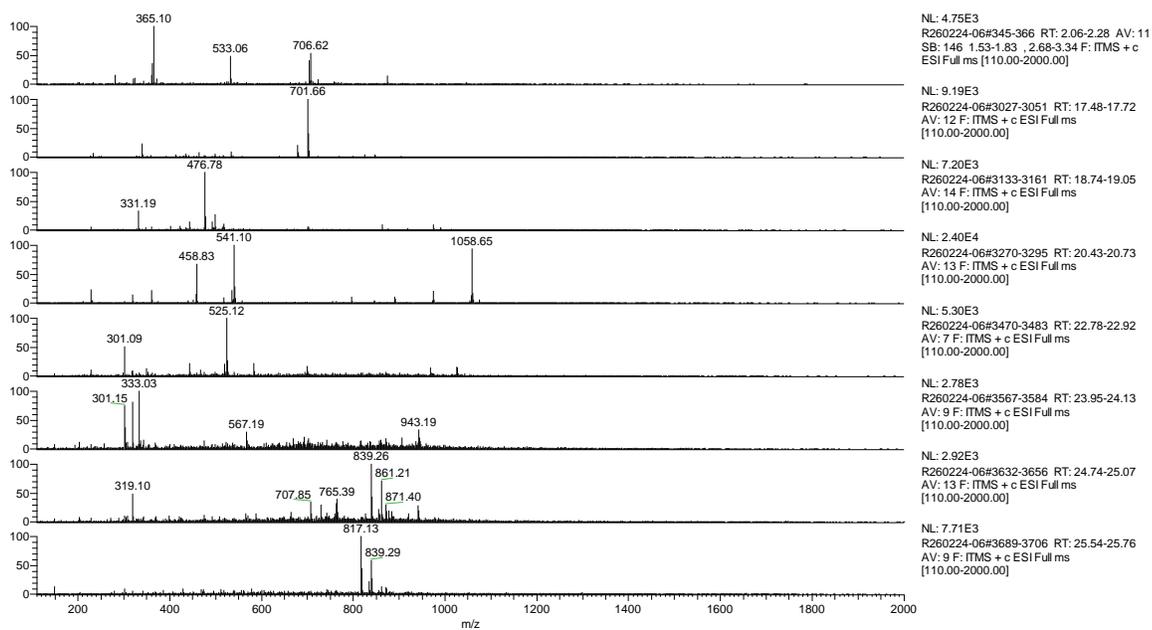


Figura 5. Espectros de masas obtenidos para las señales cromatográficas de F-Me que se observan en la figura 4b.

8.3. Curva de calibración de *S.edule* y *V.greggii*

Para determinar la concentración de una sustancia, la cuál se relaciona con la longitud de onda máxima ($\lambda_{\text{máx}}$), donde obtenemos una señal (ABS). La $\lambda_{\text{máx}}$ del extracto metanólico crudo (Me-*S.e*) fue de 212 nm donde se obtuvo una señal de 0.767 ABS, a 300 $\mu\text{g/mL}$. A partir de estos datos, se realizó una curva de calibración a 150, 180, 210, 240 y 270 $\mu\text{g/mL}$, obteniendo una recta lineal, y una $R^2 = 0.9988$.

$$Y = mx + b$$

$$Y = 0.0023x + 0.0039$$

Dicha ecuación fue utilizada para obtener los porcentajes de encapsulación (ee%) y carga (dl %). Al realizar las NP-ME-*S.e* 12/60, por método de nanoprecipitación resultó tener un 78 % de eficacia de encapsulación, y un 13.49 % de carga de Me-*S.e*; estos datos pudieron procesarse mediante la obtención de la señal de $y = 0.336$ (eliminando la interferencia de la señal del polímero), al colocar este dato en la ecuación se pudo encontrar la concentración en la que ME-*S.e* se encontraba libre. **Tabla 6.**

Tabla 6. Caracterización física de las nanopartículas

Formula	Tamaño (nm)	Índice de polidispersidad (PDI)	Potencial ζ (mV)	Eficacia de encapsulación (ee%)	Porcentaje de carga (dl %)
NP-Me- <i>S.e</i> 12/60	157.6 \pm 2.050	0.117 \pm 0.040	- 17.4 \pm 1.13	78	13.49
PLGA NPs	145.9 \pm 0.9504	0.080 \pm 0.020	- 19.1 \pm 1.37	-	-

Caracterización de las nanopartículas cargadas de extracto metanólico (NP-Me-*S.e* 12/60), y nanopartículas sin carga (NPs BLANCO). En cuanto tamaño en nm, índice de polidispersidad (PDI), densidad de carga superficial, Potencial ζ (mV), además de la eficiencia de encapsulación (ee%) y su porcentaje de carga (dl %) del activo; la desviación estándar está marcada como \pm .

La $\lambda_{\text{máx}}$ del extracto metanólico de *V.greggii* fue a 329 nm donde se obtuvo una señal de 0.654 ABS de solución a 300 $\mu\text{g/mL}$, con estos datos, se decidió hacer una curva de calibración de 30 a 150 $\mu\text{g/mL}$. Posteriormente se realizó un barrido a una solución de 200 $\mu\text{g/mL}$ F-Me donde $\lambda_{\text{máx}}$ fue 363 nm con una señal de 0.744 ABS y posterior curva de calibración obteniendo un R^2 0.9983, obteniendo la siguiente ecuación:

$$Y=mx+b$$

$$Y=0.0024x+0.0259$$

8.4. Efecto citotóxico de *S.edule var.nigrum spinosum* y *V.greggii*

Para evaluar el efecto citotóxico de *S.edule*, se decidió trabajar en un rango de concentración de 500 a 700 $\mu\text{g/mL}$ Me-*S.e* libre y nanoencapsulado. Se encontró que el extracto metanólico crudo no demostró citotoxicidad sobre HeLa a las 24 h aplicado el tratamiento. Por lo cual se decidió elevar la concentración evaluada de 4000 a 8000 $\mu\text{g/mL}$ donde a partir de 4000 $\mu\text{g/mL}$ reduce significativamente la viabilidad celular (VC) y es a 5000 $\mu\text{g/mL}$ que reduce VC a 50.54 % en HeLa. Posteriormente, se probó el lote de nanopartículas poliméricas con Me-*S.e* 12/60, además del control negativo de

nanopartículas blanco PLGA NPs, se observó que a partir de 650 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se redujo la VC a 31.40 % y 37.47 % respectivamente habiendo significancia entre los efectos ya mencionados respecto al Me-*S.e* libre a la misma concentración, **Figura 6**.

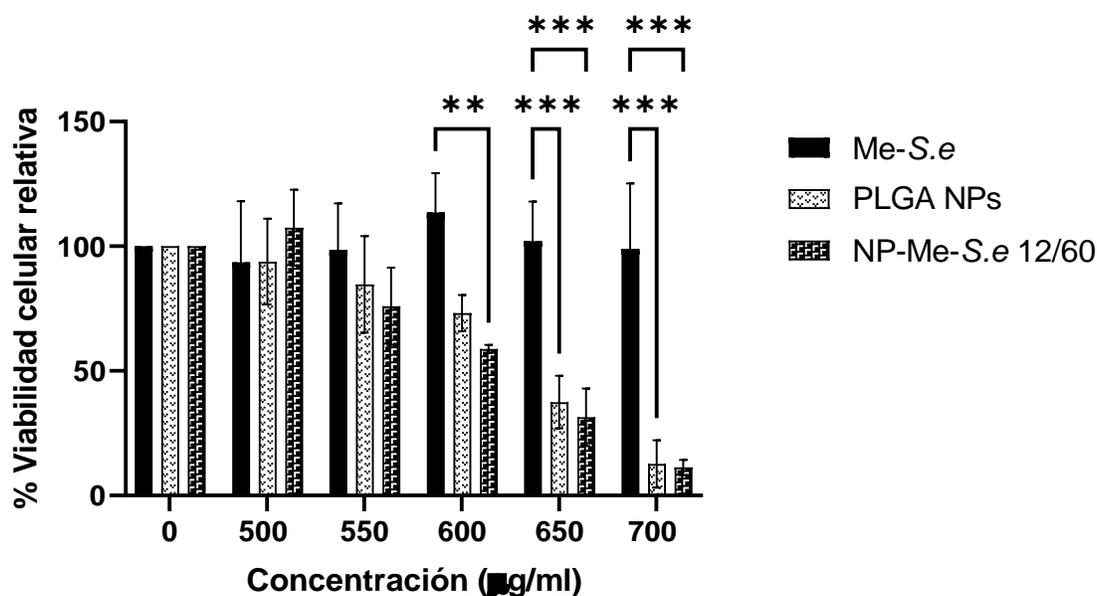


Figura 6. Ensayo de MTT sobre HeLa. Se observa el efecto citotóxico de Me- *S.e*, PLGA- NPs y NP-Me-*S.e* 12/60 (500, 550, 600, 650 y 700 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y el control negativo (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$), a las 24 h. Se realizó ANOVA con una comparación de medias de Tukey, $*p < 0.05$.

Se realizó el ensayo de MTT para determinar a qué concentración las fracciones de *V.greggii* disminuyen la viabilidad celular relativa (VC); esperándose que las células activas reduzcan la sal de tetrazolio a formazán. Los resultados se obtuvieron a las 24 h, la **figura 7**, representa el efecto citotóxico de Me-*V.g* de 100 a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sobre las células tumorales (HeLa) donde a partir de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ disminuye VC a 61.27%, hasta el momento no se ha encontrado antecedentes sobre la actividad anticancerígena de *V.greggii*. Se priorizó a las células HeLa para la evaluación del efecto de Me-*V.g*, por lo que no hay datos disponibles sobre HaCat. Posteriormente, se examinó el efecto de las fracciones, F-Me, demostró citotoxicidad a partir de 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 49.17 y 45.75 % VC para HeLa y HaCat, **figura 8**; a partir de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 57 y 59 % VC en HaCat y HeLa con F-He. Y a 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con 54 y 29 % VC de HaCat y HeLa la F-Ac, **figura 9**.

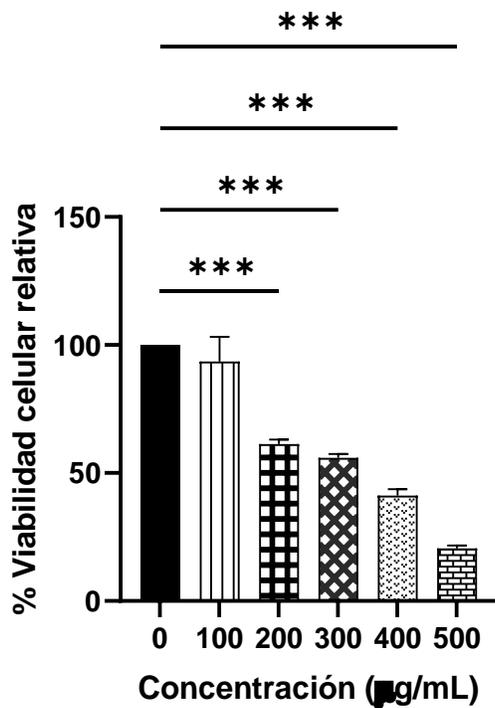


Figura 7. Ensayo de MTT sobre HeLa. Se observa el efecto citotóxico de Me-V.g libre (100, 200, 300, 400 y 500 µg/mL) y el control negativo (0 µg/mL), a las 24 h. Se realizó ANOVA con una comparación de medias de Dunnet, * $p < 0.05$.

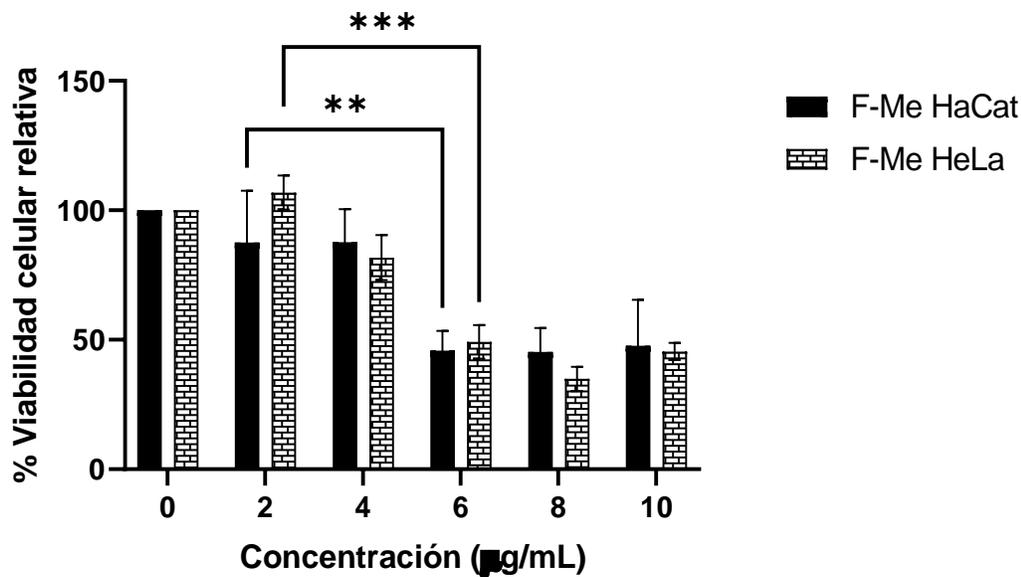


Figura 8. Ensayo de MTT sobre células HaCat y HeLa. Se observa el efecto citotóxico de F-Me libre (2, 4,

6, 8 10 $\mu\text{g/mL}$) y el control negativo (0 $\mu\text{g/mL}$), a las 24 h. Se realizó ANOVA con una comparación de medias de Tukey, $*p < 0.05$.

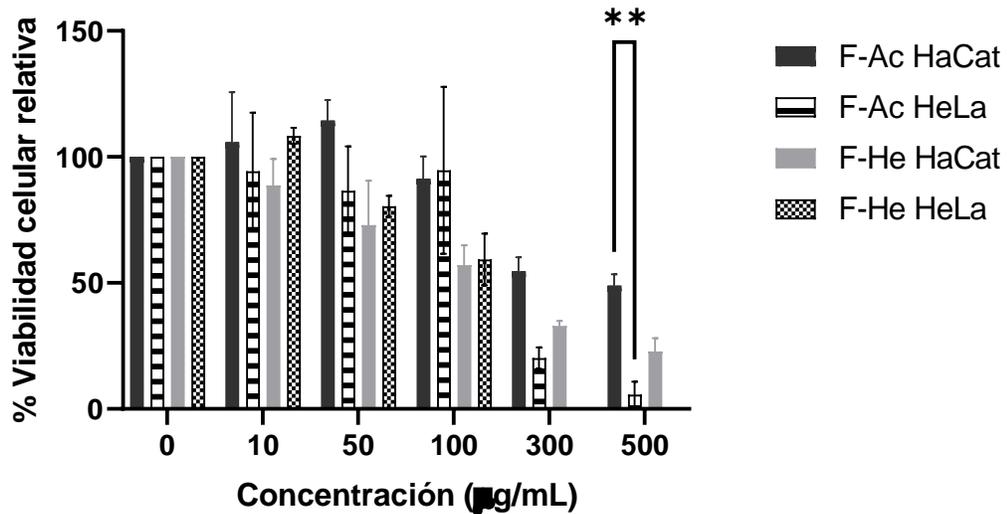


Figura 9. Ensayo de MTT sobre células HaCat y HeLa. Se observa el efecto citotóxico de F-Ac y F-He libres (10, 50, 100, 300, 500 $\mu\text{g/mL}$) y el control negativo (0 $\mu\text{g/mL}$), a las 24 h. Se realizó ANOVA con una comparación de medias de Tukey, $*p < 0.05$.

En base a los resultados anteriores, se decidió nanoencapsular la fracción metanólica que tuvo un mayor efecto a baja concentración. Las características físicas de las nanopartículas de PLGA 75:25 son descritas en la **Tabla 7**; donde el tamaño NPs-FMe 12/60 fue de 146.9 ± 1.159 , son homogéneas, PDI 0.103 ± 0.010 , potencial ζ -23.3 ± 8.4 mV, mientras que el procedimiento de nanoprecipitación fue efectivo para encapsular un 64.21 (ee %) y tener una carga de NPs-FMe 12/60 de 11.38 (dl %).

Tabla 7. Caracterización física de las nanopartículas de F-Me

Formulación	Tamaño (nm)	Índice de polidispersidad (PDI)	Potencial ζ (mV)	Eficacia de encapsulación (ee%)	Porcentaje de carga (dl %)

NPs-FMe 12/60	146.9 ± 1.159	0.103± 0.010	- 23.3 ± 8.4	64.21	11.38
PLGA NPs	141.1 ± 0.8145	0.096± 0.013	- 20.2 ± 9.82	-	-

Caracterización de las nanopartículas cargadas de fracción metanólica (NPs-FMe 12/60), y nanopartículas sin carga (PLGA NPs). En cuanto tamaño en nanómetros (nm), índice de polidispersidad (PDI), densidad de carga superficial, Potencial ζ (mV), además de la eficiencia de encapsulación (ee%) y su porcentaje de carga (dl %) del activo; la desviación estándar está marcada como \pm .

Mediante microscopía óptica, antes de colocar la solución de MTT en las células HaCat y HeLa, se encontraron indicios de cambios morfológicos a partir de 300 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 24 h, por parte de NPs-FMe; la morfología de las células HeLa tiene aspecto más redondo, se deduce que esto afecta la adhesión y por ende disminuye la confluencia celular, **Figura 10**.

El tratamiento NPs-FMe 12/60, tiene un comportamiento dependiente de la dosis, acentuando citotoxicidad en las dosis 300 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, disminuyeron la viabilidad celular en las células HeLa a un 51.20, y 20.48 % en sus respectivas dosis; por otro lado, el efecto fue similar con las células HaCat, con una viabilidad relativa del 47.01 y 22.58 % a 300 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente, además de que su efecto difiere significativamente al de las PLGA NPs (nanopartículas sin carga), esto se puede apreciar en la **Figura 11**.

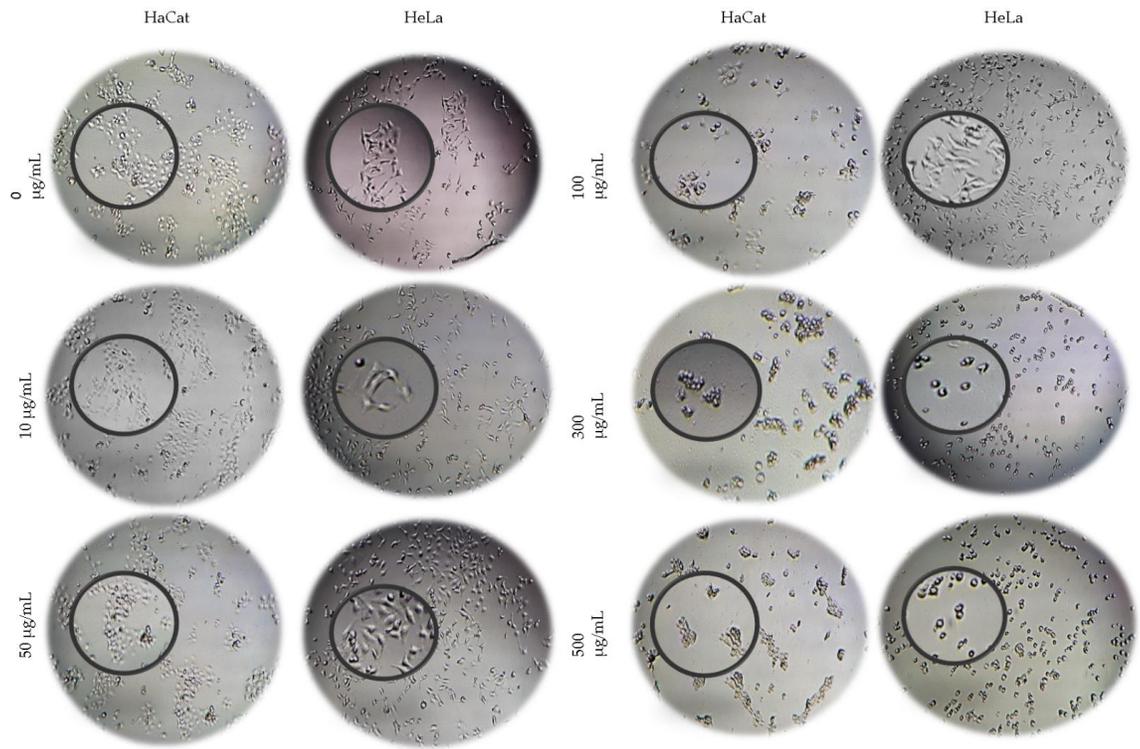


Figura 10. Micrografías aumento 4x, de las células HaCat y HeLa, expuestas durante 24 h con NPs-FMe 12/60 (10, 50, 100, 300 y 500 µg/mL) y el control negativo (0 µg/mL). La morfología de ambos linajes se percibió alterada en función a las dosis más altas (300 y 500 µg/mL)

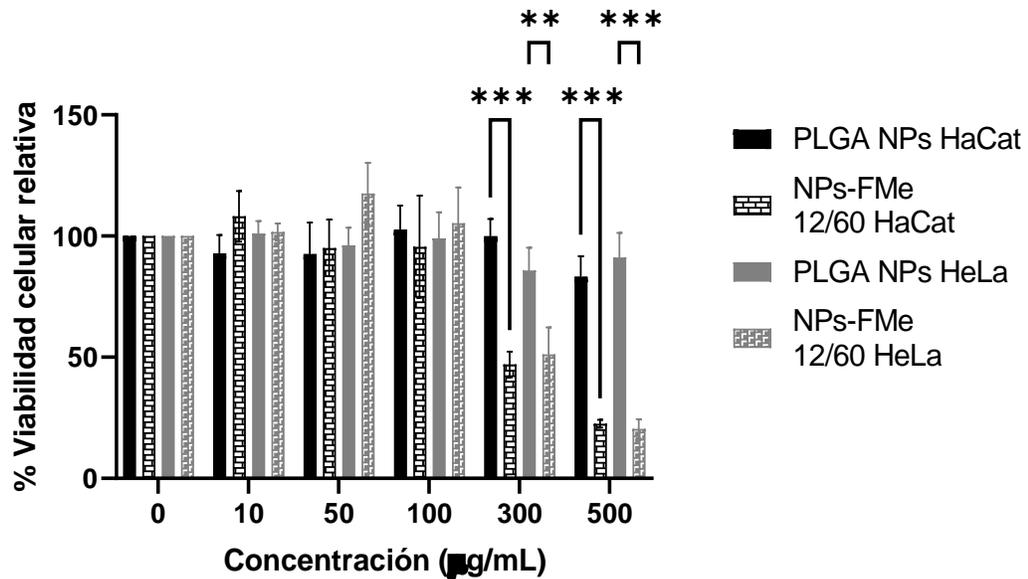


Figura 11. Ensayo de MTT sobre células HaCat y HeLa. Se observa el efecto citotóxico de los tratamientos: PLGA NPs (NPs sin carga) y NPs-FMe 12/60 (NPs con carga F-Me), ambos a 10, 50, 100, 300, 500 µg/mL y el control negativo (0 µg/mL), a las 24 h. Se realizó ANOVA con una comparación de medias de Tukey, $*p < 0.05$.

En base a los resultados ya expuestos, y debido a que se encontró diferencia significativa en el efecto citotóxico de los tratamientos, se decidió evaluar la viabilidad celular, que fue indirectamente proporcional al área de adhesión, se observó que F-Me a partir de 6 µg/mL redujo significativamente el porcentaje de área, mientras que para el tratamiento NPs-FMe 12/60, esta reducción se observó a partir de 300 µg/mL, esto a las 24 h, **Figura 12 y 13**.

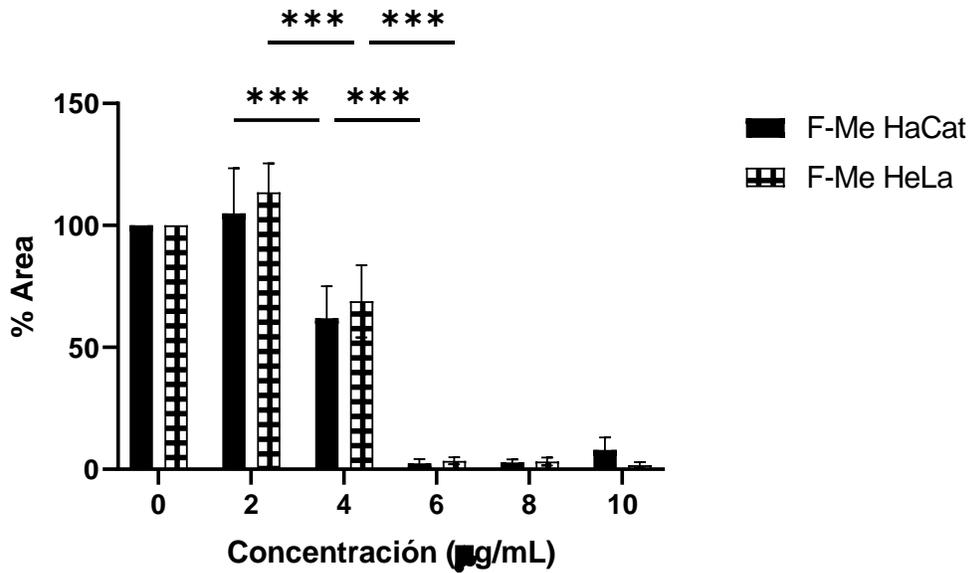


Figura 12. Ensayo de DAPI sobre células HaCat y HeLa. Se observa el porcentaje de área (% Area) de F-Me, en relación a la concentraciones 2, 4, 6, 8 y 10 µg/mL, comparado con el control negativo (0 µg/mL), a las 24 h. Se realizó ANOVA con una comparación de medias de Tukey, $*p < 0.05$.

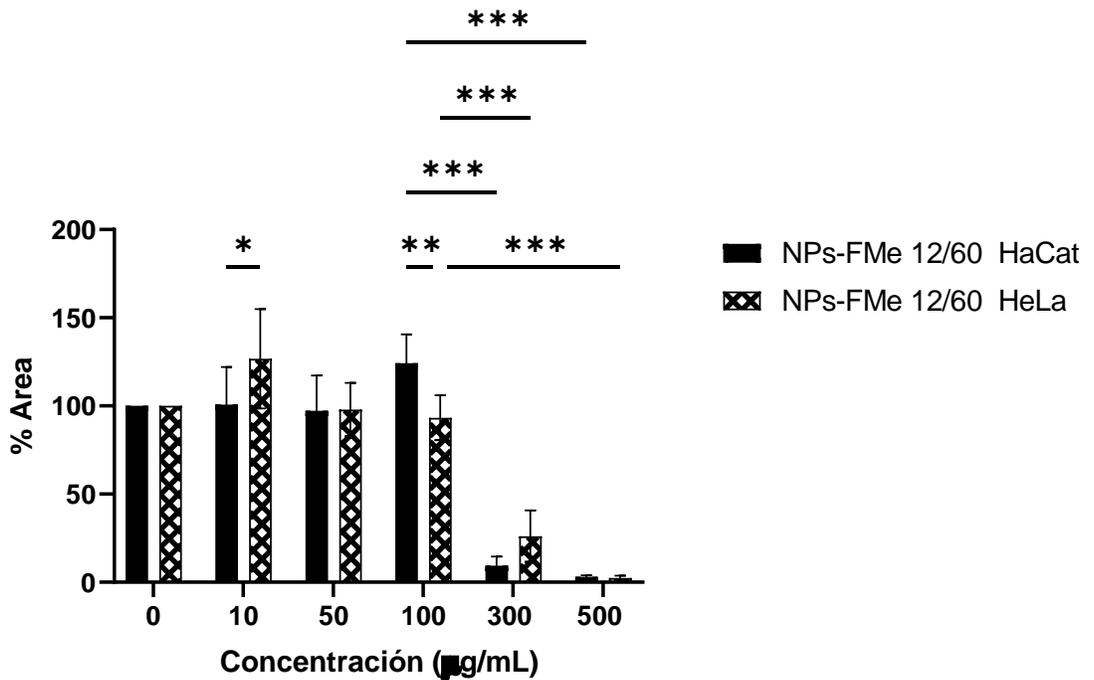


Figura 13. Ensayo de DAPI sobre células HaCat y HeLa. Se observa el porcentaje de área (% Area)

de NPs-FMe 12/60, en relación a la concentraciones 10, 50, 100, 300 y 500 $\mu\text{g/mL}$, comparado con el control negativo (0 $\mu\text{g/mL}$), a las 24 h. Se realizó ANOVA con una comparación de medias de Tukey, $*p < 0.05$.

Debido a que *V.greggii* tuvo mejor actividad citotóxica que *S.edule* sobre las células tumorales, en la **tabla 8**, se describen los IC_{50} de los tratamientos de *V.greggii* sobre HeLa, Me-*V.g* ($\text{IC}_{50} = 268.08 \mu\text{g/mL}$) este tratamiento fue probado sólo sobre las células tumorales; por otro lado, F-Me ($\text{IC}_{50} = 4.33 \mu\text{g/mL}$), F-Ac ($\text{IC}_{50} = 237.02 \mu\text{g/mL}$), F-He ($\text{IC}_{50} = 103.04 \mu\text{g/mL}$), NPS-FMe 12/60 ($\text{IC}_{50} = 289.94 \mu\text{g/mL}$). Mientras que a las células sanas, HaCat reportaron F-Me ($\text{IC}_{50} = 51.55 \mu\text{g/mL}$), F-Ac ($\text{IC}_{50} = 352.46 \mu\text{g/mL}$), F-He ($\text{IC}_{50} = 158.89 \mu\text{g/mL}$), NPs-FMe 12/60 ($\text{IC}_{50} = 274.05 \mu\text{g/mL}$); además, se obtuvieron los IC_{50} del control positivo (Doxorubicina) contra HaCat y HeLa siendo 0.13 y 2.02 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. En cuanto al SI, los valores reportados que son menores a tres, los tratamientos con *V.greggii* no tienen una alta selectividad hacia las células HeLa, según Bézivin et al. 2003.

Tabla 8. Citotoxicidad de *V.greggii* contra HeLa y HaCat

Tratamiento	IC ₅₀ (µg/mL)		SI
	HeLa	HaCat	
F-Me	4.33 ± 28.12	4.78 ± 24.23	1.10
F-Ac	237.02 ± 43.78	352.46 ± 29.05	1.48
F-He	103.04 ± 45.12	158.89 ± 26.68	1.54
NPs-FMe 12/60	289.94 ± 39.39	274.05 ± 35.65	0.94
Doxorubicina	2.02 ± 36.67	0.13 ± 12.82	0.06

Los datos son medias y ± SD (* $p < 0.05$) de IC₅₀ en µg/mL de los tratamientos de *Vernonia greggii*, comparados con Doxorubicina, analizados mediante ANOVA con la comparación de Tukey; los datos no disponibles están representados como (-)

8.5. Actividad hemolítica

Como parte de la determinación de la toxicidad de *V.greggii*, en este caso, frente a los eritrocitos humanos, se realizó el ensayo de hemólisis. Encontrando que F-Me libre no presentó actividad hemolítica, por otro lado, la formulación NPs-FMe 12/60 demostró actividad hemolítica aunque esto fue a dosis altas, como lo son 800 y 1000 µg/mL, así mismo se describen los resultados en la **Tabla 9**. Según los criterios reportados por (Mesdaghinia et al. 2019), si el porcentaje de hemólisis es < 2 % se considera no hemolítico, ligeramente hemolítico si el valor está entre 2 a 5 %, y hemolítico si el valor es > 5 %.

Tabla 9. Actividad hemolítica de F-Me y NPs-FMe 12/60

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Actividad hemolítica F-Me (%)	Actividad hemolítica NPs-FMe 12/60 (%)
1000	0.13 ± 1.22	96.67 ± 0.22
800	0 ± 0.45	14.18 ± 0.46
600	0.49 ± 0.89	0 ± 0.42
400	0 ± 0.10	0 ± 0.33
200	0.17 ± 0.48	0 ± 0.21
100	0 ± 0.22	0 ± 0.06

Los datos son las medias y \pm SD del porcentaje de actividad hemolítica (%), la concentración representada en $\mu\text{g/mL}$ de los tratamientos de *Vernonia greggii* (F-Me libre y NPs-FMe 12/60).

9. DISCUSIÓN

Anteriormente, se ha reportado que el chayote tiene propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, hipoglucémica entre otras (Arista et al. 2022) sin embargo no se ha indagado a profundidad su actividad citotóxica. Con los resultados obtenidos se puede apreciar que en *Me-S.e* tiene la presencia de Triterpenos. Esto es relevante ya que los triterpenos, presentes en los vegetales de la familia Cucurbitaceae, denominados Cucurbitacinas, son los compuestos a los que se le atribuya la actividad antitumoral, y se ha demostrado que están presentes en *S.edule* var. *nigrum spinosum* (Aguñiga- Sánchez et al. 2017).

En 2017, se evaluó el efecto antiproliferativo del extracto metanólico de *S.edule* var. *nigrum spinosum* contra el linaje P388 y MNCBM, a partir de 1,180 µg/mL se encontró una reducción significativa de las células leucémicas P388 viabilidad celular 39.2 ± 11.3 % y 88.5 ± 14.0 % de las células sanas MNCBM. Los componentes encontrados fueron cucurbitacinas B y D 1.008 y 0.127 mg/g los cuales son conocidos terpenos a los cuales se le atribuye actividad antitumoral, además de flavonoides como floridzina, naringenina, floretina y apigenina (Aguñiga et al. 2017). Mientras en el presente estudio el *Me-S.e* mostró efecto citotóxico importante sólo a partir 4000 µg/mL sobre células de cáncer de cuello uterino humano (HeLa), reduciendo su viabilidad celular a un 50.54 %, esto a pesar de ser la misma especie de chayote y contar con la presencia de componentes antitumorales como los triterpenos. Nuestros resultados también difieren del estudio de (Rivera-Martínez et al. 2023) donde evaluaron la citotoxicidad de otra especie de chayote, *S. chinantlense*, sin embargo el efecto se evaluó sobre las células HeLa, donde a partir de 2.5 µg/mL la proliferación fue inhibida en un 75 %. Exhibiendo toxicidad en dosis más bajas a comparación de lo reportado en nuestro estudio.

En el año 2021, un equipo de investigadores evaluó la citotoxicidad del extracto metanólico de *Sechium edule* *Perla negra*, microencapsulado en quitosano sobre las células HeLa, se encontró que las microesferas de 20 µm con 98 % de carga inhibieron las células tumorales con un IC_{50} 8 µg/mL, aunque las microesferas sin carga también inhibieron la proliferación celular (Salazar et al. 2022). En nuestro estudio la línea celular tumoral también fue HeLa, pero el efecto citotóxico de las NPs de PLGA de *Me-S.e* 12/60

fue a dosis más altas, 650 µg/mL. Sin embargo, similar que Salazar, nuestras NPs blanco también, esto nos permite conocer la toxicidad del polímero PLGA, ya que se caracteriza ser biocompatible (Lim et al. 2022), en base a esto, se atribuye el efecto citotóxico a la alta concentración del PLGA y no a Me-*S.e*.

Por otro lado, el perfil fitoquímico del extracto metanólico crudo de *Vernonia greggii* el componente altamente positivo fueron flavonoides, además de sesquiterpen lactonas, esteroides triterpenos, taninos, carbohidratos y cumarinas; varias de estas moléculas secundarias son de importante actividad biológica, generalmente se les confiere actividad antitumoral, antiinflamatoria, antimicrobiana, antiproliferativa, antimicrobiana entre otras (Mishra et al. 2023).

En un estudio realizado en 2012, se estudió el efecto citotóxico de diversos ejemplares destacando *Vernonia cinerea*, que mediante el ensayo de viabilidad MTT demostró tener una potente citotoxicidad, por lo cual se decidió aislar una lactona sesquiterpénica 8 α -tigloiloxi-hirsutinolida-13-O-acetato (compuesto 1) de *V.cinerea*. Su extracto acuoso contenía 2.3 % del compuesto 1, además demostró IC₅₀ >50 µg/mL contra HT29 y HepG2, y el efecto del compuesto 1 fue 3.5 ± 0.2 y 4.3 ± 0.2 µM HT29 Y HepG2 respectivamente. La actividad tóxica del extracto metanólico de *V.cinerea* (que contiene 7.2 % del compuesto 1) sobre la VC de de HT29 y HepG2 fue 5.2 0.9 y 5.7 0.9 % a 50 µg/mL (Khay et al. 2021). Mientras que nuestros resultados arrojaron un IC₅₀ de 237.02 ± 43.78 µg/mL respecto a la fracción acuosa, mientras que F-Me sobre VC de HeLa fue a 4. 33 ± 28.12 µg/mL.

Sobre *Vernonia amygdalina* se han encontrado cuatro lactonas sesquiterpenlactónicas como vernodalina, vernolida, hidroxivernollida y vernodalol y sus compuestos homologos como vernolepina y vernonemina (Jisaka et al. 1993). Según lo obtenido en el tamizaje fitoquímico, la fracción metanólica de *V. greggii* presentó una respuesta altamente positiva de las sesquiterpenlactonas, metabolito al que le es atribuído la actividad antitumoral. Aún así, se necesitan otros estudios para identificar y resolver la estructura química del compuesto con actividad antitumoral de *V. greggii*.

Pakpisutkul en 2022, probó los extractos etanólico y acuoso de las partes aéreas de *Vernonia cinerea* (VC), y su efecto sobre linajes celulares de cáncer colorrectal (SW620 y HT29), evaluando su efecto citotóxico mediante ensayo de MTT, durante 1, 4 y 7 días, en concentraciones de 100-700 y 10- 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Encontraron que el extracto etanólico ejerció una mayor actividad citotóxica a comparación del extracto acuoso, reportando valores de IC_{50} por debajo de los 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ desde el primer día, mientras que los valores reportados por el extracto acuoso oscilaron de 300 a 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Pakpisutkul et al. 2022). Estos datos coinciden con nuestro estudio, aunque la especie es distinta, *Vernonia greggii*, el efecto citotóxico de su fracción metanólica, coincide con lo ya mencionado al presentar citotoxicidad por debajo de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sin embargo, nuestra fracción acuosa reportó un IC_{50} de 263.34 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sobre las células HeLa.

En otro estudio, se evaluó el extracto etanólico de las hojas de *Vernonia amygdalina* (VA) sobre los linajes celulares MCF-7 y MDA-MB-231 (cáncer de seno humano) determinando las IC_{50} en las que se inhibió la proliferación celular; se reportaron valores de IC_{50} para MCF-7 de 100, 66 y 56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 24, 48 y 72 h, por otro lado los valores reportados para el linaje MDA-MB-231 fueron 83, 53 y 46 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el mismo rango de tiempo (Wong et al. 2013). Podemos comparar con nuestra concentración de inhibición, siendo similares a lo expuesto anteriormente; el IC_{50} de nuestra fracción metanólica libre de *V.greggii*, fue de 64.5435 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a partir de las 24 h sobre las células HeLa, en tanto que en VA obtuvieron ese efecto a las 48 h.

Anteriormente, se ha evaluado también el efecto citotóxico de los extractos acuoso y etanólico de *Vernonia mespilifolia*, utilizando la planta completa, sobre las células HeLa. Se empleó la técnica de tinción dual (Hoechst 33342/PI), observando una considerable muerte celular ejercida por el extracto etanólico, IC_{50} 149.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a diferencia del extracto acuoso en el que no se apreció un efecto citotóxico significativo ya que su $\text{IC}_{50} > 200 \mu\text{g}/\text{mL}$ (Unuofin et al. 2019); se puede apreciar que ambas plantas de la familia de las Asteraceas, ejercen citotoxicidad, en el caso de *V.greggii*, el extracto acuoso de sus partes aéreas tiene un efecto citotóxico contra las células de cáncer de cuello uterino a 262.3453 $\mu\text{g}/\text{mL}$, siendo similar a la concentración inhibitoria media de *V. mepsilifolia*.

Este efecto anticancerígeno también ha sido relacionado con ciertos metabolitos secundarios; tal es el caso de los sesquiterpenoides a los que se le atribuye actividad antitumoral y antineoplásica; en el estudio de Mohammad (Shoaib et al. 2017) aislaron lactonas sesquiterpénicas procedentes de *Artemisia macrocephala* las cuales se probaron en las células HeLa, donde se observó una inhibición del crecimiento celular del 63.39 y 81.25 % a 500 y 1000 $\mu\text{g/mL}$; a pesar de que en el presente estudio no se aisló ningún compuesto en específico, hubo una respuesta positiva en la presencia de sesquiterpenlactonas en el extracto metanólico, además de esto, el efecto citotóxico del extracto ya fraccionado en metanol, agua destilada y hexano, en forma libre, tuvo indicios de disminución de viabilidad celular por parte de la fracción acuosa, la cual fue 262.34 $\mu\text{g/mL}$, que es similar a las sesquiterpenlactonas aisladas.

Para complementar los estudios de citotoxicidad *in vitro*, se evaluó el daño provocado por F-Me y NPs-FMe 12/60 frente a los eritrocitos humanos, encontrando que la fracción libre no fue hemolítica en un rango entre 100 a 1000 $\mu\text{g/mL}$, en cuanto a las nanopartículas con carga de fracción metanólica, sólo se encontró actividad hemolítica a 800 y 1000 $\mu\text{g/mL}$, aún así, dicho efecto a estas dosis no genera un impacto negativo, teniendo en cuenta que la IC_{50} de NPs-FMe 12/60 es de 289.94 $\mu\text{g/mL}$. En un estudio previo se estudió el efecto hemolítico de la infusión de hojas de *Vernonia amygdalina*, encontraron que esta infusión produjo hemólisis sobre los eritrocitos humanos genotipo SS, genotipo AS y genotipo AA, yendo del grupo de eritrocitos más susceptible, moderadamente susceptible y no susceptible, respectivamente (Oboh 2006).

En un estudio de 2018, se determinó el potencial anticancerígeno de una sesquiterpenlactona, Caleína C, aislada de *Calea Pinnatifida* (*Asteraceae*), esto sobre la línea celular MCF-7, por análisis de inmunofluorescencia, las células tratadas con Caleína C presentaron husos mitóticos monopolares o husos bipolares asimétricos y células multinucleadas, su posible mecanismo de acción es inhibir la proliferación celular, esto debido a la reducción de genes encargados de codificar proteínas (PLK1 y CDKN1A) que contribuyen a la progresión de la mitosis (Caldas et al. 2018). Lo que refuerza el potencial que tienen las plantas pertenecientes a la familia *Asteraceae* como posibles quimioterapéuticos, conociendo de esta manera su posible mecanismo de acción.

10. CONCLUSIONES

Respecto a *S.edule* no se obtuvo el efecto tóxico esperado. *V.greggii*, estando libre o nanoparticulado demostró actividad antineoplásica, la fracción metanólica libre resultó ser la más tóxica comparada con sus fracciones y extracto crudo. Por otro lado, al estar nanoencapsulado, la fracción metanólica también fue citotóxica, siendo una ventaja ya que la formulación de nanopartículas permite biodisponibilidad, liberación gradual de la fracción y su lenta degradación en medios acuosos son características de Resomer®RG 756 S.

11. PERSPECTIVAS

Como perspectivas a futuro, se plantea determinar la selectividad de la fracción metanólica y fracción purificada libres y nanoencapsuladas frente a diferentes linajes celulares tumorales; una vez obtenida su selectividad, se identificará el activo, y posteriormente se evaluará su actividad biológica en un modelo *in vivo*.

BIBLIOGRAFÍA.

Aguiñiga-Sánchez, I., Soto-Hernández, M., Cadena-Iñiguez, J., Ruíz-Posadas, L. D. M., Cadena-Zamudio, J. D., González-Ugarte, A. K., Santiago-Osorio, E. 2015. Fruit extract from a *Sechium edule* hybrid induce apoptosis in leukaemic cell lines but not in normal cells. *Nutrition and cancer*, 67(2), 250-257.

Aguiñiga-Sánchez I, Cadena-Iñiguez J, Santiago-Osorio E, Gómez-García G, Mendoza-Núñez VM, Rosado-Pérez J, Ruíz-Ramos M, Cisneros-Solano VM, Ledesma-Martínez E, Delgado-Bordonave AJ, Soto-Hernández RM,. 2017. Chemical analyses and in vitro and in vivo toxicity of fruit methanol extract of *Sechium edule* var. *nigrum spinosum*. *Pharm Biol.* 55(1):1638-1645.

Ahlawat J, Henriquez G, Narayan M. 2018. Enhancing the Delivery of Chemotherapeutics: Role of Biodegradable Polymeric Nanoparticles. *Molecules.* 27;23(9):2157.

Alzehr, A., Hulme, C., Spencer, A., & Morgan-Trimmer, S. 2022. The economic impact of cancer diagnosis to individuals and their families: a systematic review. *Supportive care in cancer : official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer*, 30(8), 6385–6404.

Amjadi I, Rabiee M, Hosseini MS. 2013. Anticancer Activity of Nanoparticles Based on PLGA and its Co-polymer: In-vitro Evaluation. *Iran J Pharm Res.*12(4):623-34

Anselmo, A y Mitragotri, S. 2019. Nanoparticles in the clinic: An update. *Bioengineering & translational medicine*, 4(3), e10143.

Arana-Luna LL., Alvarado-Ibarra M. 2022. Consensus in acute myeloid leukemia in *Mexico*. *Gac Med Mex.*158(M3):M1-M48.

Arista-Ugalde, T. L., Santiago-Osorio, E., Monroy-García, A., Rosado-Pérez, J., Aguiñiga-Sánchez, I., Cadena-Iñiguez, J., Gavia-García, G., & Mendoza-Núñez, V. M. 2022. Antioxidant and Anti-Inflammatory Effect of the Consumption of Powdered

Concentrate of *Sechium edule* var. *nigrum spinosum* in Mexican Older Adults with Metabolic Syndrome. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 11(6), 1076.

Avednaño 2010. Las Variedades del Chayote Mexicano, Recurso Ancestral con Potencial de Comercialización. Grupo Interdisciplinario de Investigación en *Sechium edule* en México, A.C. (GISeM).

Benítez-Benítez, R., Sarria-Villa, R. A., Gallo-Corredor, J. A., Pacheco, N. O. P., Sandoval, J. H. Á., & Aristizabal, C. I. G. 2019. Obtención y rendimiento del extracto etanólico de dos plantas medicinales. *Revista Facultad De Ciencias Básicas*, 15(1), 31-40.

Bhatla N, Aoki D, Sharma DN, Sankaranarayanan R. 2021. Cancer of the cervix uteri: 2021 update. *Int J Gynaecol Obstet*. Oct;155 Suppl 1(Suppl 1):28-44.

Bhatia, S. 2016. Nanoparticles Types, Classification, Characterization, Fabrication Methods and Drug Delivery Applications. In: *Natural Polymer Drug Delivery Systems*. Springer, Cham.

Bézivin C., Tomasi S., Lohézic-Le Dévéhat F., Boustie J. 2003. Cytotoxic activity of some Lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomedicine*. 10 (499-503).

Brown, J. S., Amend, S. R., Austin, R. H., Gatenby, R. A., Hammarlund, E. U., & Pienta, K. J. 2023. Updating the Definition of Cancer. *Molecular cancer research : MCR*, 21(11), 1142–1147.

Caldas, L. A., Horvath, R. O., Ferreira-Silva, G. Á., Ferreira, M. J., Ionta, M., & Sartorelli, P. 2018. Calein C, a sesquiterpene lactone isolated from *Calea pinnatifida* (Asteraceae), inhibits mitotic progression and induces apoptosis in MCF-7 cells. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1191.

Cardoso, R. V., Pereira, P. R., Freitas, C. S., & Paschoalin, V. M. F. 2022. Trends in drug delivery systems for natural bioactive molecules to treat health disorders: the importance of nano-liposomes. *Pharmaceutics*, 14(12), 2808.

Chávez-Montes A, Pacheco-Ordaz A, Sánchez-García E, Quintanilla-Licea R, Bazaldúa-Rodríguez A. F, Pérez-Hernández R. A. & Elizondo-Luévano J. H. 2022. Amoebicidal and trichomonocidal capacity of polymeric nanoparticles loaded with extracts of the plants *Curcuma longa* (Zingiberaceae) and *Berberis vulgaris* (Berberidaceae). *Revista de Biología Tropical*, 70(1), 319-331.

Clogston JD, Patri AK. 2011. Zeta potential measurement. *Methods Mol Biol*. ;697:63-70.

Cortijo-Cascajares S, Jiménez-Cerezo M.J, Herreros de Tejada A. 2012. Revisión de las reacciones de hipersensibilidad a antineoplásicos. *Farm Hosp*;36(3):148-158.

Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Hasanzadeh Davarani F, Javanmard R, Dokhani A, Khorasani S, Mozafari MR. 2018. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*. 18;10(2):57.

Dillekås, H., Rogers, MS y Straume, O. 2019. ¿El 90 % de las muertes por cáncer se deben a metástasis?. *Cancer Medicine* , 8 (12), 5574-5576.

Elizondo-Luévano JH, Castro-Ríos R, Parra-Saldívar R, Larqué-García H, Garza-Tapia M, Melchor-Martínez EM, Chávez-Montes, A. 2023. Influencia de las variables del polímero y del solvente en la nanoencapsulación del flavonoide quercetina: estudio preliminar basado en polímeros Eudragit®. *Aplica. Ciencia*. 13 , 7816.

Espíndola Mateos, S., Cervantes, C. A. M., Zenteno, E., Slomianny, M. C., Alpuche, J., Hernández-Cruz, P., Martínez-Cruz, M. 2015. Purification and partial characterization of β -glucosidase in chayote (*Sechium edule*). *Molecules*, 20(10), 19372-19392.

Faruqi A, Tadi P. 2022. Citarabina. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): Publicación de StatPearls; Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557680/>

Godínez-Chaparro JA, Valencia-Herrera AM, Duarte-Abdala MR, Mena-Cedillos CA, Toledo-Bahena ME. 2021. Leukemia cutis and other dermatological findings in pediatric patients with acute myeloid leukemia. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 411-417.

Gonzatto V, Sousa de Araújo RM, y Pereira de Albuquerque L. 2022. “Género Vernonia (Asteraceae): una fuente prometedora de agentes antitumorales con potencial farmacológico”. *Avances en la investigación* 23 (6):67-79.

Iñiguez-Luna, M. I., Cadena-Iñiguez, J., Soto-Hernández, R. M., Morales-Flores, F. J., Cortes-Cruz, M., Watanabe, K. N., Cadena-Zamudio, J. D. 2021. Bioprospecting of *Sechium* spp. varieties for the selection of characters with pharmacological activity. *Scientific Reports*, 11(1), 1-12.

Jisaka M, Ohigashi H, Takegawa K, Huffman MA, Koshimizu K. 1993. Antitumoral and antimicrobial activities of bitter sesquiterpene lactones of *Vernonia amygdalina*, a possible medicinal plant used by wild chimpanzees. *Biosci Biotechnol Biochem.* 57(5):833-4.

Khan, S., & Hossain, M. K. 2022. Classification and properties of nanoparticles. In *Nanoparticle-Based Polymer Composites* Woodhead Publishing pp. 15-54.

Khay M, Toeng P, Mahiou-Leddé V. 2012. Análisis por HPLC y actividad citotóxica de *Vernonia Cinerea*. *Comunicaciones de productos naturales* .7(10).

Ko YC, Hu CY, Liu ZH, Tien HF, Ou DL, Chien HF, Lin LI. 2019. Cytarabine-Resistant *FLT3*-ITD Leukemia Cells are Associated with *TP53* Mutation and Multiple Pathway Alterations-Possible Therapeutic Efficacy of Cabozantinib. *Int J Mol Sci.* Mar 11;20(5).

Krauss AC, Gao X, Li L, Manning ML, Patel P, Fu W, Janoria KG, Gieser G, Bateman DA, Przepiorcka D, Shen YL, Shord SS, Sheth CM, Banerjee A, Liu J, Goldberg KB, Farrell AT, Blumenthal GM, Pazdur R. 2019. FDA Approval Summary: (Daunorubicin and Cytarabine) Liposome for Injection for the Treatment of Adults with High-Risk Acute Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res.* 25 (9): 2685–2690

Kriehoff-Henning E, Folkerts J, Penzkofer A, Weg-Remers S. 2017. Cancer – an overview. *Med Monatsschr Pharm.* Feb;40(2):48-54.

Kumari, A., Yadav, S. K., & Yadav, S. C. 2010. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and surfaces B: biointerfaces*, 75(1), 1-18.

Langi, P., Kiokias, S., Varzakas, T., & Proestos, C. 2018. Carotenoids: From plants to food and feed industries. *Microbial carotenoids*. Barreiro C and Barredo (eds) *Methods Mol Biol* 57-71.

Li M, Hou XF, Zhang J, Wang SC, Fu Q, He LC. 2011. Applications of HPLC/MS in the analysis of traditional Chinese medicines. *J Pharm Anal.* May;1(2):81-91.

Li W. 2021. Pathogenesis and Pathology of Pediatric Lymphoma. In: Gallamini A, Juweid M, editors. *Lymphoma* [Internet]. Brisbane (AU): Exon Publications; Chapter 1.

Lim, Y. W., Tan, W. S., Ho, K. L., Mariatulqabiah, A. R., Abu Kasim, N. H., Abd Rahman, N., Wong, T. W., Chee, C. F. 2022. Challenges and Complications of Poly(lactic-co-glycolic acid)-Based Long-Acting Drug Product Development. *Pharmaceutics*, 14(3), 614.

Lopes J. L. 1991. Sesquiterpene lactones from Vernonia. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 86 Suppl 2, 227–230.

Malik, S., Muhammad, K., & Waheed, Y. 2023. Emerging Applications of Nanotechnology in Healthcare and Medicine. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(18), 6624.

Malik, S., Muhammad, K., & Waheed, Y. 2023. Nanotechnology: A Revolution in Modern Industry. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(2), 661.

Mejía-Aranguré, J. M., Núñez-Enríquez, J. C., Fajardo-Gutiérrez, A., del Carmen Rodríguez-Zepeda, M., Martín-Trejo, J. A., Duarte-Rodríguez, D. A., Rangel-López,

A. 2016. Epidemiología descriptiva de la leucemia mieloide aguda (LMA) en niños residentes de la Ciudad de México: reporte del Grupo Mexicano Interinstitucional para la Identificación de las Causas de la Leucemia en Niños. *Gaceta Médica de México*, 152(S2), 66-77.

Mesdaghinia, A., Pourpak, Z., Naddafi, K., Nodehi, R. N., Alizadeh, Z., Rezaei, S., Mohammadi, A., & Faraji, M. 2019. An in vitro method to evaluate hemolysis of human red blood cells (RBCs) treated by airborne particulate matter (PM₁₀). *MethodsX*, 6, 156–161.

Mishra, N., Gupta, E., Singh, P., Soni, S., Noor, U. 2023. Insight on *Vernonia* Plant for its Pharmacological Properties: A Review. *Recent advances in food, nutrition & agriculture*, 14(2), 84–93.

NIH Curriculum Supplement Series. Bethesda (MD): National Institutes of Health (US); 2007. Understanding Cancer. [Internet]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20362/>

Oboh, G. 2006. Nutritive value and haemolytic properties (in vitro) of the leaves of *Vernonia amygdalina* on human erythrocyte. *Nutrition and Health*, 18(2), 151–160.

Odukoya JO, Mmutlane EM, Ndinteh DT. 2022. Ethnopharmacological Study of Medicinal Plants Used for the Treatment of Cardiovascular Diseases and Their Associated Risk Factors in sub-Saharan Africa. *Plants (Basel)*.11(10):1387.

Pakpisutkul, J., Suwapraphan, J., Sripayak, N., Sitkhuntod, N., Loyrat, S., Yahayo, W., & Supabphol, R. 2022. The Effects of *Vernonia cinerea* Less Extracts on Antioxidant Gene Expression in Colorectal Cancer Cells. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 23(11), 3923–3930.

Pulok K. Mukherjee, Seha Singha, Amit Kar, Joydeb Chanda, Subhadip Banerjee, Barun Dasgupta, Pallab K. Haldar, Nanaocha Sharma. 2022. Therapeutic importance of Cucurbitaceae: A medicinally important family, *Journal of Ethnopharmacology*, Volume 282, 2022, 114599, ISSN 0378-8741.

Roblero-Bartolón, G. V., & Ramón-Gallegos, E. 2015. Uso de nanopartículas (NP) en la terapia fotodinámica (photodynamic therapy [PDT]) contra el cáncer. *Gaceta medica de Mexico*, 151(1), 85-98.

Rojas-Aguirre, Y, Aguado-Castrejón, K, González-Méndez, I. 2016. La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la (r)evolución de la terapia contra el cáncer?. *Educación Química*. 27, 286- 291.

Rolnik, A., & Olas, B. 2021. The Plants of the *Asteraceae* Family as Agents in the Protection of Human Health. *International journal of molecular sciences*, 22(6), 3009.

Salazar-Aguilar, S., Ruiz-Posadas, L. D. M., Cadena-Iñiguez, J., Soto-Hernández, M., Santiago-Osorio, E., Aguiñiga-Sánchez, I., Rivera-Martínez, A. R., & Aguirre-Medina, J. F. 2017. *Sechium edule* (Jacq.) Swartz, a New Cultivar with Antiproliferative Potential in a Human Cervical Cancer HeLa Cell Line. *Nutrients*, 9(8), 798.

Salazar-Aguilar, S., Ruiz-Posadas, L. D. M., Cadena-Iñiguez, J., Soto-Hernández, M., Santiago-Osorio, E., Aguiñiga-Sánchez, I., Olivera, Á. D. 2022. Microencapsulation of an Extract of *Sechium edule* (Jacq.) Sw., with Antineoplastic Activity. *Applied Sciences*, 12(1), 24.

Santos García-Alvarado, M. Julia Verde-Star & Norma L. Heredia. 2001. Traditional Uses and Scientific Knowledge of Medicinal Plants from Mexico and Central America, *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 8:2-3, 37-89.

Shoaib, M., Shah, I., Ali, N., Adhikari, A., Tahir, M. N., Shah, S. W., Ishtiaq, S., Khan, J., Khan, S., & Umer, M. N. 2017. Sesquiterpene lactone! a promising antioxidant, anticancer and moderate antinociceptive agent from *Artemisia macrocephala* jacquem. *BMC complementary and alternative medicine*, 17(1), 27.

Shrestha AD, Neupane D, Vedsted P, Kallestrup P. 2018. Cervical Cancer Prevalence, Incidence and Mortality in Low and Middle Income Countries: A Systematic Review. *Asian Pac J Cancer Prev.*;19(2):319-324.

Sim, S., & Wong, N. K. 2021. Nanotechnology and its use in imaging and drug delivery (Review). *Biomedical reports*, 14(5), 42.

Treviño-Garza MZ, Saldívar-Vázquez AK, López-Villarreal SM, Lara-Banda MdR, Elizondo-Luevano JH, Chávez-Montes A, Báez-González JG, Rodríguez-Luis OE. 2023. Producción y caracterización preliminar de películas a base de mucílago de linaza cargadas con cardamomo (*Elettaria cardamomum*) y copaiba (*Copaifera officinalis*). *Recubrimientos*. 13(9):1574.

Unuofin JO, Otunola GA, Afolayan AJ. 2019. Inhibición de enzimas clave relacionadas con la obesidad y las actividades citotóxicas de extractos de plantas enteras de *Vernonia mespilifolia* Less. *Procesos*. 7(11):841.

Vallejo Rosero Y, Barrios- Correa L, Anaya Gil J. 2021. La cromatografía en capa fina: una alternativa vigente en la industria farmacéutica. *Revista de Química*. Vol. 35.(2): 2518-2803.

Wolinsky, J. B., Colson, Y. L., & Grinstaff, M. W. 2012. Local drug delivery strategies for cancer treatment: gels, nanoparticles, polymeric films, rods, and wafers. *Journal of controlled release*, 159(1), 14-26

Wong, F. C., Woo, C. C., Hsu, A., & Tan, B. K. 2013. The anti-cancer activities of *Vernonia amygdalina* extract in human breast cancer cell lines are mediated through caspase-dependent and p53-independent pathways. *PloS one*, 8(10), e78021.

Wu, T., Chow, L. & Lin, J. 1998. Sechiumin, una proteína que inactiva los ribosomas del comestible Gould, *Sechium edule* Swartz. Purificación, caracterización, clonación molecular y expresión. *EUR. J. Bioquímica*. 255 (2), 400–408.