

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**Análisis del Efecto Citotóxico *in vitro* de Extractos de *Acalypha monostachya* sobre
Líneas Celulares Tumorales Humanas de Cáncer de Colon.**

Por:

L.B.G. JUAN CARLOS ARELLANO BARRIENTOS

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

Junio, 2025

Análisis del Efecto Citotóxico *in vitro* de Extractos de *Acalypha monostachya* sobre Líneas Celulares TumORAles Humanas de Cáncer de Colon.

Aprobación de tesis:



Director de Tesis

Dr. C. Adolfo Soto Domínguez



Co-Directora de Tesis

Dra. C. Odila Saucedo Cárdenas



Comisión de Tesis

Dr. C. Raymundo A. Pérez Hernández



Subdirector de Estudios de Posgrado

Dr. med. Felipe Arturo Martínez Morales

**“Análisis del Efecto Citotóxico *in vitro* de Extractos de *Acalypha monostachya* sobre
Líneas Celulares Tumorales Humanas de Cáncer de Colon.”**

Presentado por

L.B.G. Juan Carlos Arellano Barrientos

Este trabajo se realizó en los Laboratorios de Biología Celular y Molecular del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina y el Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Biológicas, ambas pertenecientes a la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Adolfo Soto Domínguez y la Co-Dirección de la Dra. Odila Saucedo Cárdenas.

Dr. C. Adolfo Soto Domínguez

Director

Dra. C. Odila Saucedo Cárdenas

Co-Director

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios la oportunidad de poder entrar a estudiar la maestría, sin su apoyo no hubiese logrado el llegar hasta este punto de mi vida. Agradezco especialmente a mi madre Ma. Guadalupe Barrientos Gómez, a la cual dedico este trabajo y este gran logro. A mi familia (Mi padrino Héctor Urbina, mi madrina Ma. Antonia y mi tía Gela) que son pieza clave de cada uno de mis logros obtenidos y gracias a mi novia Valeria Berenice Ochoa Almanza quien también me brindo apoyo en los momentos más difíciles de este proyecto. Gracias a esas luces en el camino que alumbran cualquier oscuridad, que calman cualquier frio y que quitan cualquier dolor.

Así mismo agradezco a mis asesores el haberme guiado por el camino de la investigación, gracias al Dr. C. Adolfo Soto Domínguez por darme la oportunidad de entrar a su línea de investigación y ayudarme en mi desarrollo profesional, por guiarme en los momentos de dudas y siempre alentarme a seguir adelante. Al Dr. C. Raymundo Alejandro Pérez Hernández quien fue pieza clave para guiarme al equipo de trabajo del cual hoy formo parte, por guiarme en los momentos de duda, por apoyarme durante este camino y enseñarme con paciencia y tranquilidad. A la Dra. Odila Saucedo Cárdenas por todo su apoyo durante las exposiciones de los seminarios, por la guía y por la orientación que me dio para poder terminar mi proyecto de tesis. A la Dra. Gloria Arely Guillen Meléndez por su enseñanza en las vías experimentales pues gracias a ella los experimentos fueron más sencillos y fáciles de comprender, por su paciencia al momento de explicar cada una de las metodologías y sobre todo por darme su amistad.

A mis compañeros de maestría: Daniela Rodríguez Cassir, Cristina Sarahí Vázquez Rios, Edgar Iván Piña, Eduardo Álvarez Tostado, Daniel Rodríguez y Diego Armando pues sin su apoyo, sin sus consejos y sin su amistad no se hubiese logrado avanzar como se logró, pues en los momentos de mayor incertidumbre los amigos, la segunda familia, son aquellos que nos muestran donde dejamos el camino y como lo podemos retomar, sin juzgar, sin criticar y sin lastimar.

AGRADECIMIENTO AL CONACYT

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haberme otorgado una beca para realizar mis estudios de Maestría. Gracias por brindarme el apoyo económico, registrado con el número de beca 1015365

RESUMEN

L.B.G. Juan Carlos Arellano Barrientos
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Fecha de titulación: Junio 2025

Título del estudio: Análisis del Efecto Citotóxico *in vitro* de Extractos de *Acalypha monostachya* sobre Líneas Celulares Tumorales Humanas de Cáncer de Colon.

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

Número de páginas: 90

Área de estudio: Morfología

Propósito y Método del Estudio.

El cáncer colorrectal aumenta año con año principalmente en países en vías de desarrollo. En México se ha observado una tendencia creciente en la incidencia del cáncer colorrectal, influenciada principalmente por el estilo de alimentación occidental y la falta de medidas efectivas de prevención. Pese a contar con esquemas terapéuticos eficaces, se presentan algunas limitantes que evitan la regresión de la enfermedad e incluso en algunos casos las células tumorales desarrollan resistencia a estos tratamientos, por ello se buscan alternativas terapéuticas con el fin de aumentar la gama de tratamientos. En el presente estudio se evaluaron 3 extractos de hoja de *Acalypha monostachya* con el fin de determinar el efecto citotóxico sobre líneas celulares humanas de cáncer de colon (CaCo-2 y HT-29) comparadas contra una línea no tumoral (Vero). La evaluación se realizó mediante mediciones directas de la actividad mitocondrial usando la prueba MTT y se complementó con una tinción nuclear con DAPI para confirmar los resultados y observar posibles alteraciones en los núcleos celulares asociados a procesos de muerte celular. Esto permitió identificar el extracto con mayor actividad citotóxica y posteriormente determinar el tipo de muerte celular inducido, mediante el uso de un kit específico para la detección de apoptosis y necrosis.

Conclusiones y contribuciones.

Los resultados obtenidos en este estudio evidencian que el EH de *A. monostachya* presenta una marcada actividad citotóxica, especialmente sobre la línea celular tumoral CaCo-2, a una concentración de 100 µg/mL tras 24 horas de exposición.

Este efecto fue menos pronunciado en la línea HT-29, que solo respondió a concentraciones altas y en la línea no tumoral Vero, lo que sugiere cierta selectividad del extracto hacia células tumorales.

Las pruebas realizadas mostraron que el EH induce principalmente apoptosis en etapa tardía, seguido de necrosis, como mecanismos de muerte celular.

En conjunto este estudio demuestra que el EH de *A. monostachya* contiene compuestos con potencial terapéutico, los cuales podrían ser aislados y caracterizados en futuras investigaciones para el desarrollo de nuevas estrategias contra el cáncer colorrectal.

TABLA DE CONTENIDO

Introducción	Página 4
Cáncer	Página 4
Cáncer colorrectal	Página 5
Tratamientos	Página 7
Tratamientos contra el cáncer colorrectal	Página 8
Medicina tradicional	Página 10
Familia Euphorbiaceae	Página 13
Género Acalypha	Página 13
Justificación	Página 15
Hipótesis	Página 16
Objetivo general	Página 16
Objetivos específicos	Página 16
Materiales y métodos	Página 17
Resultados	Página 28
Colecta del material vegetal	Página 28
Rendimiento de los extractos	Página 28
Caracterización parcial fitoquímica.	Página 29
Alteraciones morfológicas inducidas por los extractos en las líneas humanas de cáncer de colon.	Página 34

Los extractos de <i>A. monostachya</i> reducen la viabilidad de las células humanas de cáncer de colon.	Página 43
Los extractos de <i>A. monostachya</i> reducen la confluencia celular e inducen cambios en la morfología nuclear.	Página 48
Análisis del tipo de muerte celular inducido por el extracto de <i>A. monostachya</i> de mayor efecto citotóxico in vitro.	Página 56
Discusión.	Página 64
Conclusiones.	Página 71
Perspectivas	Página 72
Referencias.	Página 73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Incidencia del cáncer a nivel mundial en ambos sexos.

Figura 2. Análisis y estimaciones comparativos de cáncer colorrectal.

Figura 3 Familias de plantas usadas en la medicina tradicional.

Figura 4 Tamizaje fitoquímico parcial de los extractos crudos de las hojas de *A. monostachya*.

Figura 5 Tamizaje fitoquímico parcial de los extractos crudos de las hojas de *A. monostachya*.

Figura 6 Líneas celulares expuestas a bajas concentraciones de los extractos de *A. monostachya* a 24 horas.

Figura 7. Líneas celulares expuestas a altas concentraciones de los extractos de *A. monostachya* a 24 horas.

Figura 8 Líneas celulares expuestas a bajas concentraciones de los extractos de *A. monostachya* a 48 horas.

Figura 9 Líneas celulares expuestas a altas concentraciones de los extractos de *A. monostachya* a 48 horas.

Figura 10. Viabilidad relativa de las líneas celulares posterior a tratamientos a 24 horas.

Figura 11. Viabilidad relativa de las líneas celulares posterior a tratamientos a 48 horas.

Figura 12. Determinación del extracto de mayor efecto citotóxico a 24 horas.

Figura 13. Determinación del extracto de mayor efecto citotóxico a 48 horas.

Figura 13. Líneas celulares expuestas a bajas concentraciones de los extractos a 24 horas.

Figura 14. Líneas celulares expuestas a altas concentraciones de los extractos a 24 horas.

Figura 15. Líneas celulares expuestas a bajas concentraciones de los extractos a 48 horas.

Figura 16. Líneas celulares expuestas a altas concentraciones de los extractos a 48 horas.

Figura 17. Determinación del extracto de mayor efecto citotóxico a 24 horas.

Figura 18. Determinación del extracto de mayor efecto citotóxico a 48 horas.

Figura 19. Tipo de muerte inducida sobre la línea CaCo-2.

Figura 20. Tipo de muerte inducida sobre la línea HT-29.

Figura 21. Tipo de muerte inducida sobre la línea Vero.

Figura 22. Determinación del tipo de muerte inducida por los extractos.

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

<i>Acalypha monostachya</i>	<i>A. monostachya</i>
Extracto acuoso	EA
Extracto metanólico	EM
Extracto hexánico	EH
Microgramos	µg
Mililitro	mL
Microlitro	µL
4'6-diamidino-2-fenilindol	DAPI
Dimetilsulfóxido	DMSO
Dióxido de carbono	CO ₂
Horas	h
Peso final	PE
Peso inicial	PI
Bromuro de 3-(4,5-dimetiliazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol	MTT
Permanganato de potasio	KMnO ₄
Ácido acético glacial	CH ₃ COOH
Ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄
Ácido clorhídrico	HCl
Temperatura ambiente	TA
Tampón fosfato salino	PBS

Ácido desoxirribonucleico

ADN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer.

El cáncer es una enfermedad caracterizada por la proliferación anormal de algunas células que conforman nuestros tejidos. Este fenómeno se llega a presentar por un daño en el ADN, ya sea adquirido o bien heredado desde la línea germinal. Existen dos tipos principales de cáncer: los relacionados a la sangre (sanguíneos) y los capaces de formar un tumor sólido (Instituto Nacional del Cáncer, 2022; American Cancer Society, 2020). Una vez desarrollado el tumor sólido, este puede quedarse *in situ* o bien comenzar un proceso de migración de las células cancerosas, generando metástasis (Alexandru Ionescu et al., 2023; Shin et al., 2023)

El desarrollo de esta enfermedad tiene una alta prevalencia a nivel mundial, para el año 2020 se han reportado 1.9 millones de casos nuevos de cáncer detectados y su incidencia va en aumento (Guo et al., 2023; Rascón-Valenzuela et al., 2015). El cáncer puede llegar a desarrollarse en múltiples tejidos, la mayoría relacionados a aquellos con características epiteliales, pues son aquellos que llegan a mantener activa su replicación; por ende, son el grupo celular con mayor riesgo de sufrir alteraciones genéticas azarosas (Rascón-Valenzuela et al., 2015). Actualmente la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer menciona que los 4 tipos de cáncer más frecuentes para 2020 fueron cáncer de mama, próstata, pulmón y cáncer colorrectal (International Agency for Research on Cancer, 2020). Sin embargo, en el año 2022 (Globcan) el cáncer de mayor incidencia en la población mundial y que afecta a ambos sexos fue el cáncer de pulmón, seguido del cáncer de mama y en tercer lugar el cáncer colorrectal, tal como se aprecia en la figura 1. A nivel mundial se ha determinado que el cáncer colorrectal ocupa el tercer lugar de

prevalencia para esta enfermedad, mientras que en México se asocia su prevalencia con casi 15 mil casos nuevos por año (IMSS, 2019).

1.2 Cáncer colorrectal.

El cáncer colorrectal puede presentarse en ambos sexos, sin embargo, se ha reportado una mayor incidencia en el sexo masculino (Li et al., 2021; Zhao et al., 2022).

Anteriormente, se creía que el cáncer colorrectal se debía a una progresión por enfermedades inflamatorias asociadas al intestino, como la enfermedad de colitis ulcerativa o la enfermedad de Crohn , (Dekker et al., 2019; Shah & Itzkowitz, 2022), o bien asociado a factores genéticos como el síndrome de cáncer hereditario, síndrome de Lynch o el síndrome de poliposis adenomatosa familiar (Thanikachalam & Khan, 2019).

Actualmente el desarrollo del cáncer colorrectal está asociado a múltiples factores, como en la mayoría de las neoplasias. Uno de los factores asociados es el grupo étnico, pues se ha demostrado que algunos grupos étnicos tienen una tendencia a desarrollar una neoplasia característica como el desarrollo de cáncer de estómago, que afecta más a la

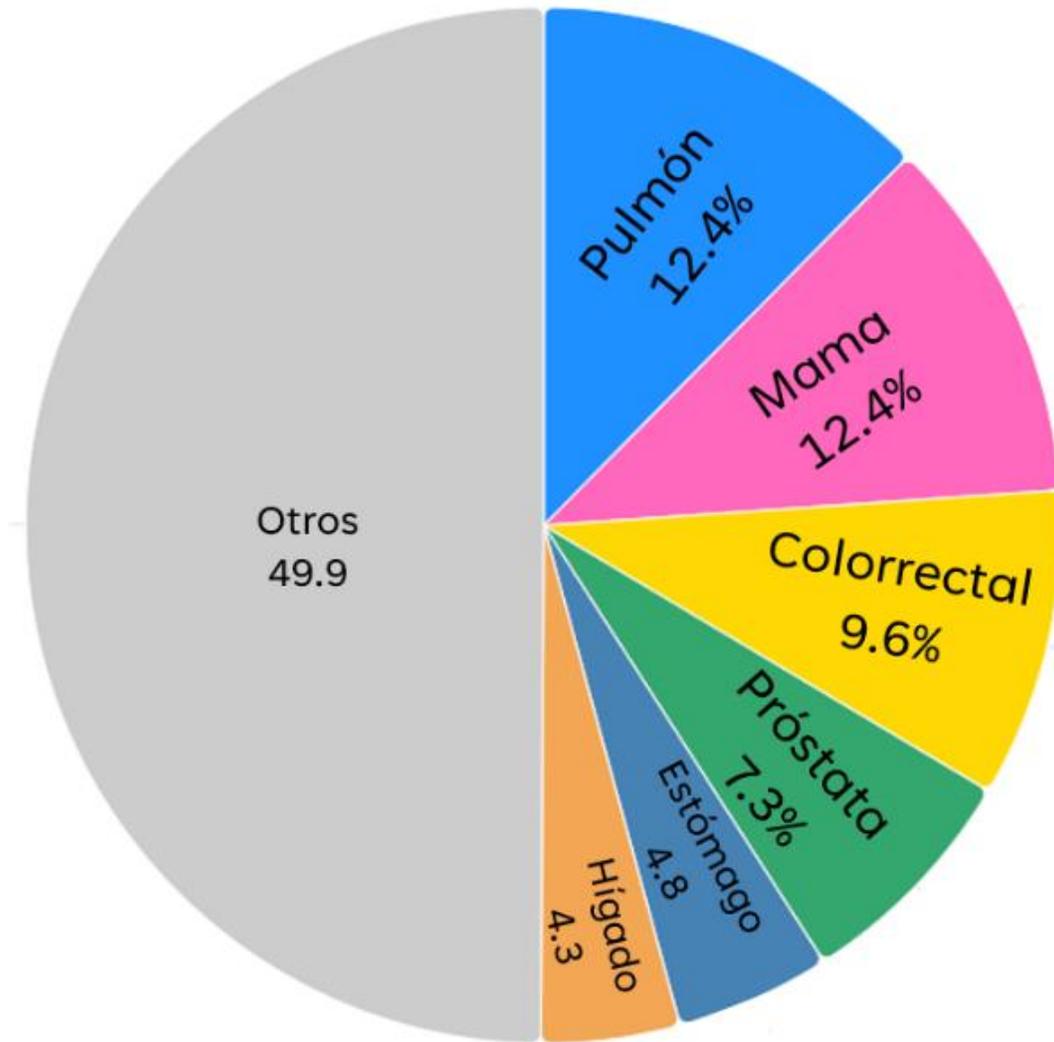


Figura 1 Incidencia del cáncer a nivel mundial en ambos sexos, información del año 2022. Obtenido de (Globcan).

población Hawaiana con descendencia asiática (Li et al., 2021). Otros factores asociados son el estilo de vida, el consumo de sustancias nocivas para la salud (tabaco, alcohol, drogas, etc.), falta de ejercicio o sedentarismo y sobre todo al tipo de dieta que se presenta dentro de su consumo diario (Alexandru Ionescu et al., 2023; Dekker et al., 2019).

Nuevas investigaciones han mostraron que más del 70% de los casos de cáncer colorrectal diagnosticados son desarrollados de forma espontánea (Dougherty & Jobin, 2023; Li et al., 2021), generado por alteraciones genéticas adquiridas que favorecen su desarrollo. De hecho, recientemente se ha descrito el papel que tiene el microbioma como un agente causal del desarrollo del cáncer colorrectal, pues se han involucrado microorganismos que propician la aparición de esta enfermedad debido al desarrollo de un ambiente inflamatorio (Dougherty & Jobin, 2023; Wong & Yu, 2019). La dieta, como ya se ha mencionado, es uno de los factores que más influyen en el desarrollo del cáncer colorrectal, sobre todo la influencia de la dieta occidental, ya que en esta se aumenta el consumo de grasa, conservadores, carnes rojas, carbohidratos y se tiene una ingesta insuficiente de fibras, lo que aumenta más el desarrollo espontáneo de la enfermedad (Jacobo-Herrera et al., 2015; López, 2013). Este último factor, aunado a la baja

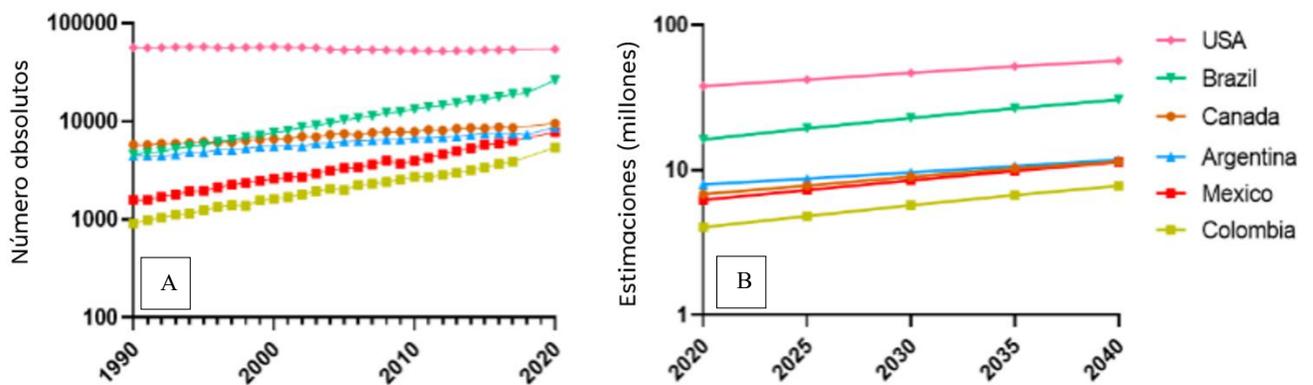


Figura 2.- A) Análisis comparativo de casos de cáncer colorrectal detectados de 1990 a 2020 de países desarrollados (EUA y Canadá) contra países en vías de desarrollo (México, Argentina, Colombia, Brasil). B) Estimaciones generadas de nuevos casos previstos de cáncer colorrectal de 2020 a 2040 de países desarrollados (EUA y Canadá) contra países

prevalencia del diagnóstico y la falta de síntomas claros pueden favorecer su desarrollo y su progresión.

En México se han ido incrementando los casos de cáncer colorrectal de 1990 a 2020, tal como se aprecia en la figura 2A. De igual forma se ha estimado que para el año

2040 haya un incremento en nuevas detecciones de esta enfermedad debido a la influencia de la dieta occidental que se tiene de Estados Unidos de América, en conjunto con la poca prevalencia que se le da al diagnóstico oportuno y la poca accesibilidad que se tiene a los servicios médicos, es por ello que en México, desde el 2010, el cáncer es considerado la cuarta causa de muerte (IMSS, 2015).

1.3 Tratamientos.

La gama de tratamientos administrados contra el cáncer en general es amplia, y depende de los estadios mismos de la enfermedad para su aplicación. Existe una gama de tratamientos que se enfoca en atender aquellas neoplasias que se encuentran localizadas o *in situ*. Este tipo de terapias se basa en la remoción de la región dañada o alterada, como la cirugía. Otra terapia en cuestión de las neoplasias *in situ* es la administración de radioterapia con isotopos radioactivos. Este tipo de terapias son efectivas, pero dependen del estadio de la enfermedad, ya que cuando son estadios más avanzados o cuando ya hay una diseminación a través del cuerpo, se opta por aplicar terapias orales o intravenosas como la quimioterapia, inmunoterapia y/o medicamentos dirigidos (American Cancer Society, 2020). Estos tratamientos pueden ser administrados en conjunto o bien en combinación, sin embargo, los agentes quimioterapéuticos, ya sea de primera o segunda línea, son considerados como el medicamento estándar contra el cáncer administrándose vía intravenosa o vía oral. Estos medicamentos son empleados con el fin de atacar a las células con una alta tasa de proliferación celular (una de las características del cáncer), sin embargo, no tienen un mecanismo de citotoxicidad selectiva, por lo cual también pueden

atacar células sanas que se encuentren en epitelios que tengan una tasa elevada de replicación. Por lo anterior, los efectos secundarios de los tratamientos antineoplásicos suelen asociarse con fuertes reacciones adversas, dentro de las cuáles se incluye vómito, diarrea, caída del pelo, úlceras en la boca, pérdida de apetito y peso, cambios en la piel y en las uñas, entre otros síntomas (American Cancer Society, 2020).

1.4 Tratamientos contra el cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal, ha demostrado ir en aumento a nivel mundial. En México es una de las problemáticas de salud del cual se prevé un aumento en futuros años (Beltran-Ontiveros et al., 2024) Los tratamientos para esta enfermedad van desde la remisión de la porción del intestino dañado, a manera de cirugía, o bien la administración de quimioterapéuticos (Shin et al., 2023; Zhou et al., 2023)

Algunos de esos agentes quimioterapéuticos de primera línea empleados de forma estándar en el tratamiento contra el cáncer colorrectal son:

- 5-fluorouracilo (5-FU®)
- Capecitabina (Xeloda®)
- Irinotecan (Camptosar®)
- Oxaloplatino (Eloxatin®)
- Trifluridina y tipiracil (Lonsurf®)

Estos agentes quimioterapéuticos se pueden emplear solos o de forma conjunta en ciclos de quimioterapias, como por ejemplo el uso de FOLFOX® (ácido folínico, 5-Fluorouracilo y Oxaloplatino), FOLFIRI®, que tiene efecto similar al FOLFOX® (Otsu

& Hironaka, 2023), XELOX® (Oxaloplatino y Capecitabina), entre otros fármacos que se pueden combinar para generar un esquema de tratamiento de primera línea contra el cáncer colorrectal. Su administración ya sea en conjunto o bien individuales dependerán del estadio de la enfermedad (Jang et al., 2023; Zhou et al., 2023).

Dentro de los esquemas terapéuticos se han añadido compuestos químicos de segunda línea, los cuales van dirigidos hacia los procesos de angiogénesis con el fin de evitar la propagación tumoral y diseminación a otros tejidos. Estos quimioterapéuticos de segunda línea han mostrado una mejoría en la regresión del cáncer, aumentando la esperanza de vida en pacientes que presentan esta enfermedad, sin embargo, su administración radica en la presencia de ciertas mutaciones relacionadas con receptores específicos como *KRAS*, *BRAF*, *EGFR*, entre otros (Otsu & Hironaka, 2023).

El porcentaje de supervivencia de pacientes a los cuales se les administran estos tratamientos es de hasta 30 años después del diagnóstico de la enfermedad, sin embargo, la respuesta a estos varía según el estado de progresión de la enfermedad y a las mutaciones que ha adquirido el tipo celular. Ya que hay pacientes que presentan alteraciones genéticas en las cuales las células alteradas disminuyen la respuesta ante los fármacos usados, debido al desarrollo de mecanismos de evasión. Por lo cual, se llegan a administrar rondas prolongadas de tratamientos, sin embargo, el uso crónico de los tratamientos antineoplásicos tiende a generar un fenotipo más agresivo de células de cáncer. Este nuevo fenotipo se vuelve resistente a los agentes quimioterapéuticos lo cual genera a su vez un mal pronóstico, se ha descrito que en personas que fallecieron por esta enfermedad y que recibieron tratamientos de forma crónica, se han encontrado heterogeneidad de células con resistencia a los quimioterapéuticos (Greenlee et al., 2021).

Otras limitantes que se presentan empleando estos tratamientos se debe a los altos costos y al reto de adquisición de los medicamentos, por lo cual en muchas de las ocasiones los pacientes no logran cumplir los esquemas completos, lo que de igual forma aumenta el riesgo a desarrollar alteraciones relacionadas con la resistencia hacia los agentes quimioterapéuticos de primera y segunda línea aumentando aún más la tasa de mortalidad (Zhou et al., 2023)

El desarrollo de los quimioterapéuticos, en su mayoría, derivan de estudios relacionados con el empleo de alternativas terapéuticas, como es el uso de la medicina tradicional (Fridlender et al., 2015; Shakya & Naik, 2022).

1.4 Medicina Tradicional.

La medicina tradicional se define como aquella que busca el empleo de elementos naturales con el fin de prevenir o tratar alguna enfermedad en particular (Aiello et al., 2019). La medicina tradicional ha ido adquiriendo relevancia en los últimos años, ya que la OMS ha estimado que, debido a las limitantes de los tratamientos contra el cáncer como el alto costo y la baja disponibilidad de estos, en comunidades rurales principalmente, motivan a la población a optar por las alternativas terapéuticas (Aiello et al., 2019). Uno de los recursos empleados dentro de la medicina tradicional es el uso de tejidos vegetales a manera de infusión o de extractos naturales, según sea el caso. Por tal motivo, la medicina convencional ha ido centrando su atención en la medicina tradicional, enfocando la búsqueda de moléculas provenientes de tejidos vegetales cuyo efecto biológico sea

benéfico y amplie la gama de tratamiento contra algunas enfermedades como el cáncer (Ríos Reyes et al., 2017).

Los metabolitos con actividad biológica que se llegan a presentar en algunos tejidos vegetales dependen del tipo de planta, el lugar donde se desarrolla y en qué condiciones de estrés se encuentre, que en la mayoría de los casos el desarrollo de metabolitos biológicamente es derivados de un estrés hídrico o bien por la presencia por algún patógeno (Delgado-Gonzalez et al., 2023).

Estos metabolitos biológicamente activos tendrán una distribución distinta en el tejido vegetal, ya que algunos de ellos tienden a acumularse más en las hojas, mientras que otros tienen una acumulación a nivel de raíz (Aiello et al., 2019). Por estas razones, tanto el sitio de colecta como la zona del tejido vegetal a analizar deben ser considerados minuciosamente.

Los efectos biológicos que han sido reportados a lo largo de las investigaciones empleando extractos de origen vegetal son variados, como por ejemplo aquellos con actividad antimicrobiana, antifúngica, antiradical, antioxidante, inmunomodulador, antiviral y anticancerígeno (Delgado-Gonzalez et al., 2023; Thanikachalam & Khan, 2019). Cada efecto dependerá del tipo de planta, la zona de la planta usada y el tipo de solvente que se haya usado para generar la extracción de los metabolitos. A nivel mundial se cuenta con una amplia distribución de especies vegetales, de los cuales algunos se encuentran en vías de investigación por su uso o relación con la medicina tradicional, esto se basa en estudios etnobotánicos que muestran como ciertas culturas han ido empleando las plantas con el fin de preservar la salud (Salazar-Gómez & Alonso-Castro, 2022). Estas

investigaciones etnobotánicas han permitido que se lleven a cabo estudios de carácter científico con el fin de elucidar estos compuestos que otorgan la actividad biológica a los tejidos vegetales, y en caso de encontrar estos compuestos, determinar si se pueden aislar para el desarrollo de nuevos fármacos (Fridlender et al., 2015; Ryu et al., 2023). La Organización Mundial de la Salud ha mencionado que de las plantas se pueden llegar a obtener nuevos fármacos que aumenten las alternativas terapéuticas (Noumedem et al., 2013).

México cuenta con una amplia biodiversidad debido a las condiciones climatológicas tan variadas, motivo por el cual se ha determinado que tiene entre el 4 y el 8% de la flora representativa del planeta. La flora presente en México varía según el estado por lo cual se les puede otorgar un uso o no, de los cuales los usos más empleados son como ornamento, para alimentación y aquellos empleados en el uso de la medicina tradicional (Estrada-Castillón et al., 2018).

Nuevo León, un estado con clima semiseco templado, cuenta con una gama importante de flora y fauna empleada para múltiples propósitos, como el uso de ciertas plantas con actividad medicinal que se emplean en conjunto con terapias farmacológicas para mitigar procesos patológicos (Estrada-Castillón et al., 2018; Ríos Reyes et al., 2017).

1.6 Familia *Euphorbiaceae*

La familia *Euphorbiaceae*, considerada la sexta familia con mayor diversidad (Gordillo et al., 2002), cuenta con 228 géneros de plantas de las cuales derivan aproximadamente 7,000 especies distribuidas a lo largo del mundo. Estas especies pueden ser plantas herbáceas, arbustos, árboles leñosos y especies parecidas a los cactus, dentro de estas especies pueden llegar a verse especies perenes y anuales

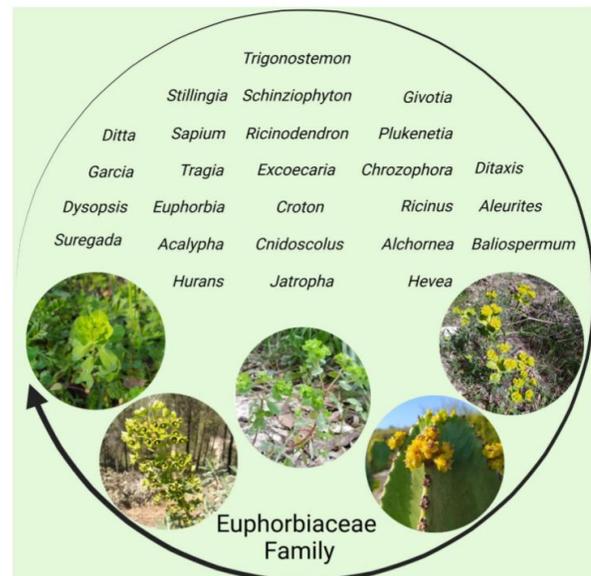


Figura 3.- Familias de plantas que cuentan con especies en vías de investigación por su uso en la medicina tradicional, obtenido de (Jiménez-González et al., 2024)

(monocotiledones o dicotiledóneas) (Islam et al., 2022). Algunos géneros representativos dentro de esta gran familia son *Euphorbia*, *Jatropha*, *Croton*, *Acalypha*, entre otros. que destacan por su uso en la medicina tradicional (Gordillo et al., 2002; Jiménez-González et al., 2024).

1.7 Genero *Acalypha*

El género *Acalypha* pertenece a la familia *Euphorbiaceae* el cual cuenta con una amplia distribución a nivel mundial, la cual comprende cerca de 450-570 especies vegetales (Rascón-Valenzuela et al., 2015)

Algunos ejemplos de especies del género *Acalypha* que se encuentran en vías de investigación por su uso en la medicina tradicional son *Acalypha manniana* encontrada en la región de Camerún, en África, debido a que ha sido usada para tratar alteraciones dérmicas como micosis, entre otras. Las investigaciones de Noumedem et al., (2013) mostraron un efecto antimicrobiano empleando diversos extractos como metanólico, hexánico, acetato de etilo y sus fracciones. *Acalypha indica*, otra especie del género *Acalypha*, mostró tener múltiples efectos biológicos de los cuales uno de estos corresponde a un efecto anticancerígenos (Zahidin et al., 2017). Recientemente otra especie del género de *Acalypha* fue investigado con el fin de elucidar el potencial antineoplásico característico de otras especies: *Acalypha monostachya*, que es una planta perenne localizada en el suroeste de los Estados Unidos de América y parte de México. Esta planta se ha empleado para tratar diversas afecciones como erupciones cutáneas, diarreas, sin embargo, en el norte de México en estados como Nuevo León se le conoce como la hierba del cáncer, pues el uso de la infusión del tejido vegetal se asocia con la disminución del cáncer (Guillén-Meléndez et al., 2021). Esta respuesta anticancerígena fue demostrada en los estudios realizados por Guillén-Meléndez et al., (2021), en el cual se obtuvieron 3 extractos a partir de toda la planta con disolventes de diversa polaridad (agua, hexano y metanol), del cual el EH mostró una toxicidad selectiva en las líneas celulares tumorales humanas HeLa y en las células MDA-MB-231 (cáncer cervicouterino y cáncer de mama triple negativo, respectivamente). En dichas células se observó un cambio en la morfología y en la formación de cuerpos apoptóticos asociados a concentraciones bajas (cambios inducidos a concentraciones de 10 a 100 µg/mL), mientras que en las células Vero (empleadas como células no tumorales) no presentó estos efectos tóxicos (Guillén-Meléndez et al., 2021).

2. JUSTIFICACIÓN:

El desarrollo de cáncer colorrectal en nuestro país aumenta año con año, estimaciones basadas en análisis estadísticos muestran que aun con los esquemas de tratamientos actuales esta enfermedad va en aumento. La influencia de la dieta occidental y el estilo de vida en México, aunado a la baja prevención, favorece el desarrollo de la enfermedad. Los esquemas actuales quimioterapéuticos atacan a las células cancerosas que proliferan de forma acelerada, sin embargo, no son específicos y afectan a las células que no son cancerosas, esta problemática, entre otras, limita el seguimiento de los tratamientos quimioterapéuticos. Motivo por el cual se ha enfatizado la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas que reduzcan las limitantes de los tratamientos convencionales. La medicina tradicional ha mostrado el potencial que presenta el uso de las plantas para la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos contra el cáncer. El EH de *A. monostachya* mostró tener una actividad citotóxica selectiva en células de cáncer cervicouterino y de mama triple negativo (HeLa y MDA-MB-231), por lo que en el presente estudio se evaluará el efecto citotóxico selectivo *in vitro* de extractos de *A. monostachya* en líneas celulares humanas (HT-29 y CaCo-2) de cáncer de colon.

3. HIPÓTESIS:

Los extractos de *A. monostachya* tienen efecto citotóxico selectivo *in vitro* sobre las líneas celulares tumorales humanas HT-29 y CaCo-2.

4. OBJETIVO GENERAL:

Analizar el efecto citotóxico selectivo *in vitro* de extractos de *Acalypha monostachya* sobre líneas tumorales humanas de cáncer de colon.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1.- Obtener y realizar el análisis fitoquímico parcial del extracto acuoso, metanólico y hexánico de *A. monostachya*.
- 2.- Evaluar el efecto citotóxico *in vitro* de los extractos de *A. monostachya* sobre células humanas de cáncer de colon.
- 3.- Analizar el tipo de muerte celular inducida por el extracto de *A. monostachya* con mayor actividad citotóxica *in vitro*.

5. MATERIAL Y MÉTODOS.

5.1. Objetivo 1 Obtener y realizar el análisis fitoquímico parcial del extracto acuoso, metanólico y hexánico de *A. monostachya*.

5.1.1. Material vegetal y sitio de colecta.

Se colectaron las hojas de *A. monostachya*. El sitio de colecta del material vegetal se realizó en el cerro de la Loma Larga Oriente ubicada en el municipio de San Pedro Garza García, Nuevo León (25°39'21.9''N, -100°20'07.3.14'' W), en agosto de 2024. Posteriormente el material vegetal fue identificado por el Dr. Marco Guzmán Lucio asignándole así un número de baucher (Folio 030641).

5.1.2. Obtención del extracto.

El material vegetal obtenido fue secado a la sombra a temperatura ambiente (TA, 23 ± 2 °C) durante 3 días. Posteriormente fue triturado utilizando un molino manual para grano (Victoria). La extracción del material vegetal se llevó a cabo mediante maceración a TA, con agitación constante por 24 h en un matraz Erlenmeyer de 500 ml utilizando 10 g de planta y 300 ml de disolvente (agua destilada, metanol absoluto o n-hexano). Los extractos EA, EM y EH fueron filtrados y concentrados mediante presión reducida empleando un rotavapor (Yamato Scientific CO. LTD. RE-200). Después de terminado el tiempo de agitación, el EA fue filtrado, esterilizado y sometido a evaporación en una incubadora a 40 °C. Una vez eliminado el disolvente en su totalidad de los extractos se obtuvo el rendimiento utilizando la siguiente fórmula donde: PE = Peso del extracto

obtenido, PI = Peso inicial del material vegetal, mostrando los resultados a manera de porcentajes.

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

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

5.1.3. Tamizaje fitoquímico parcial.

La medicina tradicional comprende el uso de los recursos naturales con el fin de tratar enfermedades en la población, uno de estos recursos es el uso de plantas. Las plantas presentes en la región pueden llegar a emplear metabolitos secundarios que le confieren una actividad biológica. Estos metabolitos son inicialmente determinados empleando pruebas fitoquímicas parciales, en donde los compuestos presentes en los extractos reaccionan con los reactivos utilizados, proporcionando información sobre los posibles metabolitos secundarios presentes en las plantas (Guillén Meléndez, 2021).

5.1.4. Insaturaciones (Prueba KMnO₄)

Se disolvieron de 1-2 mg de los extractos en 1 mL de los solventes empleados. Posteriormente se les adiciono gota a gota del reactivo al 2% en agua, esperando observar un precipitado de color café o una descoloración generada por el reactivo.

5.1.5. Grupo carbonilo (2-4 dinitrofenilhidrazina)

Se disolvieron 5 mg de cada extracto en 1 mL de etanol. Posteriormente se añadió 1 mL de la solución saturada de 2-4 dinitrofenilhidrazina (2-4 dinitrofenilhidrazina disuelto en HCl 6N), esperando observar un precipitado con una coloración amarilla o naranja.

5.1.6. Oxidrilos fenólicos (taninos vegetales, FeCl₃)

Se disolvieron de 1-2 mg de los extractos en 1 mL de agua (EA) o 1 mL de etanol 96% (EM y EH). Una vez disueltos se añadieron gotas de FeCl₃ al 2.5% (FeCl₃ disuelto el agua), esperando observar un precipitado rojo, azul-violeta o verde.

5.1.7. Esteroides y terpenos (Salkowski)

Se disolvieron de 1-2 mg de cada extracto en 1 mL de cloroformo, posteriormente se le añadió 1 mL de H₂SO₄, esperando observar un anillo rojo-marrón en la interfase.

5.1.8. Molish (prueba de carbohidratos)

Se disolvieron de 1-2 mg de cada extracto, posteriormente se añadió gota a gota el reactivo de Molish (alfa naftol al 1% disuelto en etanol) y 1 mL de H₂SO₄, esperando observar un anillo coloreado de color púrpura en la interfase.

5.1.9. Cumarinas (pruebas de carbohidratos)

Se disolvieron de 1-2 mg de los extractos en etanol, añadiendo gota a gota del reactivo NaOH (10%), esperando observar una coloración amarilla que desaparece al acidificar la solución.

5.1.10. Lactonas (pruebas de carbohidratos)

Se disolvieron de 1-2 mg de los extractos en 1 mL de solución alcohólica de NaOH 10%, esperando observar una coloración amarilla o naranja que desaparece cuando se añaden gotas de HCl.

5.1.11. Sesquiterpenolactonas (Baljet)

Se disolvieron 2-3 mg de cada extracto en etanol, añadiendo 3-4 gotas del reactivo mezcla (C₆H₃N₃O₇ al 1% en etanol y NaOH 10% en proporción 1:1) esperando observar una coloración naranja o rojo oscuro.

5.1.12. Flavonoides (H₂SO₄)

Se disolvieron pequeñas cantidades de los extractos en H₂SO₄, esperando observar una coloración amarilla indicando la presencia de flavonoides, naranja-guinda para flavonas, rojo-azuloso para chalconas y rojo-purpura para quinonas.

5.1.13. Alcaloides (Dragendorff)

Se disolvieron pequeñas cantidades de los extractos, a los cuales se les adicionó el reactivo Dragendorff (Partiendo de una mezcla de la solución A tomando 5 mL y 4 mL del reactivo B en 100 mL de agua. En el caso del reactivo A este se preparó con 0.85g de Bi(NO₃)₃ mezclados con 10 mL de CH₃COOH y 40 mL de agua, mientras que la solución B se preparó con 8g de KI solubilizado en 20 mL de agua), esperando observar una coloración rojo-naranja.

5.1.14. NaHCO₃ (prueba de saponinas)

Se disolvieron de 1-2 mg de los extractos en agua (EA) o etanol (EM o EH), posteriormente se le añadieron 2-3 gotas de H₂SO₄ concentrado para después añadir 2-3

gotas de la solución NaHCO₃ (10%) esperando observar la aparición de burbujas con prevalencia de 1 minuto.

5.1.15. Salkowski (prueba de saponinas)

Se disolvieron de 1-2 mg de los extractos en 1 mL de cloroformo a los cuales se les añadió 1 mL de H₂SO₄ esperando observar una coloración roja.

5.1.16. Aromaticidad

Se disolvieron de 1-5 mg de los extractos en un disolvente no aromático (etanol), posteriormente se añadió una gota de la mezcla de H₂SO₄ con formaldehído, esperando observar una coloración rojo-violeta.

Los resultados serán expresados de forma semicuantitativa a manera de signos: (-) como ausencia total del compuesto, (+) como presencia parcial del compuesto y (++) como presencia abundante del compuesto.

5.2. Objetivo 2 Evaluar el efecto citotóxico *in vitro* de los extractos de *A. monostachya* sobre células humanas de cáncer de colon.

En este estudio se emplearán las siguientes líneas celulares humanas de cáncer de colon, para evaluar el potencial efecto citotóxico *in vitro* de los extractos de *A. monostachya* comparándolas con una línea celular no tumoral.

5.2.1 Líneas celulares

Línea celular Vero: Células de riñón de mono verde africano, aisladas inicialmente en 1962, presentan una morfología epitelial (tipo fibroblastoide) con gran capacidad de

adherencia. El uso en la investigación se debe a las múltiples aplicaciones y versatilidad de este cultivo (Swanson et al., 1988)

Línea celular HT-29: Células con morfología epitelial, provenientes de un tumor primario de adenocarcinoma colorrectal humano, de característica adherente. Han sido ampliamente usadas para investigación relacionada al cáncer de colon, así como en investigaciones relacionadas al área de toxicología (Martínez-Maqueda et al., 2015).

Línea celular CaCo-2: Células con morfología epitelial, provenientes de un aislado clínico de adenocarcinoma colorrectal, con una morfología muy variable. Han sido ampliamente usadas en investigaciones relacionadas con el cáncer de colon y con la toxicología (Lea, 2015).

Los cultivos celulares fueron incubados empleando medio DMEM, alta glucosa (Dubeccos Modifed Eagle Medium 1x 4.5 g/L D-glucosa), suplementado con suero fetal bovino (Corning) al 10% y antibiótico/antimicótico 1%. Las líneas celulares fueron cultivadas a 37°C con una atmósfera con CO₂ al 5%.

5.2.2. Preparación de las soluciones de trabajo.

5.2.2.1. EA y EM:

Las soluciones de trabajo fueron preparadas a partir de una solución madre con una concentración de 5 mg/mL en un tubo eppendorf de 1.5 mL, disolviendo dicha cantidad de extracto en 50 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) 100% + 950 µL de medio de cultivo con una concentración final de DMSO al 5%. Posteriormente a partir de la solución

madre se prepararon diluciones con las siguientes concentraciones 0, 10, 50, 100, 300 y 500 $\mu\text{g/mL}$.

5.2.2.2. EH:

Para el EH se partió de una solución madre de 5 mg/mL en tubo eppendorf de 1.5 mL, disolviendo dicha cantidad de extracto en 50 μL de Acetona + 950 μL de medio de cultivo. Posteriormente partiendo de la solución madre se prepararon las diluciones a concentraciones de 0, 10, 50, 100, 300 y 500 $\mu\text{g/mL}$.

5.2.2.3. Análisis morfológico

La morfología celular es un indicativo que permite determinar el estresor de diversas sustancias administradas en los cultivos celulares. Esto se debe a que en condiciones normales las líneas células conservan su morfología y la integridad de la monocapa generada por la adherencia. En el caso de la línea CaCo-2 y Vero bajo condiciones normales presentan una morfología tipo fibroblastoide, pese a que son líneas celulares epiteliales, capaces de formar una monocapa confluyente. Mientras que la línea HT-29 presenta una morfología epitelial capaz de generar agregados celulares, que se considera la monocapa generada por las células. Por lo cual, una vez que los tratamientos son administrados, es posible observar las alteraciones morfológicas mediante microscopia de campo claro. Esto fue determinado basados en la metodología de citotoxicidad empleando el MTT al momento de retirar las placas de la incubadora para añadir 15 μL del reactivo MTT y tomar las micrografías de campo claro en el microscopio invertido NikonTS2.

5.2.2.4. Ensayo de citotoxicidad con MTT.

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

Para este ensayo los cultivos celulares se sembraron en placas de 96 pocillos a una concentración de 7.5×10^3 células (CaCo-2 y Vero) y 1.5×10^4 células HT-29 por pozo (n=7) y fueron incubados por 24 h para permitir su adhesión. Posteriormente, se aplicaron los tratamientos de cada extracto a concentraciones de 10, 50, 100, 300 y 500 $\mu\text{g/ml}$. Como control negativo se emplearon los cultivos celulares sin la administración de los extractos. Los resultados fueron analizados a las 24 y 48 h, posterior a la administración de los extractos, se añadieron 15 μL del reactivo MTT a cada pozo dos horas antes del término de los periodos de incubación, posteriormente las placas se incubaron a 37°C , con atmosfera de CO_2 5%, hasta el término del periodo de exposición al tratamiento. Terminado el periodo de incubación el medio fue retirado para luego añadir el revelador del MTT (HCl 4 mM, 0.040% NP40 e isopropanol), las placas con el revelador fueron agitadas durante 10 minutos a 125 RPM. La lectura de las absorbancias se realizó en un

lector de microplacas Biorad () con dos filtros, un filtro de 590 nm para la absorbancia y un filtro de 620 nm como referencia.

5.2.2.5. Ensayo de contraste de núcleos con DAPI.

Con el fin de relacionar los resultados obtenidos en el ensayo de MTT, se empleó la tinción nuclear DAPI, el colorante fluorescente DAPI (4, 6-diamidino-2-fenilindol) al unirse a los ácidos nucleicos de las células adheridas, permitirá estimar el porcentaje de área cubierta por células viables relacionada con la adherencia celular. Para esto, fueron sembradas las células en placas de 96 pozos a las mismas condiciones y tratamientos del ensayo MTT. Al terminar los tiempos de incubación, se retiró el medio realizando 2 lavados de 200 μ L con PBS 1X, posteriormente las células fueron fijadas con metanol/acetona 1:1 por 20 minutos a 4°C. Después, fue retirado el fijador realizando nuevamente 2 lavados con PBS 1X, posteriormente se añadieron 100 μ L de DAPI (100 ng/ml) por 15 minutos a TA en oscuridad. Finalmente, el DAPI fue retirado realizando un lavado con PBS 1X, al final del lavado se procedió a dejar 100 μ L de PBS 1X. La placa fue observada a microscopia de fluorescencia NikonTS2, se tomaron fotografías y se analizaron con el software Image J® v 1.51, calculando el porcentaje de área cubierta por las células adheridas en cada uno de los pozos.

Con las metodologías anteriormente descritas, se logró determinar el extracto de mayor actividad citotóxica y la concentración de mayor efecto.

5.3.- Objetivo 3 Analizar el tipo de muerte celular inducida por el extracto de *A. monostachya* con mayor actividad biológica *in vitro*.

Los procesos de muerte celular son aquellos que se inducen una vez que los cultivos celulares son sometidos a tratamientos. La apoptosis, uno de los mecanismos de muerte celular programada, es el efecto más buscado por los tratamientos quimioterapéuticos, ya que es una muerte celular controlada que evita procesos indeseables en los sistemas biológicos. La necrosis, otro mecanismo de muerte, es un proceso que genera una muerte menos controlada de las células, ya que en sistemas biológicos es posible que este mecanismo logre inducir reacciones no deseadas relacionadas a los procesos de inflamación. Por ello radica la importancia de determinar qué tipo de muerte celular se induce (Raffray & Cohen, 1997). Para determinar el tipo de muerte celular se empleó un kit de fluorescencia (abcam ab176749).

5.3.1. Análisis de la apoptosis *in vitro* mediante fluorescencia.

Fueron sembradas 7.5×10^3 células (CaCo-2 y Vero) y 1.5×10^4 células HT-29 por pozo analizado, dejando incubar 24 h a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5%, posteriormente se añadió el EH a la concentración de mayor efecto citotóxico (100 µg/mL), aunado a ello se añadieron las concentraciones de mayor efecto citotóxico del EA y EM (300 µg/mL). Una vez añadidos los extractos, los cultivos celulares se incubaron por 24 h, bajo las condiciones previamente descritas. Posterior al periodo de incubación, se añadieron 204 µL de una mezcla compuesta de 1 µL de reactivo calceina, 1 µL de 7-AAD y 2 µL de Apoxin Green en 200 µL de buffer de reacción previsto del kit). Una vez añadido la mezcla se incubó durante 50 minutos, TA y en oscuridad. Posteriormente la mezcla fue retirada cuidadosamente de cada pozo de la placa de 96 pocillos, realizando así la lectura de los resultados empleando el microscopio NikonTS2.

5.4. Análisis de los datos

5.4.1. Resultados de viabilidad relativa MTT

Los datos obtenidos de la prueba del MTT fueron normalizados empleando el paquete estadístico Excel, posteriormente empleando el paquete estadístico Prisma se realizó la estadística correspondiente.

5.4.2.- Resultados de tinción nuclear DAPI

Las micrografías de fluorescencia obtenidas empleando el microscopio invertido NikonTS2 fueron analizadas en el software Image J® v 1.51 con el fin de obtener la densidad integrada. Los datos obtenidos fueron procesados en el paquete estadístico Prisma realizando la estadística correspondiente.

5.4.3.- Resultados del kit Apoptosis/Necrosis

Las micrografías de fluorescencia obtenidas empleando el microscopio invertido NikonTS2 fueron analizadas en el software Image J® v 1.51, realizando un merge de los tres canales analizados (Rojo, Verde y Azul) con el fin de realizar un conteo celular de la señal de positividad, los valores obtenidos posteriormente fueron sometidos al paquete estadístico Prisma.

5.5. Análisis estadístico.

5.5.1. Estadística descriptiva

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

5.5.2. Estadística inferencial

Se aplicó la prueba de normalidad de Kolmogórov-Smirnov para evaluar la distribución de los datos, teniendo que todas las variables posean una distribución normal. Después se realizó una prueba ANOVA para evaluar la presencia de diferencias entre los tratamientos, con un valor de $p < 0.05$.

6. Resultados

6.1. Colecta del material vegetal

La colecta fue realizada en la localidad de Zona Loma Larga Oriente ubicada en el municipio de San Pedro Garza García, Nuevo León ($25^{\circ}39'21.9''N$, $-100^{\circ}20'07.3.14''W$), en agosto de 2024. Se colectaron las hojas de la planta *A. monostachya*, previamente identificada. El material vegetal obtenido fue secado durante 3 días a TA, con el fin de retirar el agua presente en las hojas evitando así la presencia de hongos.

6.2. Rendimiento de los extractos obtenidos.

Los rendimientos obtenidos del EA, EM y el EH, provenientes de las hojas, se aprecian en la tabla 1. Los extractos obtenidos presentan una consistencia pastosa, con una tonalidad verde-marrón. El extracto de mayor rendimiento corresponde con el EM, seguido del EA y en última instancia el EH.

Tabla 1: Rendimientos de los extractos obtenidos, posterior a la eliminación de los solventes.

Rendimientos obtenidos		
Extracto	Peso 10g	Rendimiento %
EA	10g	17.48
EM	10g	19.9
EH	10g	0.393

6.3. Caracterización parcial fitoquímica

Los resultados obtenidos del tamizaje parcial fitoquímico parcial fueron comparados con un control negativo, siendo este el solvente de cada uno de los extractos generados. Posteriormente los resultados fueron expresados de forma semicuantitativa basados en la intensidad de la reacción colorimétrica de casa uno de los extractos.

Los resultados obtenidos de los extractos de *A. monostachya* mostraron la presencia de compuestos químicos relacionados con familias de metabolitos secundarios como los grupos de oxidrilos fenólicos, del cual el EM mostró una cantidad abundante de estos compuestos dada la reacción colorimétrica de mayor intensidad y uniformidad, seguido por el EA y el EH, los cuales presentaron una presencia moderada de estos compuestos. En cuestión de la presencia de esteroides y terpenos, podemos observar como el EM tiene un mayor desarrollo del anillo en la interfase generada por lo cual se destaca la presencia abundante de metabolitos relacionados con los esteroides y terpenos, seguido del EH con una positividad moderada de estos compuestos. En relación con la prueba para la presencia

de Cumarinas, podemos observar cómo los 3 extractos muestran una presencia de estos compuestos, sin embargo, observamos que el EM presenta una cantidad abundante de estos compuestos, dada la coloración amarilla y uniforme presente, seguido del EA y el EH los cuales muestran una coloración amarilla menos intensa, relacionada con la presencia moderada de los compuestos. Esto se puede apreciar en la figura 4.

Prueba	Extracto acuoso	Extracto metanólico	Extracto hexánico
Prueba de insaturaciones	 -	 -	 -
Prueba de Grupos carbonilos	 -	 -	 -
Prueba de oxidrilos fenólicos	 +	 ++	 +
Prueba de esteroides y terpenos	 -	 ++	 +
Prueba de carbohidratos	 -	 -	 -
Prueba de Cumarinas	 +	 ++	 +

Figura 4.- Tamizaje fitoquímico parcial de los extractos crudos de las hojas de *A. monostachya*. La columna de la izquierda corresponde con los nombres de las pruebas realizadas a los extractos, las columnas subsecuentes corresponden con los extractos empleados, así como las reacciones colorimétricas de cada prueba realizada. La nomenclatura de los resultados corresponde de la siguiente forma: (-) ausencia del compuesto, (+) presencia moderada del compuesto y (++) presencia abundante del compuesto.

El EM mostró la presencia de compuestos químicos relacionados con las sesquiterpenolactonas de forma moderada, mientras que el EA y el EH mostraron una ausencia de estos metabolitos. La presencia de compuestos relacionados a los flavonoides fue abundante para el EH y el EM debido a la coloración del medio de reacción, así como en la uniformidad de la reacción, mientras que para el EA este solo mostró una presencia moderada de estos compuestos. En cuestión de la presencia de alcaloides podemos observar cómo destaca la abundancia de estos compuestos en el EH, debido a la uniformidad de la coloración y al cambio colorimétrico obtenido, mientras que en el EM podemos observar una presencia moderada de estos compuestos, ya que el cambio colorimétrico fue tenue y no intenso como en el caso del EH, así mismo podemos observar como en el EA la reacción colorimétrica fue casi imperceptible, tal como se aprecian en la figura 5 en conjunto con las reacciones colorimétricas.

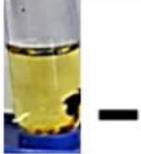
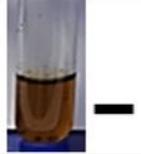
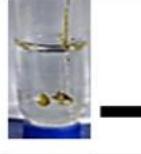
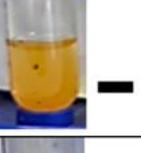
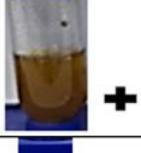
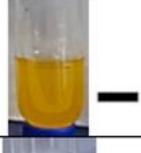
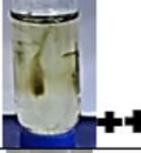
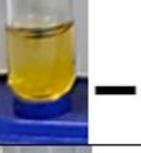
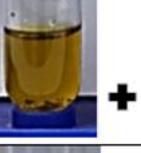
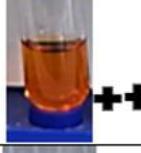
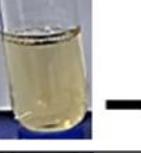
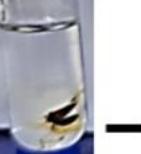
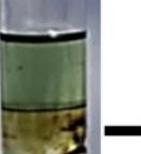
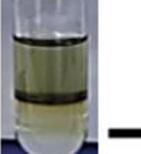
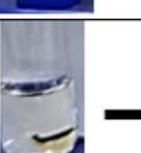
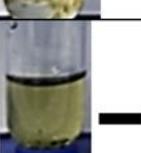
Prueba	Extracto acuoso	Extracto metanólico	Extracto hexánico
Prueba de lactonas	 -	 -	 -
Prueba de sesquiterpenolactonas	 -	 +	 -
Prueba de flavonoides	 +	 ++	 ++
Prueba de alcaloides	 -	 +	 ++
Prueba de Saponinas (NaHCO ₃)	 -	 +	 +
Prueba de Salkowski	 -	 -	 -
Prueba de aromaticidad	 -	 -	 -

Figura 5 Tamizaje fitoquímico parcial de los extractos crudos de las hojas de *A. monostachya*. La columna de la izquierda corresponde con los nombres de las pruebas realizadas a los extractos, las columnas subsecuentes corresponden con los extractos empleados, así como las reacciones colorimétricas de cada prueba realizada. La nomenclatura de los resultados corresponde de la siguiente forma: (-) ausencia del compuesto, (+) presencia moderada del compuesto y (++) presencia abundante del compuesto.

6.4. Alteraciones morfológicas inducidas por los extractos en las líneas celulares humanas de cáncer de colon.

Con el fin de determinar si los extractos de *A. monostachya* presentan un efecto citotóxico sobre las líneas celulares de cáncer de colon CaCo-2 y HT-29 y una línea no tumoral, se realizó una observación a microscopia de campo claro a 24 y 48 horas posteriores a la administración de los tratamientos.

En la figura 6 se aprecian las micrografías de campo claro de las líneas celulares empleadas expuestas a 0 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de los extractos administrados durante 24 horas. Estos resultados muestran como el EA a bajas concentraciones no es capaz de inducir alguna alteración morfológica en las líneas celulares empleadas. Sin embargo, esto cambia levemente en el EM, pues sobre la línea celular CaCo-2 se logran apreciar alteraciones morfológicas, como el cambio en la forma tipo fibroblastoide a una forma más redondeada que pudiese ser indicativo de alguna alteración por estrés celular. Este fenómeno se logra apreciar a mayor escala al administrar el EH, pues a esta concentración podemos observar como la morfología de esta línea celular cambia drásticamente, mostrando ser la línea de mayor sensibilidad.

En el caso de la línea Vero se logra apreciar como a esta concentración la morfología tiende a persistir, así como la monocapa formada. En el caso de la línea HT-29, logramos observar que esta tiende a persistir a bajas concentraciones de los extractos, incluso en el EH.

Estos efectos o cambios en la morfología que sugiere un proceso de alteración celular, como la inducción de un proceso de muerte, se incrementan con forme aumentan

las concentraciones de los extractos administrados, tal como se aprecia en la figura 7, en la cual podemos observar como a 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la morfología celular de la línea CaCo-2 y HT-29 se ven más alteradas en comparación con la línea no tumoral Vero, que si llega a presentar algunas alteraciones mínimas.

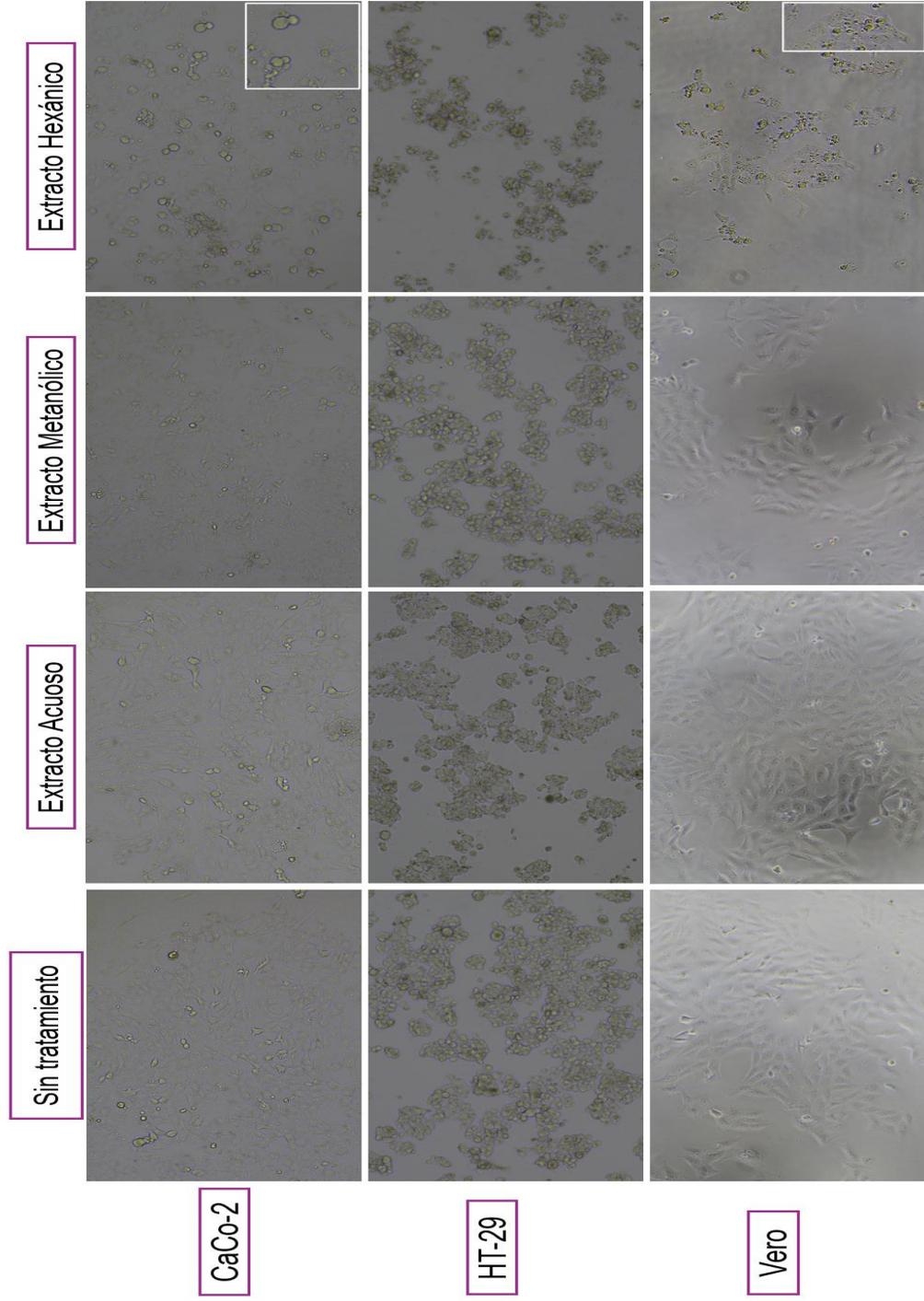


Figura 6. Líneas celulares expuestas a bajas concentraciones (10 µg/mL) de los extractos de A. monostachya durante 24 horas. Se muestra una columna de células que no han sido expuestas a los extractos, seguido de las células que fueron expuestas al EA, EM y EH.

Los efectos en la disminución de la confluencia son más evidentes en la línea CaCo-2 conforme aumentan las concentraciones de los tres extractos. Podemos observar cómo a 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la línea CaCo-2 muestra más células con una morfología esférica, sugestiva de células que entran en un proceso de daño celular, esto es apreciable en los tres extractos, sin embargo, podemos observar como este fenómeno se presenta en mayor escala en el EH. Mientras que en la línea Vero este efecto de alteración morfológica fue más notorio en el EM en donde podemos observar cómo se presenta una mayor alteración morfológica y una disminución notoria en la confluencia de las células.

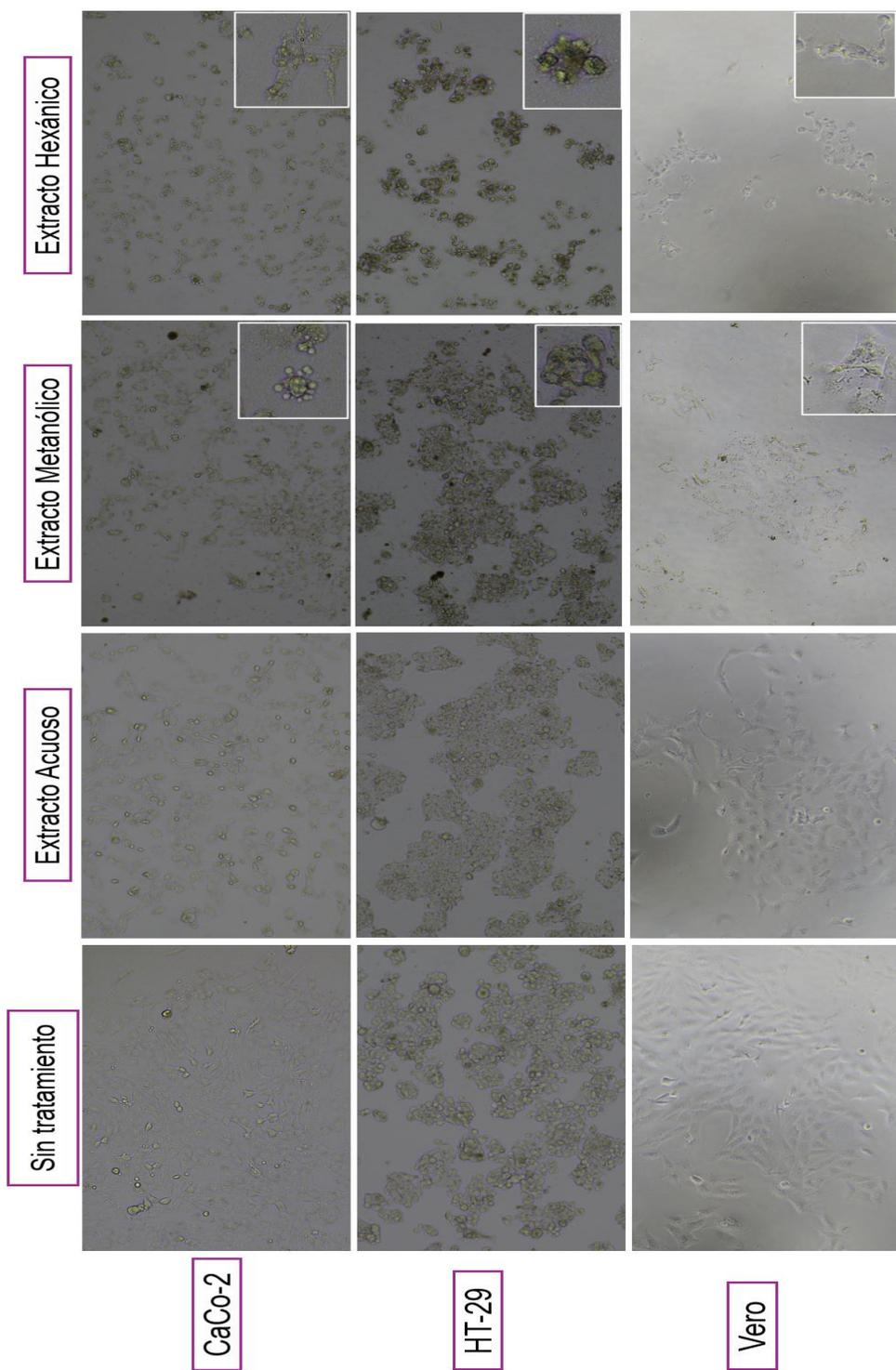


Figura 7. Líneas celulares expuestas a altas concentraciones (300 µg/mL) de los extractos de *A. monostachya* durante 24 horas. Se muestra una columna de células que no han sido expuestas a los extractos, seguido de las células que fueron expuestas al EA, EM y EH.

Sin embargo, en el caso de la línea celular HT-29, podemos observar cómo solo el EH mostró una disminución en la confluencia de las células y como pese a su característica de formar cúmulos o agregados celulares, a la concentración administrada estos se disgregan e individualizan las células. Estos fenómenos ya mencionados aumentaron a concentraciones de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el cual se aprecian una disminución considerable de la confluencia de las células CaCo-2 y HT-29, mientras que en el caso de la línea celular Vero, la monocapa se logró mantener con células que preservaban la morfología presentando solo leves alteraciones.

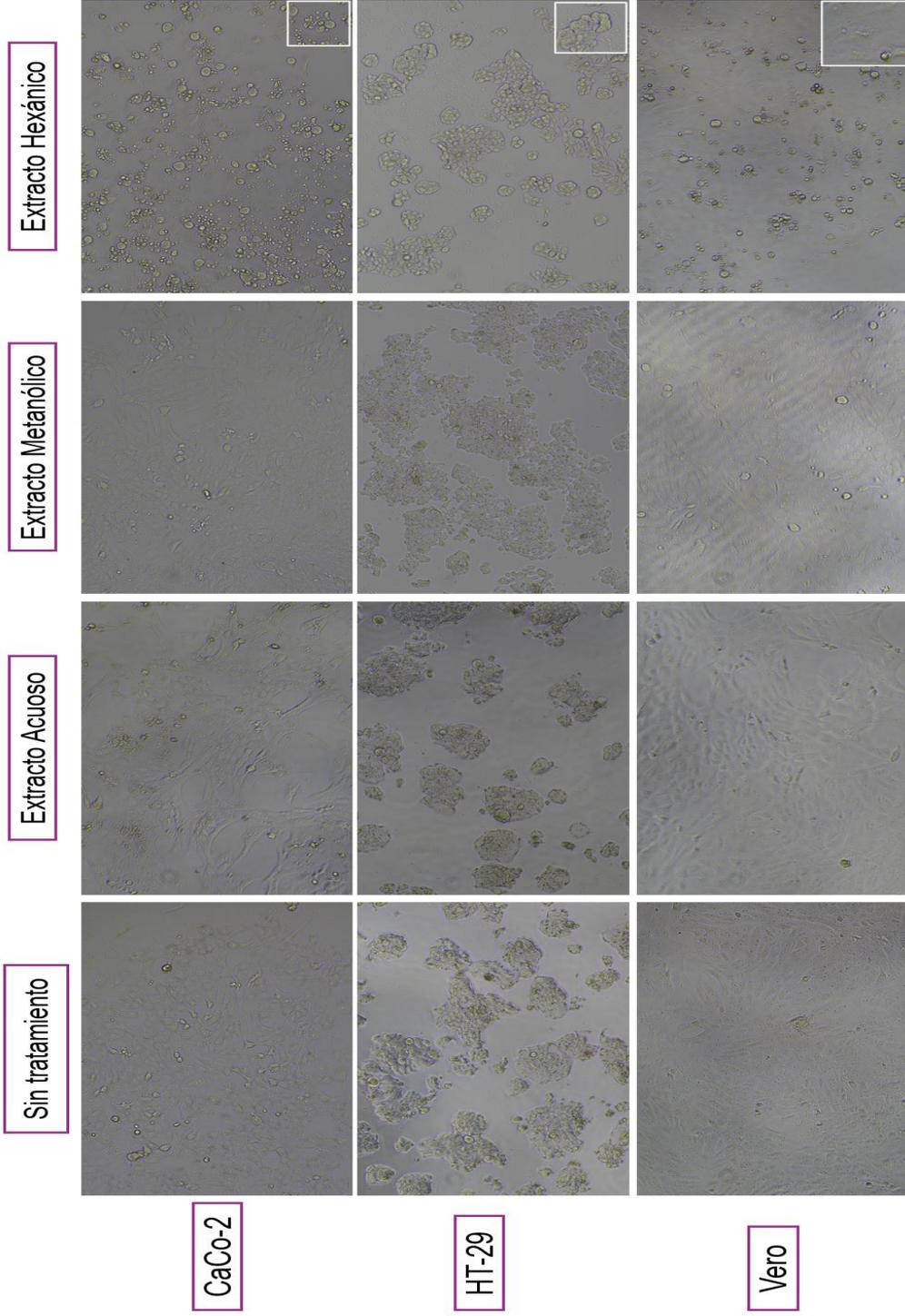


Figura 8 Líneas celulares expuestas a bajas concentraciones (10 µg/mL) de los extractos de *A. monostachya* durante 48 horas. Se muestra una columna de células que no han sido expuestas a los extractos, seguido de las células que fueron expuestas al EA, EM y EH.

La exposición a 48 horas de los extractos mostró un efecto similar en cuanto al EA, en las líneas celulares (Vero, CaCo-2 y HT-29), ya que a bajas concentraciones del extracto las líneas celulares no presentaron cambios en la morfología ni en la disminución de la confluencia. Este fenómeno se presentó en el EM, pues a bajas concentraciones no se apreciaron alteraciones morfológicas en las líneas celulares empleadas, sin embargo, en cuestión del EH, podemos observar como a bajas concentraciones, de 10 µg/mL, se pierde casi en su totalidad la monocapa de las células CaCo-2 y comenzamos a observar una gran cantidad de células con una morfología esférica sugestiva de un estrés celular inducido, tal como se aprecia en la figura 8. Debido a que este tratamiento se colocó a 48 horas es notable que este fenómeno se presenta aumentado en comparación con aquellas células expuestas a 24 horas.

En el caso de la línea Vero esta mostró una mayor susceptibilidad al EM conforme aumentaban las concentraciones del extracto administrado, sin embargo, a 10 µg/mL no presentó alteraciones en su morfología ni una reducción en la monocapa. La línea Vero fue capaz de tolerar el EH expuesto a 48 horas a bajas concentraciones, presentando solo una leve alteración en su morfología.

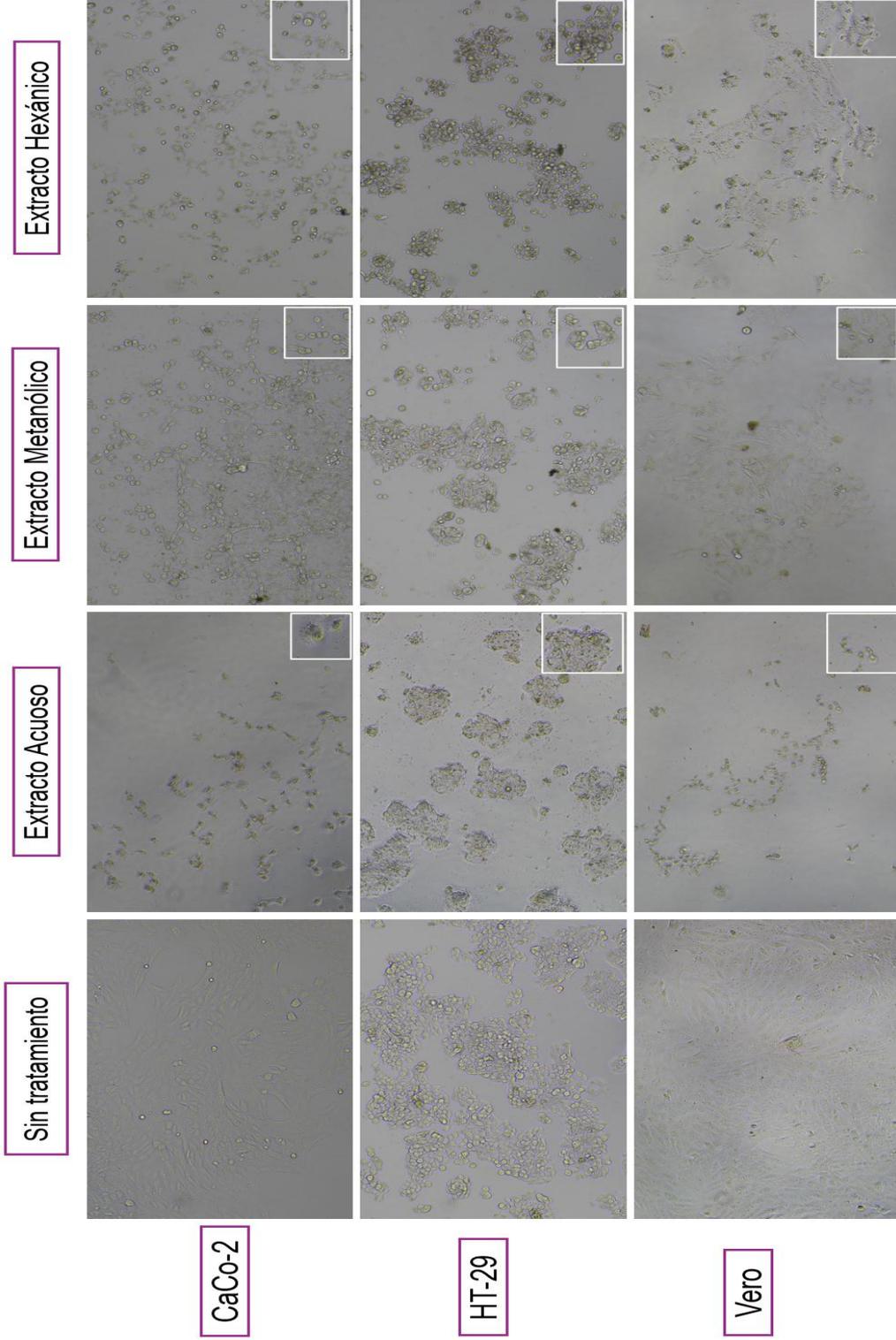


Figura 9 Líneas celulares expuestas a concentraciones (300 µg/mL) de los extractos de *A. monostachya* durante 48 horas. Se muestra una columna de células que no han sido expuestas a los extractos, seguido de las células que fueron expuestas al EA, EM y EH.

6.3 Los extractos de *A. monostachya* reducen la viabilidad de las células tumorales humanas de cáncer de colon.

Posterior a la observación de la morfología celular de las líneas tratadas con los extractos, se analizó si estos tenían el potencial de reducir la viabilidad mediante un ensayo de medición de actividad mitocondrial MTT. Este reactivo emplea una sal de tetrazolio, el cual será metabolizado (reducido) en las mitocondrias de las células dando paso a la formación de un compuesto azul-morado insoluble. Dicho compuesto fue medido mediante un equipo para determinar la absorbancia del compuesto.

Los resultados obtenidos en cuestión del EA a 24 horas de exposición mostraron que la línea CaCo-2 y Vero fue susceptible solo a concentraciones superiores de 300 $\mu\text{g/mL}$, mientras que en la línea HT-29 no mostró una disminución significativa de la viabilidad celular. Los resultados del EA a 48 horas mostraron que la línea tumoral CaCo-2 fue más susceptible a las concentraciones anteriormente mencionadas, mientras que la línea Vero de igual forma disminuye su viabilidad celular drásticamente a estas concentraciones. En el caso de la línea HT-29 de igual forma se muestra que no hay una disminución significativa en su viabilidad celular, tal como se aprecia en la figura 10.

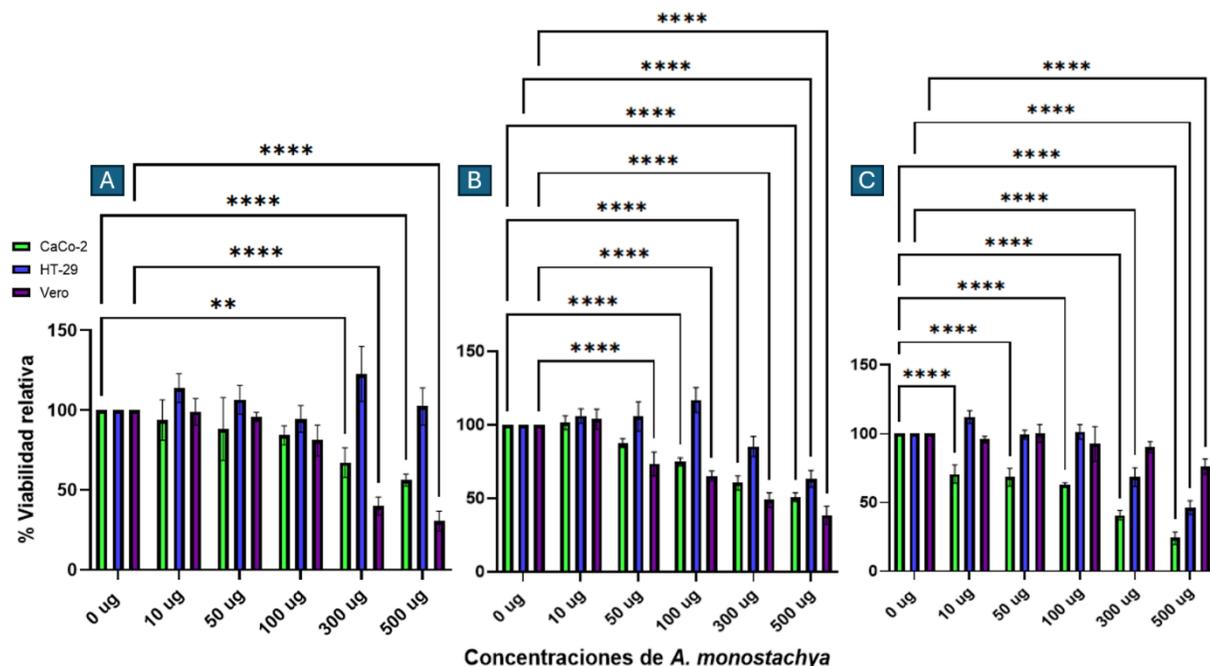


Figura 10. Porcentajes de viabilidad celular relativa de las líneas celulares tras 24 horas de exposición a los extractos. A) EA, B) EM y C) EH.

Los resultados obtenidos al administrar el EM a 24 horas mostraron que la línea tumoral CaCo-2 fue mucho más susceptible a concentraciones superiores a 50 µg/mL notando que conforme aumenta la concentración hasta 500 µg/mL la viabilidad de esta línea celular baja hasta un 60%, mientras que la línea HT-29 se mantiene por encima del 60% incluso a concentraciones altas, tal como se aprecia en la figura 10B.

A 48 horas de exposición con el EM, podemos observar cómo la línea tumoral CaCo-2 sigue mostrando una alta sensibilidad a dosis posteriores a 50 µg/mL hasta llegar a concentraciones más elevadas de 500 µg/mL en comparación con la línea tumoral HT-29. La línea CaCo-2 muestra una reducción por debajo del 50% solo a concentraciones de 300 y 500 µg/mL, esta última concentración mencionada mostró a su vez una alta disminución de la viabilidad de la línea HT-29, llegando casi al 50% en comparación con la exposición a 24 horas, tal como podemos observar en la figura 11.

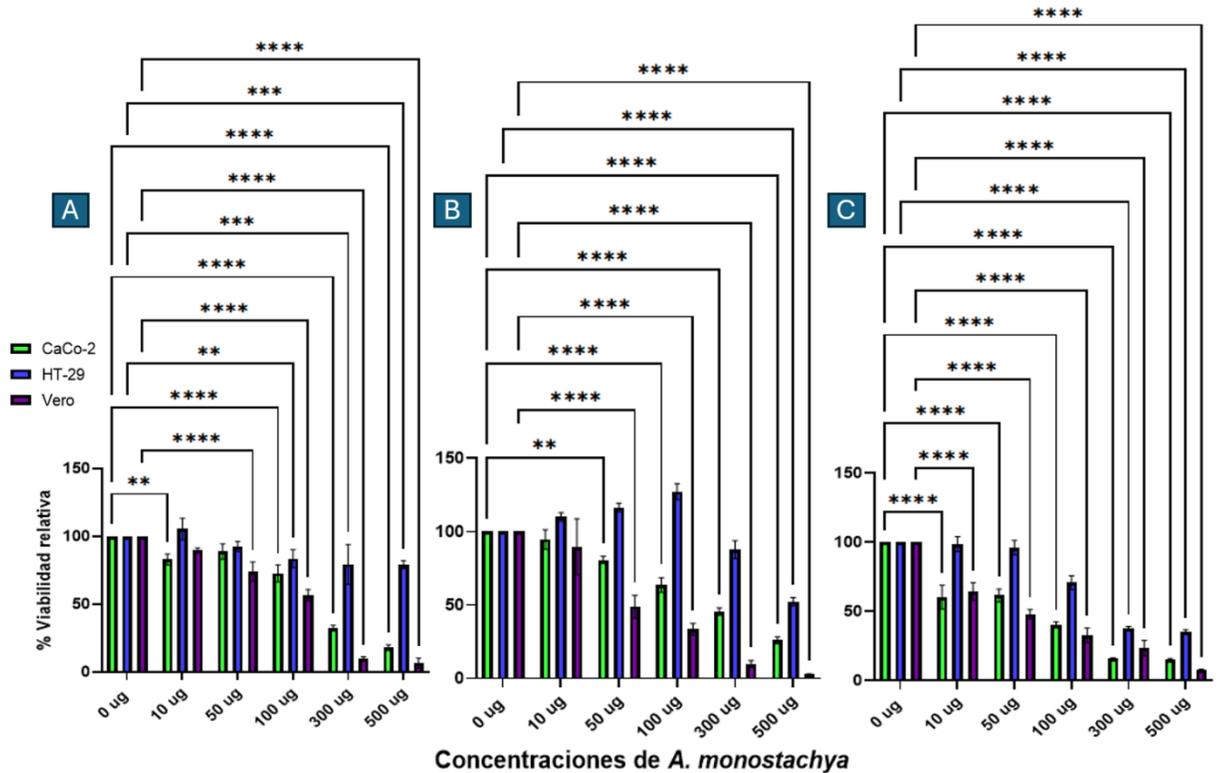


Figura 11. Porcentajes de viabilidad celular relativa de las líneas celulares tras 48 horas de exposición a los extractos. A) EA, B) EM y C) EH.

En la línea celular Vero, tanto a 24 y 48 horas, observamos una disminución de la viabilidad dependiente de dosis y tiempo posterior a la concentración de 10 µg/mL, tal como podemos observar en la figura 10 y 11.

Las líneas celulares expuestas al EH durante 24 horas mostraron una disminución de la viabilidad celular dependiente de la concentración administrada, sin embargo, los efectos son notables incluso en las concentraciones más bajas. Al administrar la concentración de 10 µg/mL podemos observar como la viabilidad disminuye al 60% y conforme aumentan las concentraciones se observa que esta línea en particular disminuye notablemente su actividad mitocondrial. La línea HT-29 solo responde a las concentraciones más altas, tomando en cuenta que a 300 µg/mL la viabilidad de esta línea celular se encuentra cercano al 50%, disminuyendo drásticamente al administrar 500

$\mu\text{g/mL}$, tal como se aprecia en la figura 10.

Las líneas celulares expuestas al EH durante 48 horas mostraron que la línea CaCo-2 presenta una mayor sensibilidad al extracto, pues de igual forma a concentraciones bajas podemos observar cómo disminuye su viabilidad cerca del 60% y conforme aumenta las concentraciones disminuye drásticamente. Mientras que la línea HT-29 solo responde a concentraciones superiores a $100 \mu\text{g/mL}$, como se aprecia en la figura 11. La línea celular Vero expuesta a 48 horas, mostró una sensibilidad al extracto incluso a concentraciones bajas, esto muestra una susceptibilidad dependiente del tiempo y de la concentración empleada, tal como se aprecia en la figura 11.

Los datos obtenidos nos permitieron determinar cuál es el extracto de mayor efecto citotóxico, observado en la figura 12. En este se demuestra que el EH es el que mayor efecto citotóxico ejerce sobre la línea tumoral CaCo-2 a una concentración de $100 \mu\text{g/mL}$ donde se ve un efecto de muerte en un 60%, mientras que la línea no tumoral Vero no muestra una disminución significativa en su viabilidad a estas concentraciones. En el caso de la línea HT-29 podemos observar como el extracto de mayor efecto citotóxico sigue siendo el EH, sin embargo, este efecto solo se presenta a altas concentraciones, concentraciones donde incluso la línea Vero tiende a mantener una viabilidad alta.

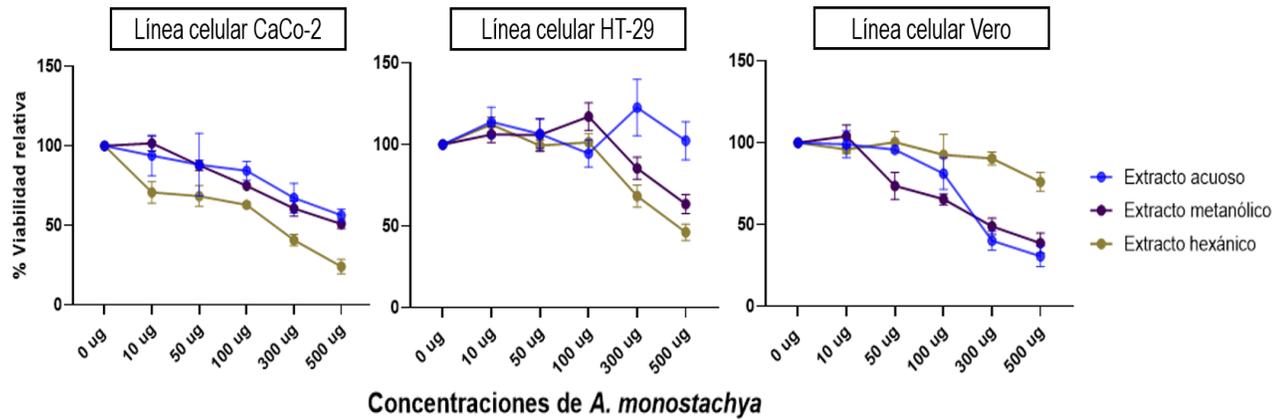


Figura 12. Determinación del extracto de mayor efecto biológico a 24 horas de exposición. Las gráficas muestran la respuesta de los cambios en la viabilidad relativa de las líneas celulares conforme fueron administrados los tratamientos del EA, EM y EH sobre las líneas celulares.

Esto se relaciona con lo observado a 48 horas, en el cual confirmamos nuevamente que el EH sigue siendo el extracto de mayor efecto citotóxico. Mientras que los otros dos extractos empleados solo responden a altas concentraciones de estos.

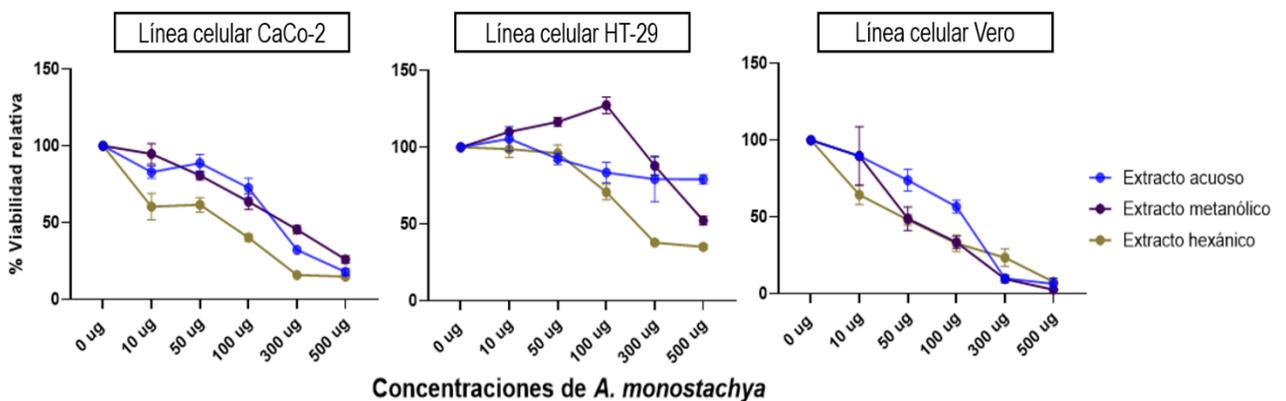


Figura 13. Determinación del extracto de mayor efecto biológico a 48 horas de exposición. Las gráficas muestran la respuesta de los cambios en la viabilidad relativa de las líneas celulares conforme fueron administrados los tratamientos del EA, EM y EH sobre las líneas celulares.

6.4 Los extractos de *A. monostachya* reducen la confluencia celular e inducen cambios en la morfología nuclear.

Con el fin de relacionar lo observado en la prueba de viabilidad relativa, se realizó un marcaje nuclear DAPI, este emplea un elemento que se intercala en el material genético permitiendo observar los núcleos de las células que se encuentran formando la monocapa y aunado a ello demostrar la alteración de la estructura nuclear, con lo cual se logra corroborar cual es el extracto de mayor efecto citotóxico y la concentración más efectiva. Así mismo mediante un análisis morfométrico obteniendo la derivada de intensidad de la fluorescencia, podemos observar una disminución o reducción de las células que conforman la monocapa posterior a la aplicación de los tratamientos.

La exposición al EA a 24 horas en las líneas celulares mostró una disminución en el porcentaje de células presentes por pozo en la línea Vero. En este caso podemos observar como a concentraciones de 300 y 500 $\mu\text{g/mL}$ el porcentaje de células disminuye incluso más que en las líneas tumorales. De las cuales solo la línea CaCo-2 mostró una mayor sensibilidad a 300 y 500 $\mu\text{g/mL}$, en comparación con la línea HT-29 que logró tolerar incluso las altas concentraciones de este extracto, este mismo patrón logra repetirse con el extracto expuesto a 48 horas. Sin embargo, en el caso del EM, podemos observar de igual forma que la línea Vero mostró una sensibilidad a concentraciones superiores de 50 $\mu\text{g/mL}$ y en concentraciones altas de 500 $\mu\text{g/mL}$ baja totalmente la presencia de los núcleos celulares. La línea CaCo-2 solo es susceptible a concentraciones por arriba de 300

$\mu\text{g/mL}$, mientras que la línea HT-29 pareciera no mostrar una sensibilidad a este extracto.

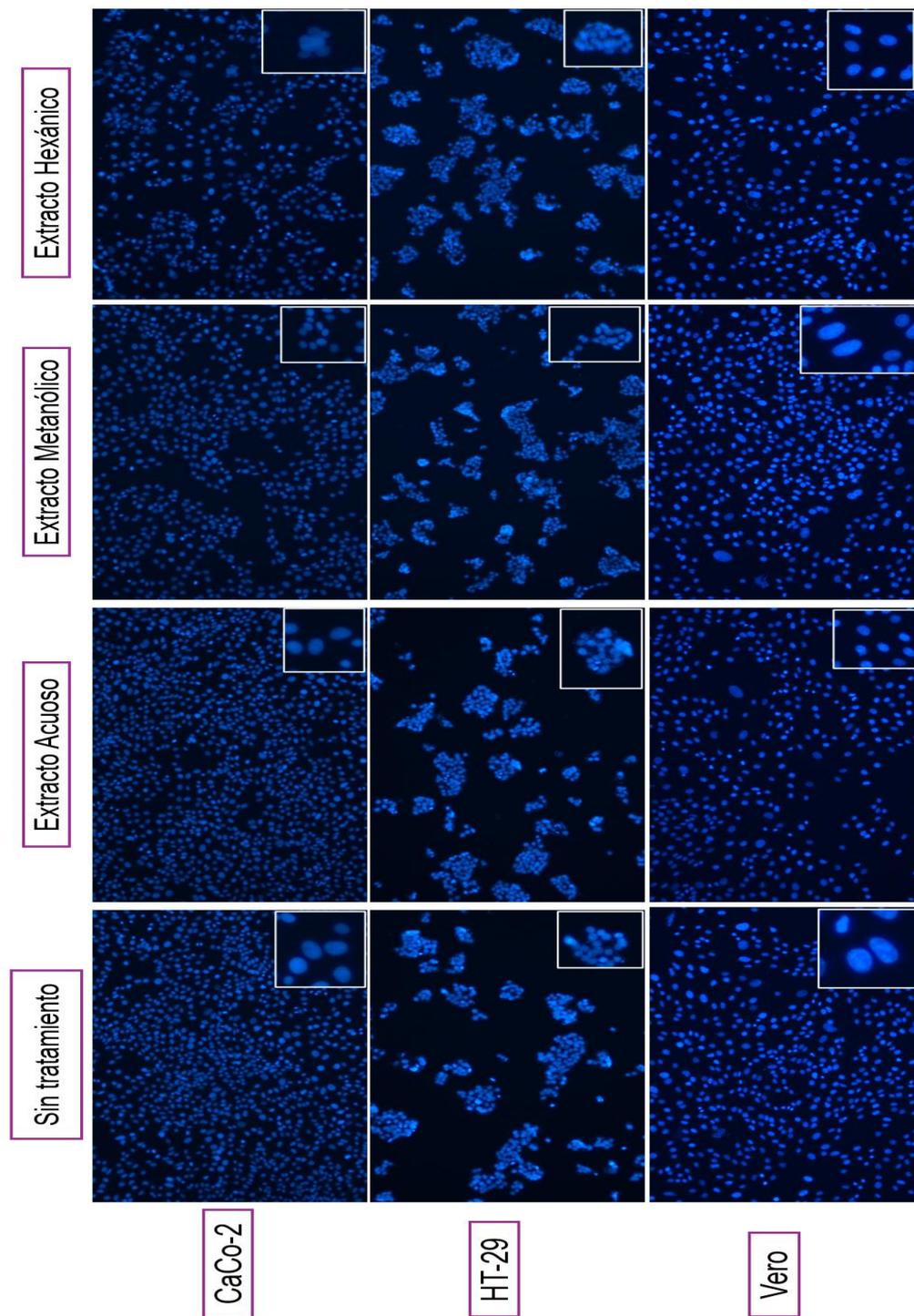


Figura 13. Líneas celulares expuestas a bajas concentraciones (10 $\mu\text{g/mL}$) de los extractos de *A. monostachya* durante 24 horas. Se muestran cultivos celulares que no han sido expuestas a los extractos, y cultivos de células expuestas al EA, EM y EH.

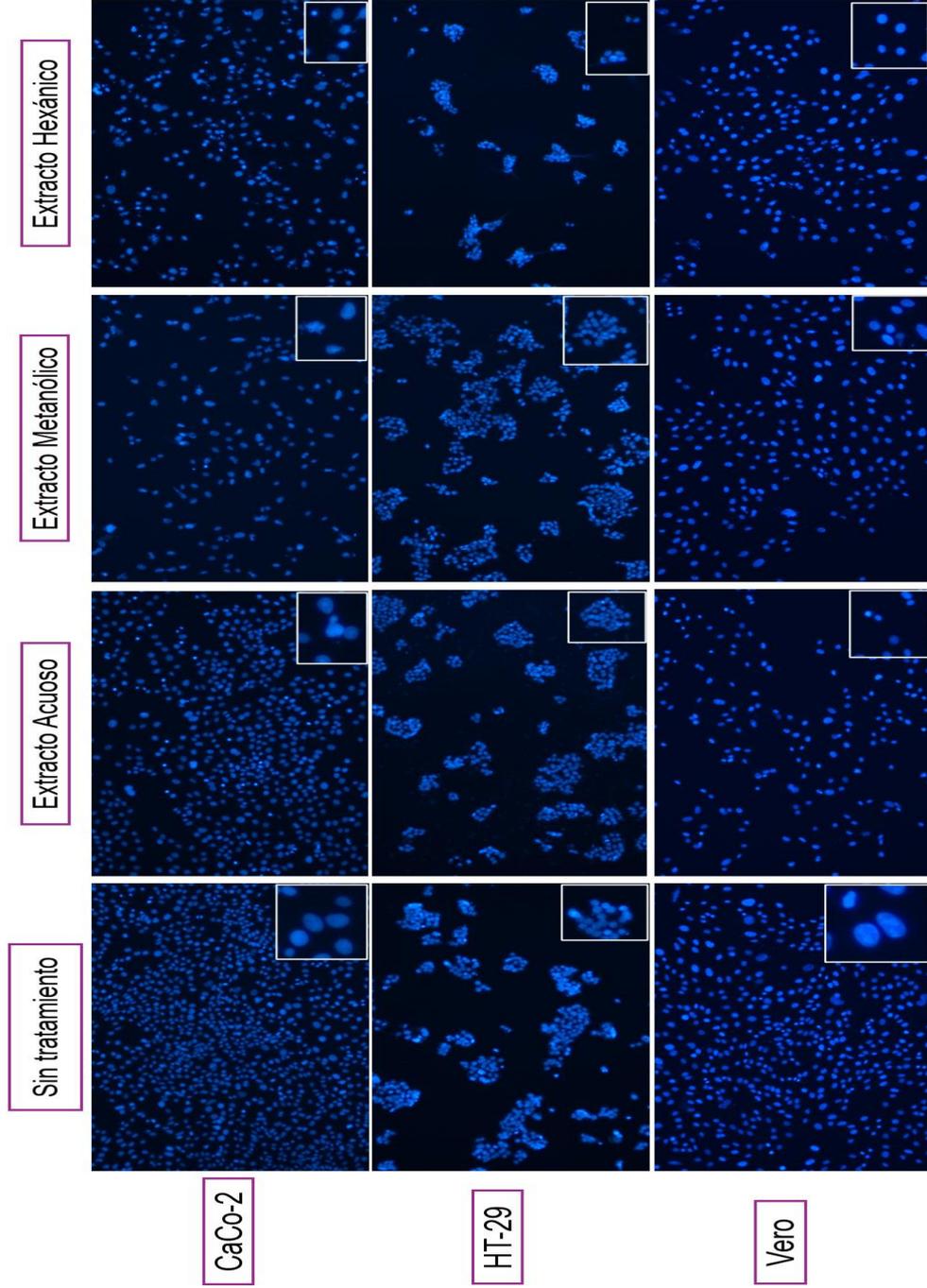


Figura 14. Líneas celulares expuestas a altas concentraciones (300 µg/mL) de los extractos de *A. monostachya* durante 24 horas. Se muestran cultivos celulares que no han sido expuestas a los extractos, y cultivos de células expuestas al EA, EM y EH.

Este mismo patrón se repite con el tratamiento expuesto a 48 horas, sin embargo, en este caso vemos con la línea Vero fue incluso más susceptible, tal como se aprecia en la figura 13 y 14 respectivamente. La exposición del EH a 24 horas mostró en este caso un mayor efecto en la línea CaCo-2 por debajo del 50% de células adheridas, ya que esta línea celular fue mucho más sensible en comparación con la línea HT-29, la cual solo responde a altas concentraciones. Mientras que la línea Vero mostró un mayor porcentaje de células adheridas en comparación con las líneas tumorales, esto sugiere que la línea Vero es capaz de resistir o tolerar altas concentraciones del EH a 24 horas, tal como podemos observar en la figura 14.

En la exposición al EH a 48 horas, observamos que la línea CaCo-2 presentó una mayor susceptibilidad al extracto a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mientras que la línea HT-29 no mostró una disminución del porcentaje de células adheridas, la susceptibilidad de esta línea tumoral fue mayor solo a concentraciones superiores de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En la línea Vero, se observa que, aunque hay una disminución del porcentaje de células con adherencia desde las concentraciones bajas de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, este porcentaje de confluencia se mantiene cercano al 50%, incluso durante la exposición de concentraciones de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en comparación con la línea CaCo-2. Sin embargo, al llegar a la concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se observó que el porcentaje de las células adheridas disminuye drásticamente, así como se observa en la figura 15 y 16 respectivamente.

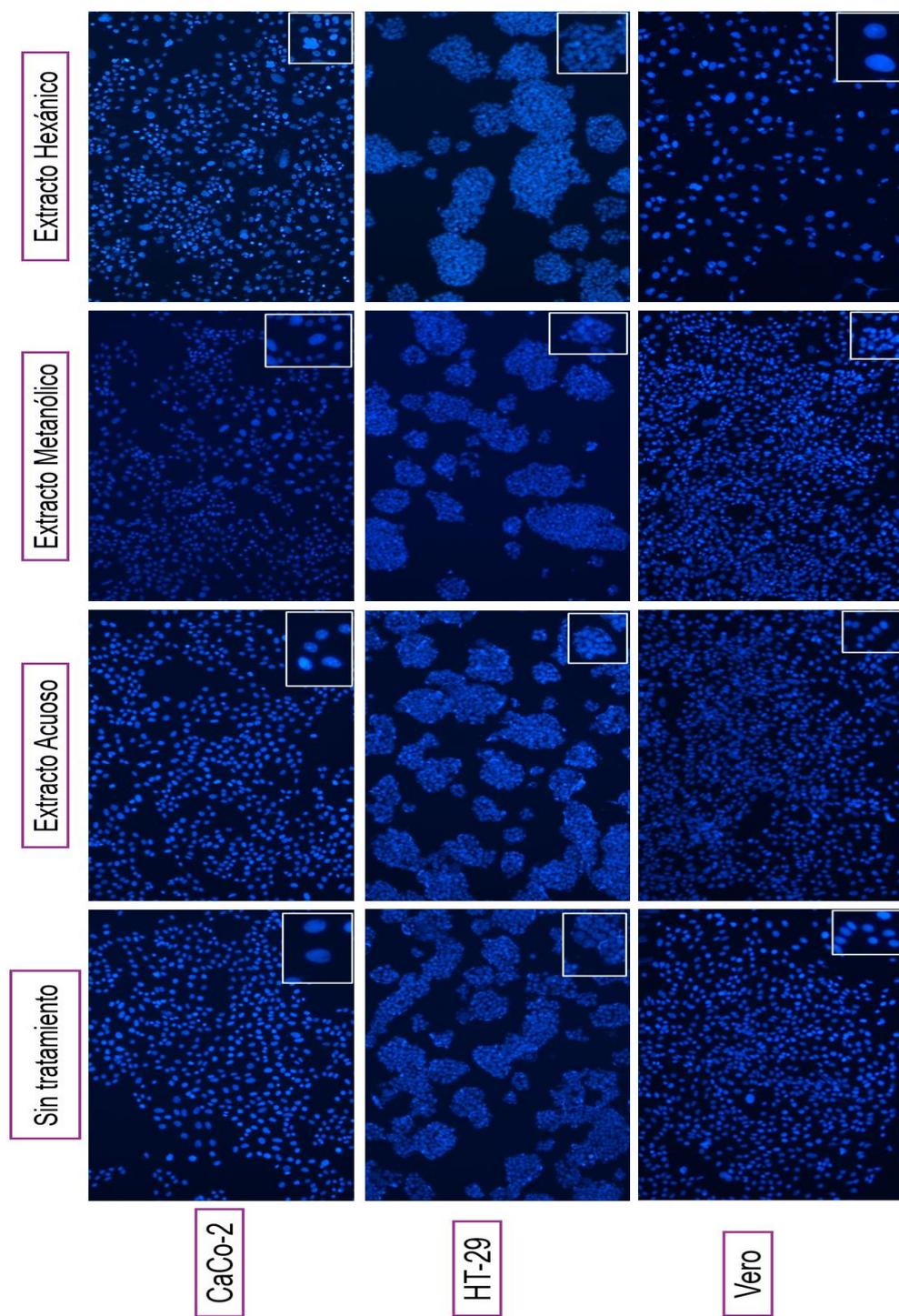


Figura 15. Líneas celulares expuestas a bajas concentraciones (10 µg/mL) de los extractos de *A. monostachya* durante 48 horas. Se muestran cultivos de células que no han sido expuestas a los extractos, y células que fueron expuestas al EA, EM y EH.

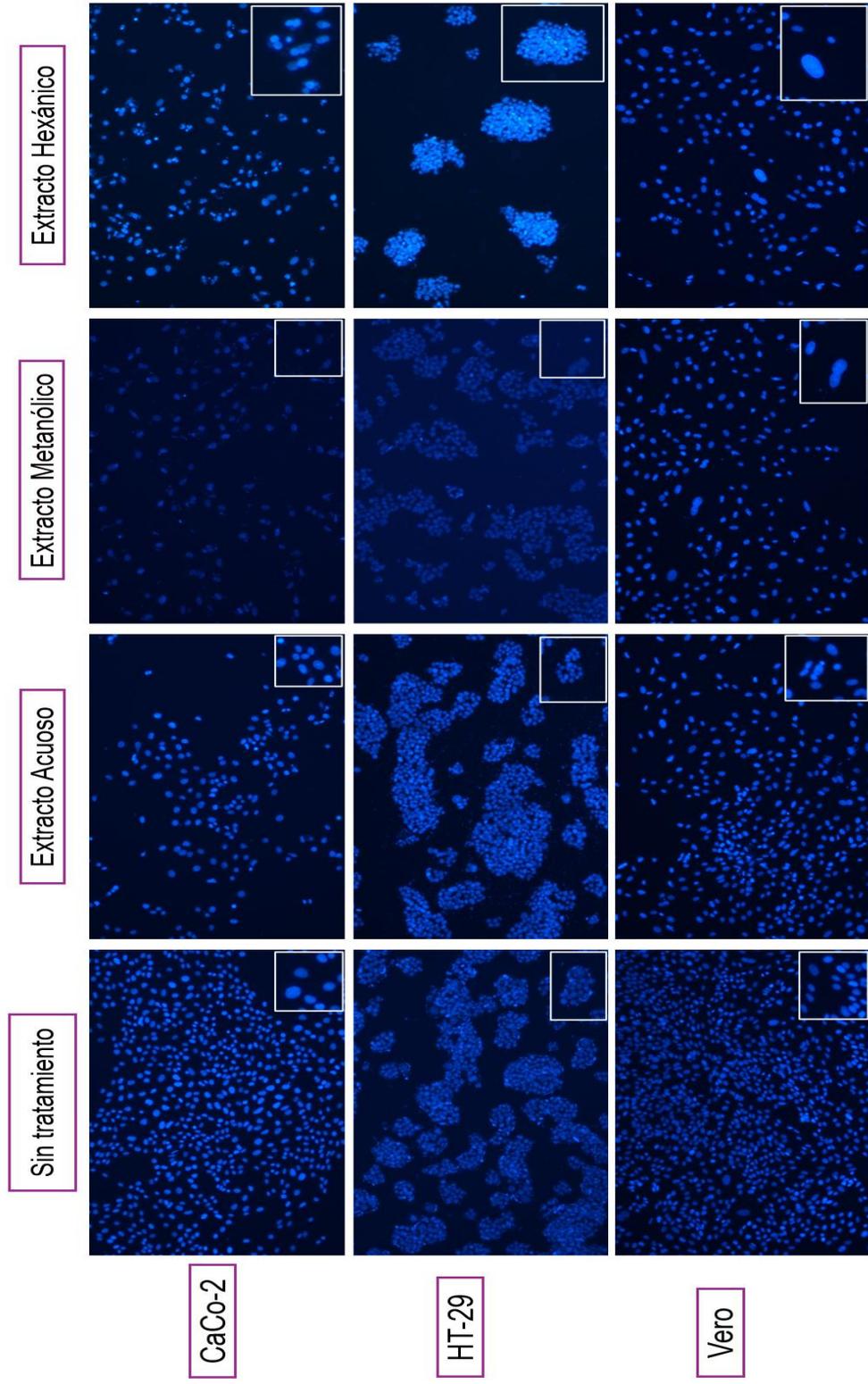


Figura 16. Líneas celulares expuestas a bajas concentraciones (300 µg/mL) de los extractos de *A. monstachya* durante 48 horas. Se muestran cultivos de células que no han sido expuestas a los extractos, y células que fueron expuestas al EA, EM y EH.

Esto nos permitió posteriormente confirmar que el EH corresponde al de mayor efecto citotóxico en comparación con el EA y EM.

La figura 17 muestra que la línea tumoral que mostró una mayor susceptibilidad corresponde a la línea CaCo-2, seguido de la línea HT-29. La concentración más efectiva nuevamente se confirma a 100 $\mu\text{g/mL}$, para la línea CaCo-2 y de 300 $\mu\text{g/mL}$ para la línea HT-29 así como para la línea Vero.

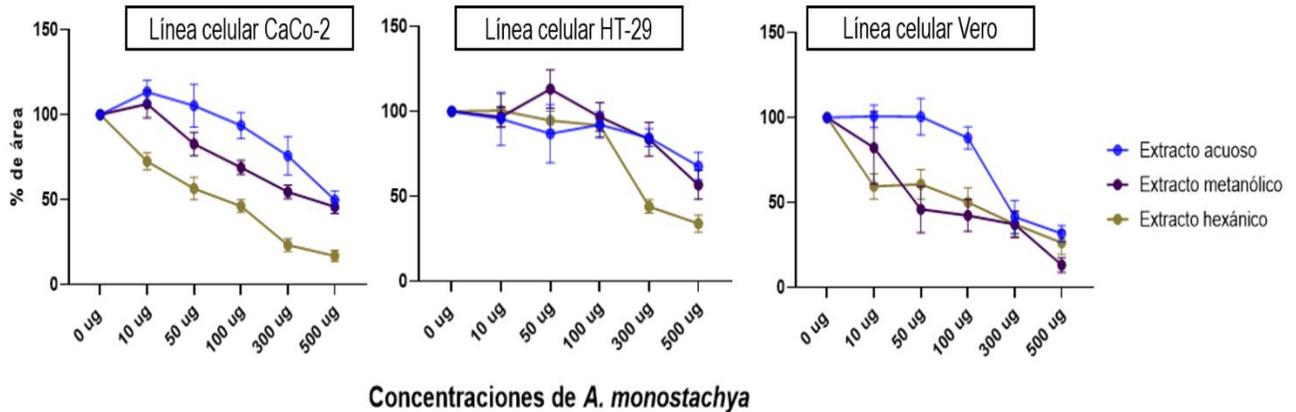


Figura 17. Determinación del extracto de mayor efecto biológico a 24 horas de exposición. Las gráficas muestran la respuesta de los cambios en el porcentaje de núcleos teñidos con DAPI de las líneas celulares conforme fueron administrados los tratamientos del EA, EM y EH sobre las líneas celulares.

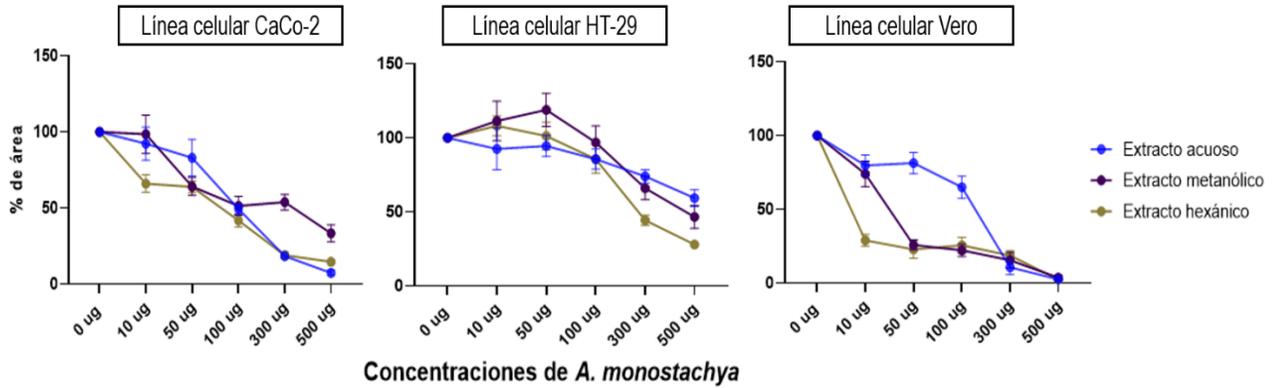


Figura 18. Determinación del extracto de mayor efecto biológico a 48 horas de exposición. Las gráficas muestran la respuesta de los cambios en el porcentaje de núcleos teñidos con DAPI de las líneas celulares conforme fueron administrados los tratamientos del EA, EM y EH sobre las líneas celulares.

En referencia a otros dos extractos empleados, EA y EM, las concentraciones más efectivas para la línea CaCo-2 fueron de 300 µg/mL. .

6.5 Análisis del tipo de muerte celular inducido por el extracto de *A. monostachya* de mayor efecto citotóxico *in vitro*.

Demostrado el efecto citotóxico que presentaron los extractos de *A. monostachya* y una vez determinado cuál de los tres extractos mostró el mejor efecto sobre las líneas tumorales, además de definir la línea más susceptible y el efecto sobre la línea no tumoral, se empleó un kit que permite identificar el tipo de muerte inducido por el extracto de *A. monostachya*. El kit emplea 3 moléculas diferentes: Calceina (fluorescencia azul) la cual es metabolizada en el citoplasma de las células viables, Apoxin-Green (fluorescencia verde) que tiene unión con la fosfatidilserina, elemento que naturalmente se encuentra en la cara interna de la membrana citoplasmática y que se transloca hacia la cara externa de la membrana citoplasmática cuando hay inducción de daño para apoptosis y 7-Amino-Actinomicina-D (fluorescencia roja) (7-AAD), que tiene una unión con el material genético y ayuda con la detección de células en necrosis. Al analizar los resultados en microscopia de fluorescencia se presenta una fluorescencia naranja, que corresponde al traslape del verde y rojo, esto indica la señal de detección de apoptosis tardía. Para demostrar esto se empleó la concentración de 100 µg/mL del EM, así mismo con el fin de relacionar el tipo de muerte que puede inducir el EA y el EM también se empleó la concentración de 300 µg/mL de estos dos extractos. Esta prueba se realizó sobre las tres líneas celulares empleadas.

Los resultados obtenidos muestran que la concentración de 300 µg/mL tanto del EA y el EM en la línea celular CaCo-2 inducen un mayor efecto de apoptosis en etapa tardía. La figura 19 muestra que la línea CaCo-2 tratado con el EA, y el EM, hay co-localización de los marcadores de fluorescencia que indican una tonalidad naranja, esto

nos indica que hay un proceso de apoptosis y una permeabilización de la célula, indicando un proceso de apoptosis tardía principalmente. También se observó la señalización única para la detección de apoptosis temprana. Sin embargo, la línea celular CaCo-2 expuesta a 100 µg/mL mostró un efecto totalmente diferente, comprado con los otros dos extractos. En este extracto la inducción mayoritaria del proceso de muerte es apoptosis en etapa tardía, no obstante, también hubo una inducción del proceso de necrosis. En este caso se observa que las células CaCo-2 se dilatan permitiendo la co-localización entre el marcador azul (viabilidad) y el marcador rojo (necrosis), colocándola como el segundo proceso de inducción de muerte en esta línea celular con el EH a la concentración de 100 µg/mL.

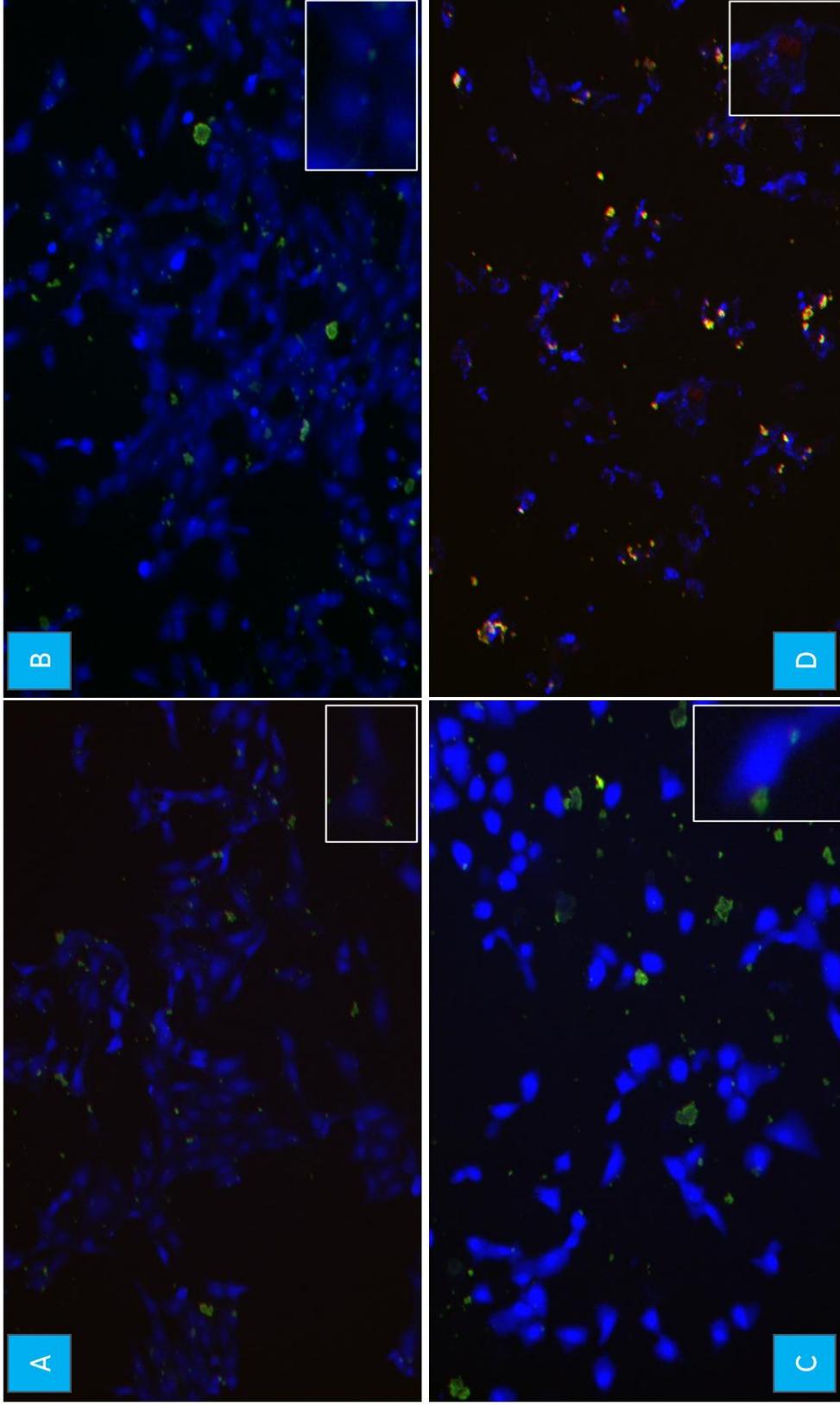


Figura 19. Detección del tipo de muerte inducida por las concentraciones más efectivas de los extractos de *A. monostachya* sobre la línea CaCo-2 a 24 horas. A) Sin tratamientos. B) EA 300 µg/mL, C) EM 300 µg/mL, D) EH 100 µg/mL. Se muestran recuadros con los fenómenos observados en las células.

La figura 20 muestra la respuesta de la línea celular HT-29 observando una respuesta nula en el efecto de la co-localización entre los marcadores de muerte empleados. Esto sugiere que la línea HT-29 no responde a las concentraciones empleadas.

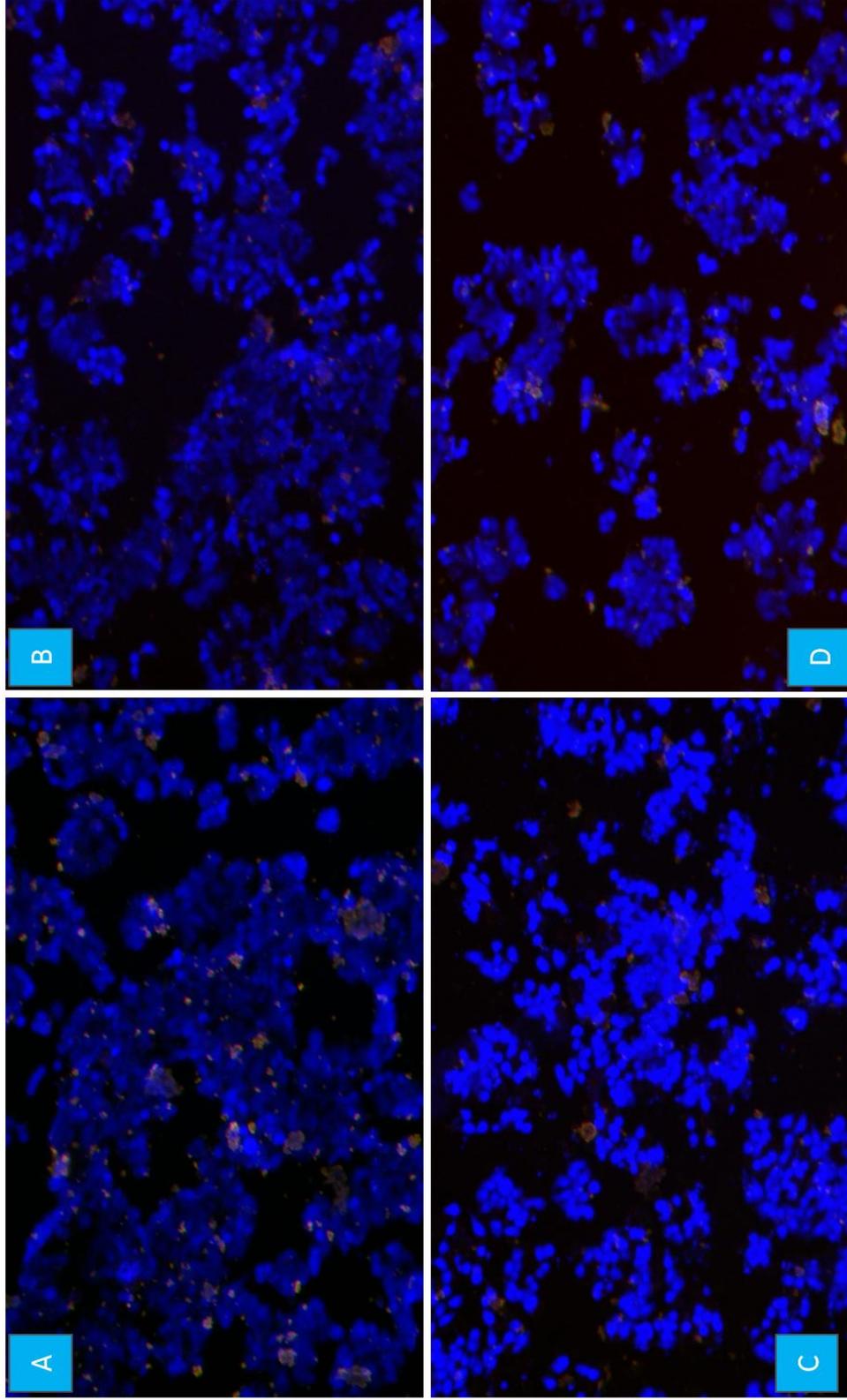


Figura 20. Detección del tipo de muerte inducida por las concentraciones más efectivas de los extractos de *A. monostachya* sobre la línea HT-29 a 24 horas. A) Sin tratamientos. B) EA 300 µg/mL, C) EM 300 µg/mL, D) EH

En referencia a la línea celular Vero expuestas a las concentraciones de mayor efecto, podemos observar como el EA y EM tienen el potencial de inducir mayor apoptosis, en etapa temprana, tal como se observa en la figura 21. Sin embargo, podemos observar cómo al emplear el EH la inducción de apoptosis disminuye en comparación con los otros dos extractos empleados.

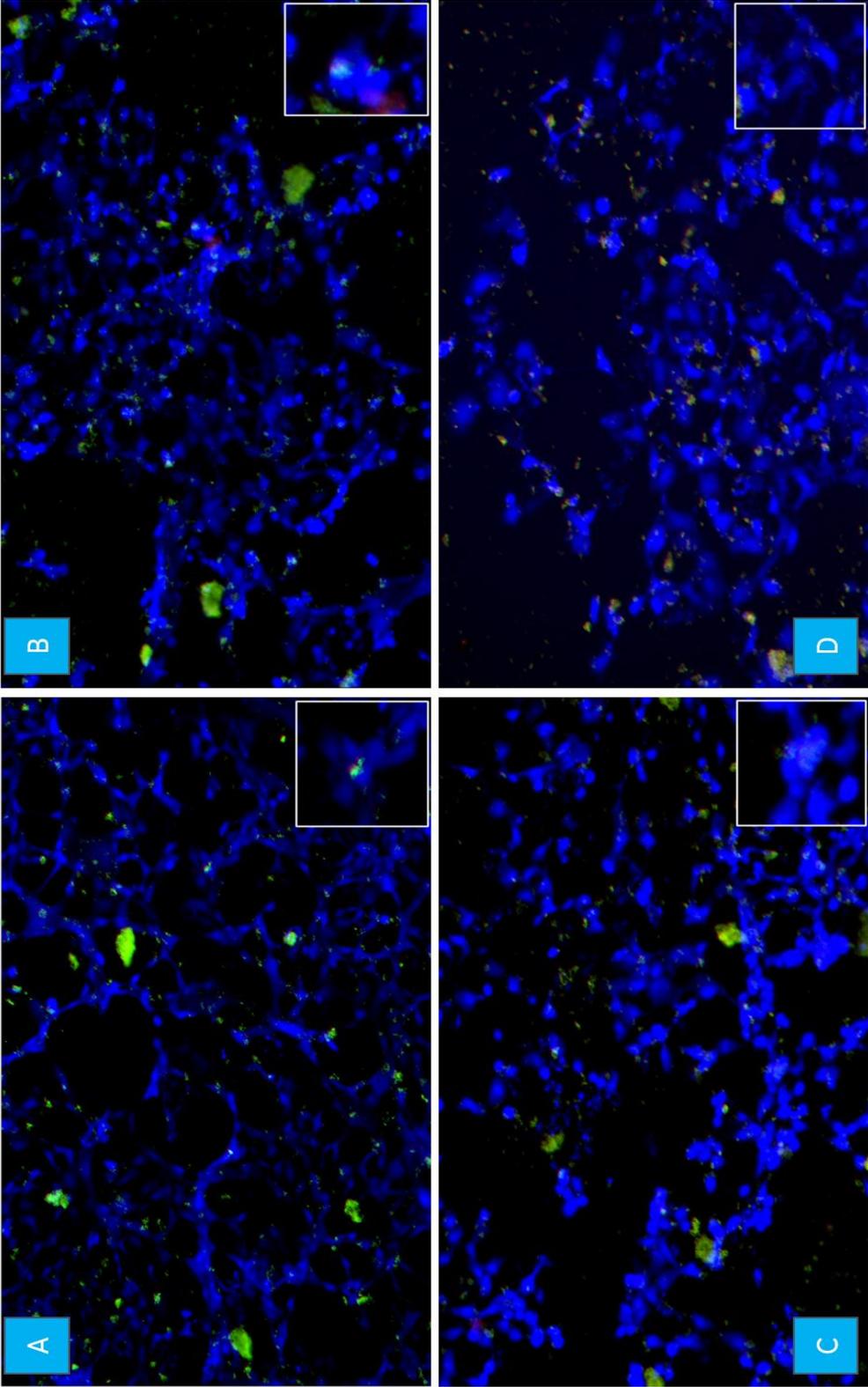
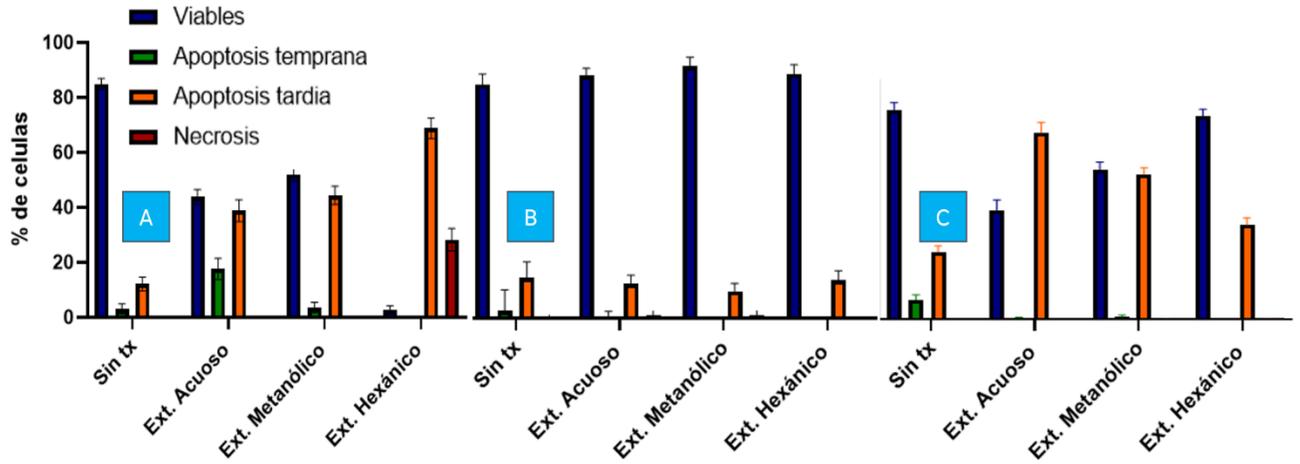


Figura 21. Detección del tipo de muerte inducida por las concentraciones más efectivas de los extractos de *A. monostachya* sobre la línea Vero a 24 horas. A) Sin tratamientos. B) EA 300 µg/mL, C) EM 300 µg/mL, D) EH 100 µg/mL. Se muestran recuadros con los fenómenos observados en las células.



Concentraciones de *A. monostachya* de mayor efecto biológico

Figura 22. Determinación del tipo de muerte inducido por los extractos de *A. monostachya*. A) Línea celular CaCo-2. B) Línea celular HT-29. C) Línea celular Vero.

8. DISCUSIÓN

Los metabolitos secundarios son generados a partir de cambios bioquímicos en los metabolitos primarios. Estos metabolitos secundarios no son necesarios para la supervivencia de la planta como tal, sin embargo, estos responden a los estímulos externos, como la temperatura, el tipo de tierra, estrés hídrico, etc., a su vez estos metabolitos secundarios se acumulan en regiones específicas de la planta según la necesidad de adaptación que tenga, por lo cual, la relación de la presencia de metabolitos secundarios cambia según el tejido a emplear (hoja, raíz, tallos, etc.) (Ortiz-Mendoza et al., 2023; Zlatić et al., 2019). Diversas investigaciones han determinado que estos metabolitos secundarios presentan efectos bioactivos sobre la salud humana, por tal motivo han ido cobrando relevancia en los últimos años, ya que mediante estudios *in vitro* e *in vivo* se han determinado que algunos metabolitos secundarios presentan un potencial terapéutico como antioxidantes, antibacterianos y anticancerígenos (Delgado-Gonzalez et al., 2023; Ryu et al., 2023; Jiménez-González et al., 2024). Estos efectos se han reportado en múltiples familias de plantas, uno de ellos pertenecientes a la familia *Euphorbiaceae*, de la cual se han reportado un amplio uso de plantas pertenecientes a esta familia en la medicina tradicional (Jiménez-González et al., 2024). *Acalypha monostachya* es una planta que pertenece a esta familia de plantas y que ha sido ampliamente usada en la medicina tradicional de México. En la búsqueda de compuestos químicos pertenecientes a familias de metabolitos secundarios, nuestros resultados de la caracterización parcial fitoquímica del EA, EM y EH mostraron una relación parcial con lo reportado por Guillén-Meléndez (2021), ya que en nuestros resultados no se identificaron compuestos con insaturaciones, grupos carbonilos, carbohidratos, lactonas, entre otros, sin embargo

Guillén-Meléndez (2021) demostró la presencia de carbohidratos, grupos carbonilos, instauraciones y lactonas. Estas diferencias pueden deberse al tiempo de colecta diferentes y las condiciones ambientales de los años de colecta, ya que se ha demostrado como estos cambios ambientales pueden afectar la síntesis de metabolitos secundarios, además algunas caracterizaciones moleculares muestran que las plantas tienen el potencial de responder de forma genética cambiando la expresión de enzimas metabólicas que intervienen en la síntesis de estos metabolitos secundarios aumentando o disminuyendo la presencia de algunos de estos (Docimo et al., 2024; Ortiz-Mendoza et al., 2023; Ryu et al., 2023).

En relación con los metabolitos secundarios, podemos destacar la presencia de flavonoides, alcaloides, oxidrilos fenólicos, esteroides y terpenos, etc., los cuales pudiesen estar involucrados en un potencial biológico citotóxico, ya que algunos de estos compuestos pertenecientes a estas familias de metabolitos secundarios han sido estudiados y han mostrado diversos efectos antioxidantes, anticancerígenos y antiinflamatorios en plantas pertenecientes a la familia *Euforbiáceas* (Aiello et al., 2019; Islam et al., 2022; Jiménez-González et al., 2024).

En otras especies del género *Acalypha* también se han encontrado metabolitos secundarios relacionados con efectos biológicos, sobre todo la presencia de flavonoides, alcaloides, carbohidratos y saponinas (Guillén-Meléndez, 2021). La fracción etanólica de *A. fimbriata* Schumach. & Thonn., mostró la presencia de saponinas, taninos, flavonoides y glúcidos o bien *A. fruticosa* Forssk., de la cual la fracción acuosa ha mostrado la presencia de alcaloides, carbohidratos, fitoesteroles, saponinas, gomas y mucilagos. De igual forma la fracción acuosa y metanólica de *A. hispida* Burm.f., ha mostrado la

presencia de fenoles, flavonoides, glúcidos, esteroides, saponinas e hidroxiantraquinonas. Otro ejemplo es *A lanceolata* Willd., de la cual la fracción metanólica mostró abundantes alcaloides, mientras que el extracto generado de *A manniana* Müll.Arg., mostró una alta presencia de alcaloides, fenoles, flavonoides, antraquinonas, antocianinas, taninos y esteroides (Seebaluck et al., 2015). Estos metabolitos le confieren un potencial biológico a la mayoría de las especies del género *Acalypha* y este efecto también depende del solvente empleado y de la parte de la planta que será empleada.

La observación morfológica de las líneas CaCo-2, HT-29 y Vero, posterior a la administración de los tratamientos de los tratamientos mostraron alteraciones morfológicas. La línea CaCo-2 expuesta a 24 horas a los EA y EM mostró alteraciones morfológicas por encima de 100 µg/mL, en donde va cambiando la morfología celular, pérdida la adherencia al sustrato y cambio a una forma más esférica, estos cambios están relacionados con una inducción de apoptosis (Raffray & Cohen, 1997; Soto Dominguez Adolfo, 2005). Sin embargo, este proceso de alteración celular sobre la línea CaCo-2 fue observado incluso a bajas concentraciones del EH a 24 horas, mismo que fue aumentando conforme las concentraciones empleadas eran más altas, 500 µg/mL, en este estudio observamos que la morfología celular se altera totalmente, perdiendo incluso la monocapa. En la línea HT-29 se observó que a altas concentraciones de los tres extractos administrados durante 24 horas comienza a presentarse un proceso de alteración celular, relacionado con un proceso de muerte. La línea Vero mostró una mayor alteración de la morfología celular en presencia del EA y EM, por encima de la concentración de 100 µg/mL, al ser expuesto al HE, la alteración morfológica se presenta en concentraciones por encima de 300 µg/mL, sin embargo, pese a presentar una susceptibilidad al EH a altas

concentraciones una porción de la monocapa permanece. Estos efectos fueron observados con similitud a los tratamientos expuestos a 48 horas, sin embargo, la línea Vero a 48 horas tratadas con EA y EM, mostró una mayor alteración morfológica a concentraciones bajas. Estos resultados muestran que los tres extractos empleados son capaces de inducir alteraciones morfológicas sugestivas a procesos de muerte celular.

Empleando la prueba del MTT se determinó la reducción de la viabilidad celular en los tres cultivos empleados. Nuestros resultados muestran que los tres extractos afectan la viabilidad celular de las líneas celulares tumorales, lo cual muestra una relación con lo reportado por (Guillén-Meléndez, 2021), ya que los extractos de *A. monostachya* en investigaciones previas mostraron un efecto citotóxico por sobre la línea de cáncer de mamá triple negativo *MDA-MB-231* y la línea de cáncer cervicouterino *HeLa*. En este mismo estudio Guillén Meléndez describe un mayor efecto a concentraciones bajas del EH sobre las líneas tumorales sin causar un efecto citotóxico en la línea celular Vero a bajas concentraciones, siendo la exposición a 24 horas la que presentó una respuesta favorable en comparación con la exposición a 48 horas. Mientras que el EA y el EM mostraron un efecto solo a concentraciones más elevadas (Guillén Meléndez et al. 2021). Estos resultados se lograron relacionar a lo observado en la tinción nuclear DAPI de nuestro estudio, donde vemos que, de los tres tratamientos administrados, el EH reduce más la presencia de núcleos por área de campo analizado. Este mismo extracto además causa cambios morfológicos relacionados con procesos de muerte como la inducción por apoptosis: condensación de la cromatina dando como resultado una intensidad en la fluorescencia y una reducción en el tamaño del núcleo hasta el fenómeno de la picnosis, el cual sería un indicativo de apoptosis (Rello et al., 2005; Ziegler & Groscurth, 2004).

Comprando las tres líneas celulares empleadas podemos observar como la línea tumoral CaCo-2 fue más susceptible a los extractos empleados, sin embargo, destacando que a bajas concentraciones del EH se observó una mayor respuesta de citotoxicidad en comparación con la línea Vero, la cual a bajas concentraciones del EH no parece ser afectada. Estos resultados correlacionan con lo descrito para el EH sobre células no tumorales a bajas concentraciones (Guillén Meléndez, 2021), no obstante, la línea HT-29 no mostró una disminución de la viabilidad celular, solo hubo una respuesta a concentraciones superiores de 300 µg/mL en todos los extractos.

Por otra parte, nuestros resultados concuerdan con diversas investigaciones que han mostrado que otras especies del género *Acalypha* tienen el potencial de reducir la viabilidad de las células tumorales, tal es el caso de EM de *A. indica* que tiene el potencial de reducir la viabilidad de células de cáncer oral, MCF7 y células PC3 empleando la misma metodología del MTT (Chekuri et al., 2023). El EM de *A. fruticosa* Forssk, otra especie del género *Acalypha*, de partes aéreas presentó un efecto citotóxico contra las líneas MCF7, HCT-116 y HepG-2 a concentraciones bajas. Por otro lado una fracción hexánica de *A. indica* L., mostró un efecto citotóxico contra la línea MCF-7 (Jiménez-González et al., 2024), así como la fracción de acetato de etilo de *A. wilkesiana* que en conjunto con α -tocoferol mostró un efecto citotóxico contra U87MG (células humanas de glioblastoma grado IV), A549 (células de cáncer de pulmón) y un efecto no citotóxico sobre líneas no cancerosas MRC5 (fibroblastos de pulmón humano) (Seebaluck et al., 2015). Esto resalta una posible alternativa que tiene el uso de los extractos naturales que, al ser administrados en conjunto con otros agentes quimioterapéuticos, favorecen la respuesta de los tratamientos.

Por otro lado la línea HT-29 no fue afectada por los extractos empleados a bajas concentraciones, sin embargo, en otras investigaciones esta línea ha mostrado sensibilidad ante EA y EM, e incluso en extractos empleando otros solventes polares, posiblemente debió a la presencia de otros metabolitos secundarios que generen una mayor susceptibilidad (Jiménez-González et al., 2024). Estos resultados muestran como los extractos, sobre todo el EH, son capaces de inducir muerte celular sobre las líneas tumorales, por lo cual se determinó que tipo de muerte era inducido en las líneas tumorales expuestas.

La apoptosis ha sido investigada por muchos años y se ha determinado como el tipo de muerte celular más deseado en quimioterapia (Lin et al., 2016), debido a que es un proceso de muerte controlado por lo cual la posibilidad de causar algunos otros efectos es casi nula (Elmore, 2007; Rello et al., 2005). Nuestros resultados muestran que el proceso de muerte que más se induce en la línea tumoral CaCo-2 por los extractos de *A. monostachya*, a concentraciones más efectivas, es la apoptosis en etapas tardías. El EH, empleados a concentraciones de 100 µg/mL, fue capaz de inducir no solo apoptosis, sino necrosis, estos resultados indican que los componentes presentes en el EH son capaces de inducir ambos procesos sobre la línea CaCo-2 aunque parezcan eventos excluyentes. La línea Vero mostró un mayor efecto citotóxico e inducción de apoptosis a altas concentraciones del EM y EA, sin embargo, este año se reduce drásticamente al emplear el EH en comparación con la línea CaCo-2. La inducción de apoptosis observada por el EA, EM y EH se relaciona con los efectos y alteraciones descritas por Guillén-Meléndez, (2021), quien reportó cambios morfológicos sobre las líneas tumorales MDA-MB-231 y HeLa al realizar cortes semifinos, estos cambios morfológicos principalmente fueron

asociados a la inducción de apoptosis.

Así mismo nuestros resultados se correlacionan con otras investigaciones de plantas del género *Acalypha* que son capaces de inducir el proceso de apoptosis, tal es el caso de la quercetina aislada de un extracto de *A. inidica*, la cual mostró la inducción de apoptosis sobre las líneas MCF-7 y MDA-MB-231 (Chekuri et al., 2023). De igual forma diversas investigaciones han mostrado que otros compuestos aislados de tejidos vegetales tienen este efecto de inducción de apoptosis (Jiménez-González et al., 2024; Miguel Guamán-Ortiz et al., 2017).

Notablemente el EH no solo mostró una inducción de apoptosis, en etapa tardía, sino también una inducción de necrosis en la línea CaCo-2. Estos resultados de igual forma se asocian con lo observado por Guillén-Meléndez, (2021), que describe que a nivel de cortes semifinos se apreciaron alteraciones morfológicas no solo asociadas a apoptosis, sino también a necrosis. Aunque pareciera que la apoptosis y necrosis son vías totalmente diferentes, algunas investigaciones han mostrado como algunos productos naturales, fármacos o demás, tienen el potencial de inducir más de un proceso de muerte en las líneas celulares administradas. Las investigaciones realizadas por Chen et al., (2023) mostraron que algunos derivados de chalconas, inicialmente aisladas de *Psoralea corylifolia* L son capaces de inducir en la línea H1975 (cáncer de pulmón de células no pequeñas) tanto el proceso de apoptosis como el proceso de necroptosis, proceso similar a la necrosis. Las investigaciones realizadas por Lin et al., (2016) muestran que al administrar tanshionina IIA, un compuesto derivado de *Salvia miltiorrhiza*, se induce tanto la apoptosis como la necroptosis. Este fenómeno se debe a que los compuestos pueden interactuar con los receptores de las células estimulando o no algunas vías que encienden los procesos de

muerte (Raffray & Cohen, 1997; Soto-Domínguez et al., 2023). Estos resultados sugieren que el EH presenta compuestos que son capaces de inducir ambos procesos en la línea CaCo-2, a diferencia del EA y el EM.

9. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indican que los extractos obtenidos de *A. monostachya* ejercen un efecto citotóxico sobre las líneas tumorales CaCo-2 y HT-29, sin afectar a la línea no tumoral Vero. La línea CaCo-2 fue la más susceptible a los extractos principalmente al EH, el cual mostró ser el de mayor efecto citotóxico a bajas concentraciones. En cuanto al mecanismo de muerte los extractos de *A. monostachya* mostraron inducir principalmente apoptosis, en etapas tardías para los tiempos y las concentraciones empleadas, no obstante, el EH mostró inducir simultáneamente apoptosis y necrosis sobre la línea CaCo-2.

10. PERSPECTIVAS

- 1.- Fraccionar el EH para determinar cuál fracción ejerce un mejor efecto citotóxico por sobre las líneas tumorales.
- 2.- Indagar sobre los intermediarios de la vía de apoptosis y necrosis para determinar cuál es la ruta de activación.
- 3.- Desarrollar un modelo *in vivo* que nos permita determinar cómo se comporta el EH y sus posibles fracciones.
- 4.- Desarrollar un nano vector con el fin de hacer una entrega más selectiva.
- 5.- Desarrollar un modelo *in vivo* que nos permita determinar cómo se comporta el EH dentro de un nano vector.

11. REFERENCIAS:

Aiello, P., Sharghi, M., Mansourkhani, S. M., Ardekan, A. P., Jouybari, L., Daraei, N., Peiro, K., Mohamadian, S., Rezaei, M., Heidari, M., Peluso, I., Ghorat, F., Bishayee, A., & Kooti, W. (2019). Medicinal plants in the prevention and treatment of colon cancer. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/2075614>

Alexandru Ionescu, V., Gheorghe, G., Bacalbasa, N., Laurentiu Chiototoiu, A., & Diaconu, C. (2023). Colorectal Cancer: From Risk Factors to Oncogenesis. *Medicina (Lithuania)*, 59(9), 1946. <https://doi.org/10.3390/medicina59091646>

Beltran-Ontiveros, S. A., Contreras-Gutierrez, J. A., Lizarraga-Verdugo, E., Gutierrez-Grijalva, E. P., Lopez-Lopez, K., Lora-Fierro, E. H., Trujillo-Rojas, M. A., Moreno-Ortiz, J. M., Cardoso-Angulo, D. L., Leal-Leon, E., Zatarain-Lopez, J. R., Cuen-Diaz, H. M., Montoya-Moreno, M., Arce-Bojorquez, B., Rochin-Teran, J. L., Cuen-Lazcano, D. E., Contreras-Rodriguez, V. A., Lascurain, R., Carmona-Aparicio, L., ... Diaz, D. (2024). National Burden and Trends for 29 Groups of Cancer in Mexico from 1990 to 2019: A Secondary Analysis of the Global Burden of Disease Study 2019. *Cancers*, 16(1). <https://doi.org/10.3390/cancers16010149>

Chekuri, S., Vyshnava, S. S., Somiseti, S. L., Cheniya, S. B. K., Gandu, C., & Anupalli, R. R. (2023). Isolation and anticancer activity of quercetin from *Acalypha indica* L. against breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231. *3 Biotech*, 13(8). <https://doi.org/10.1007/s13205-023-03705-w>

Chen, J., Zhao, L., Xu, M. F., Huang, D., Sun, X. L., Zhang, Y. X., Li, H. M., & Wu, C. Z. (2023). Novel isobavachalcone derivatives induce apoptosis and necroptosis in human non-small cell lung cancer H1975 cells. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 39(1). <https://doi.org/10.1080/14756366.2023.2292006>

Dekker, E., Tanis, P. J., Vleugels, J. L. A., Kasi, P. M., & Wallace, M. B. (2019). Colorectal cancer. *Lancet*, 394, 1467–1479. www.thelancet.com

Delgado-Gonzalez, P., Garza-Treviño, E. N., de la Garza Kalife, D. A., Quiroz Reyes, A., & Hernández-Tobías, E. A. (2023). Bioactive Compounds of Dietary Origin and Their Influence on Colorectal Cancer as Chemoprevention. In *Life* (Vol. 13, Issue 10). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/life13101977>

Docimo, T., Celano, R., Lambiase, A., Di Sanzo, R., Serio, S., Santoro, V., Coccetti, P., Russo, M., Rastrelli, L., & Piccinelli, A. L. (2024). Exploring Influence of

- Ryu, D. H., Cho, J. Y., Yang, S. H., & Kim, H. Y. (2023). Effects of Harvest Timing on Phytochemical Composition in Lamiaceae Plants under an Environment-Controlled System. *Antioxidants*, 12(11).
<https://doi.org/10.3390/antiox12111909>
- Salazar-Gómez, A., & Alonso-Castro, A. J. (2022). Medicinal Plants from Latin America with Wound Healing Activity: Ethnomedicine, Phytochemistry, Preclinical and Clinical Studies—A Review. In *Pharmaceuticals* (Vol. 15, Issue 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ph15091095>
- Seebaluck, R., Gurib-Fakim, A., & Mahomoodally, F. (2015). Medicinal plants from the genus *Acalypha* (Euphorbiaceae)-A review of their ethnopharmacology and phytochemistry. In *Journal of Ethnopharmacology* (Vol. 159, pp. 137–157). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.10.040>
- Shah, S. C., & Itzkowitz, S. H. (2022). Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease: Mechanisms and Management. In *Gastroenterology* (Vol. 162, Issue 3, pp. 715-730.e3). W.B. Saunders.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.10.035>
- Shakya, A. K., & Naik, R. R. (2022). The Chemotherapeutic Potentials of Compounds Isolated from the Plant, Marine, Fungus, and Microorganism: Their Mechanism of Action and Prospects. *Journal of Tropical Medicine*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/5919453>
- Shin, A. E., Giancotti, F. G., & Rustgi, A. K. (2023). Metastatic colorectal cancer: mechanisms and emerging therapeutics. In *Trends in Pharmacological Sciences* (Vol. 44, Issue 4, pp. 222–236). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2023.01.003>
- Soto Dominguez Adolfo. (2005). *Evaluación morfológica y bioquímica de la presencia de apoptosis en varios órganos del ratón tratado con una dosis toxica de peroxisomicina A1*. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Swanson, S. K., Mento, S. J., Weeks-Levy, C., Brock, B. D., Kowal, K. J., Wallace, R. E., Ritcbey~, M. B., & Cano, F. R. (1988). Characterization of Vero cells, *Journal of Biological Standardization*, 16, 3–4.
- Thanikachalam, K., & Khan, G. (2019). Colorectal cancer and nutrition. In *Nutrients*

- Aiello, P., Sharghi, M., Mansourkhani, S. M., Ardekan, A. P., Jouybari, L., Daraei, N., Peiro, K., Mohamadian, S., Rezaei, M., Heidari, M., Peluso, I., Ghorat, F., Bishayee, A., & Kooti, W. (2019). Medicinal plants in the prevention and treatment of colon cancer. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/2075614>
- Alexandru Ionescu, V., Gheorghe, G., Bacalbasa, N., Laurentiu Chiototoiu, A., & Diaconu, C. (2023). Colorectal Cancer: From Risk Factors to Oncogenesis. *Medicina (Lithuania)*, 59(9), 1946. <https://doi.org/10.3390/medicina59091646>
- Beltran-Ontiveros, S. A., Contreras-Gutierrez, J. A., Lizarraga-Verdugo, E., Gutierrez-Grijalva, E. P., Lopez-Lopez, K., Lora-Fierro, E. H., Trujillo-Rojas, M. A., Moreno-Ortiz, J. M., Cardoso-Angulo, D. L., Leal-Leon, E., Zatarain-Lopez, J. R., Cuen-Diaz, H. M., Montoya-Moreno, M., Arce-Bojorquez, B., Rochin-Teran, J. L., Cuen-Lazcano, D. E., Contreras-Rodriguez, V. A., Lascurain, R., Carmona-Aparicio, L., ... Diaz, D. (2024). National Burden and Trends for 29 Groups of Cancer in Mexico from 1990 to 2019: A Secondary Analysis of the Global Burden of Disease Study 2019. *Cancers*, 16(1). <https://doi.org/10.3390/cancers16010149>
- Chekuri, S., Vyshnava, S. S., Somiseti, S. L., Cheniya, S. B. K., Gandu, C., & Anupalli, R. R. (2023). Isolation and anticancer activity of quercetin from *Acalypha indica* L. against breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231. *3 Biotech*, 13(8). <https://doi.org/10.1007/s13205-023-03705-w>
- Chen, J., Zhao, L., Xu, M. F., Huang, D., Sun, X. L., Zhang, Y. X., Li, H. M., & Wu, C. Z. (2023). Novel isobavachalcone derivatives induce apoptosis and necroptosis in human non-small cell lung cancer H1975 cells. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 39(1). <https://doi.org/10.1080/14756366.2023.2292006>
- Dekker, E., Tanis, P. J., Vleugels, J. L. A., Kasi, P. M., & Wallace, M. B. (2019). Colorectal cancer. *Lancet*, 394, 1467–1479. www.thelancet.com

- Delgado-Gonzalez, P., Garza-Treviño, E. N., de la Garza Kalife, D. A., Quiroz Reyes, A., & Hernández-Tobías, E. A. (2023). Bioactive Compounds of Dietary Origin and Their Influence on Colorectal Cancer as Chemoprevention. In *Life* (Vol. 13, Issue 10). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/life13101977>
- Docimo, T., Celano, R., Lambiase, A., Di Sanzo, R., Serio, S., Santoro, V., Coccetti, P., Russo, M., Rastrelli, L., & Piccinelli, A. L. (2024). Exploring Influence of Production Area and Harvest Time on Specialized Metabolite Content of Glycyrrhiza glabra Leaves and Evaluation of Antioxidant and Anti-Aging Properties. *Antioxidants*, 13(1). <https://doi.org/10.3390/antiox13010093>
- Dougherty, M. W., & Jobin, C. (2023). Intestinal bacteria and colorectal cancer: etiology and treatment. In *Gut Microbes* (Vol. 15, Issue 1). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2185028>
- Elmore, S. (2007). *Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death*.
- Estrada-castillón, E., Villarreal-quintanilla, J. Á., & Rodríguez-salinas, M. M. (2018). Ethnobotanical survey of useflu species in Bustamante, Nuevo León, Mexico. *Human Ecology*, 46, 117–132.
- Fridlender, M., Kapulnik, Y., & Koltai, H. (2015). Plant derived substances with anti-cancer activity: From folklore to practice. *Frontiers in Plant Science*, 6(OCTOBER). <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00799>
- Gordillo, M. M., Ramírez, J. J., Durán, R. C., Arriaga, E. J., García, R., Cervantes, A., & Mejía Hernández, R. (2002). *Los géneros de la familia Euphorbiaceae en México* (Vol. 73, Issue 2).
- Greenlee, J. D., Lopez-Cavestany, M., Ortiz-Otero, N., Liu, K., Subramanian, T., Cagir, B., & King, M. R. (2021). Oxaliplatin resistance in colorectal cancer enhances trail sensitivity via death receptor 4 upregulation and lipid raft localization. *ELife*, 10, 1–30. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.67750>

- Guillén Meléndez, G. A. (2021). *Análisis del Efecto Citotóxico In Vitro de Extractos de Acalypha monostachya Sobre Líneas Celulares TumORAles Humanas*.
- Guillén-Meléndez, G. A., Villa-Cedillo, S. A., Pérez-Hernández, R. A., Castillo-Velázquez, U., Salas-Treviño, D., Saucedo-Cárdenas, O., Montes-De-oca-luna, R., Gómez-Tristán, C. A., Garza-Arredondo, A. J., Zamora-ávila, D. E., Loera-Arias, M. de J., & Soto-Domínguez, A. (2021). Cytotoxic effect in vitro of acalypha monostachya extracts over human tumor cell lines. *Plants*, *10*(11), 1–23. <https://doi.org/10.3390/plants10112326>
- Guo, X., Li, R., Cui, J., Hu, C., Yu, H., Ren, L., Cheng, Y., Jiang, J., Ding, X., & Wang, L. (2023). Induction of RIPK3/MLKL-mediated necroptosis by Erigeron breviscapus injection exhibits potent antitumor effect. *Frontiers in Pharmacology*, *14*(June), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1219362>
- Islam, M. R., Akash, S., Rahman, M. M., Nowrin, F. T., Akter, T., Shohag, S., Rauf, A., Aljohani, A. S. M., & Simal-Gandara, J. (2022). Colon cancer and colorectal cancer: Prevention and treatment by potential natural products. In *Chemico-Biological Interactions* (Vol. 368). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.110170>
- Jacobo-herrera, N. J., Jacobo-herrera, F. E., Alejandro, Z., Adolfo, A., Heinrich, M., & Carlos, P. (2015). Medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of colorectal cancer. *Ethnopharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.12.042>
- Jang, J. Y., Kim, D., & Kim, N. D. (2023). Recent Developments in Combination Chemotherapy for Colorectal and Breast Cancers with Topoisomerase Inhibitors. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Issue 9). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms24098457>
- Jiménez-González, V., Kowalczyk, T., Piekarski, J., Szemraj, J., Rijo, P., & Sitarek, P. (2024). Nature's Green Potential: Anticancer Properties of Plants of the

- Euphorbiaceae Family. In *Cancers* (Vol. 16, Issue 1). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/cancers16010114>
- Lea, T. (2015). Caco-2 cell line. In *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models* (pp. 103–111). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_10
- Li, J., Ma, X., Chakravarti, D., Shalapour, S., & Depinho, R. A. (2021). *Genetic and biological hallmarks of colorectal cancer*. <https://doi.org/10.1101/gad.348226>
- Lin, C. Y., Chang, T. W., Hsieh, W. H., Hung, M. C., Lin, I. H., Lai, S. C., & Tzeng, Y. J. (2016). Simultaneous induction of apoptosis and necroptosis by Tanshinone IIA in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Cell Death Discovery*, 2(1). <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2016.65>
- López, K. F. (2013). Actualizaciones en el diagnóstico y tratamiento quirúrgico de los pacientes con cáncer de colon. *Rev. Med. Clin. Condes*, 24(4), 645–653.
- Martínez-Maqueda, D., Miralles, B., & Recio, I. (2015). HT29 cell line. In *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models* (pp. 113–124). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_11
- Miguel Guamán-Ortiz, L., Isabel Ramirez Orellana, M., & Ratovitski, E. A. (2017). Natural Compounds As Modulators of Non-apoptotic Cell Death in Cancer. *Current Genomics*, 18, 132–155. <https://doi.org/10.2174/138920291766616080315>
- Noumedem, J. A., De Dieu Tamokou, J., Ngo Teke, G., Momo, R. C., Kuete, V., & Kuiate, J. R. (2013). *Phytochemical analysis, antimicrobial and radical-scavenging properties of Acalypha manniana leaves*. <http://www.springerplus.com/content/2/1/503>
- Ortiz-Mendoza, N., San Miguel-Chávez, R., Martínez-Gordillo, M. J., Basurto-Peña, F. A., Palma-Tenango, M., & Aguirre-Hernández, E. (2023). Variation in Terpenoid and Flavonoid Content in Different Samples of *Salvia semiatrata* Collected from

- Oaxaca, Mexico, and Its Effects on Antinociceptive Activity. *Metabolites*, 13(7). <https://doi.org/10.3390/metabo13070866>
- Otsu, S., & Hironaka, S. (2023). Current Status of Angiogenesis Inhibitors as Second-Line Current Status of Angiogenesis Inhibitors as Second-line Treatment for Unresectable Colorectal Cancer. *Preprints.Org*. <https://doi.org/10.20944/preprints202308.1044.v1>
- Raffray, M., & Cohen, G. M. (1997). Apoptosis and Necrosis in Toxicology: A Continuum or Distinct Modes of Cell Death? In *Pharmacol. Ther* (Vol. 75, Issue I).
- Rascón-valenzuela, L., Jiménez-estrada, M., & Velázquez-contreras, C. (2015). Chemical composition and antiproliferative activity of *Acalypha californica*. *Industrial Crops & Products*, 69, 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.02.004>
- Rascón-Valenzuela, L., Jiménez-Estrada, M., Velázquez-Contreras, C., Garibay-Escobar, A., Vilegas, W., Campaner, L., Coqueiro, A., & Robles-Zepeda, R. E. (2015). Chemical composition and antiproliferative activity of *Acalypha californica*. *Industrial Crops and Products*, 69, 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.02.004>
- Rello, S., Stockert, J. C., Moreno, V., Amez, A. G., Pacheco, M., Juarranz, A., Cã, M., & Villanueva, A. (2005). Morphological criteria to distinguish cell death induced by apoptotic and necrotic treatments. In *Apoptosis* (Vol. 10). Springer Science + Business Media, Inc.
- Ríos Reyes, Á., Alanís Flores, G., & Favela Lara, S. (2017). Etnobotánica de los recursos vegetales, sus formas de uso y manejo, en Bustamante, Nuevo León. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 8(44). <https://doi.org/10.29298/rmcf.v8i44.106>
- Ryu, D. H., Cho, J. Y., Yang, S. H., & Kim, H. Y. (2023). Effects of Harvest Timing on Phytochemical Composition in Lamiaceae Plants under an Environment-Controlled System. *Antioxidants*, 12(11). <https://doi.org/10.3390/antiox12111909>

- Salazar-Gómez, A., & Alonso-Castro, A. J. (2022). Medicinal Plants from Latin America with Wound Healing Activity: Ethnomedicine, Phytochemistry, Preclinical and Clinical Studies—A Review. In *Pharmaceuticals* (Vol. 15, Issue 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ph15091095>
- Seebaluck, R., Gurib-Fakim, A., & Mahomoodally, F. (2015). Medicinal plants from the genus *Acalypha* (Euphorbiaceae)-A review of their ethnopharmacology and phytochemistry. In *Journal of Ethnopharmacology* (Vol. 159, pp. 137–157). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.10.040>
- Shah, S. C., & Itzkowitz, S. H. (2022). Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease: Mechanisms and Management. In *Gastroenterology* (Vol. 162, Issue 3, pp. 715-730.e3). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.10.035>
- Shakya, A. K., & Naik, R. R. (2022). The Chemotherapeutic Potentials of Compounds Isolated from the Plant, Marine, Fungus, and Microorganism: Their Mechanism of Action and Prospects. *Journal of Tropical Medicine*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/5919453>
- Shin, A. E., Giancotti, F. G., & Rustgi, A. K. (2023). Metastatic colorectal cancer: mechanisms and emerging therapeutics. In *Trends in Pharmacological Sciences* (Vol. 44, Issue 4, pp. 222–236). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2023.01.003>
- Soto Dominguez Adolfo. (2005). *Evaluación morfológica y bioquímica de la presencia de apoptosis en varios órganos del ratón tratado con una dosis toxica de peroxisomicina A1*. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Swanson, S. K., Mento, S. J., Weeks-Levy, C., Brock, B. D., Kowal, K. J., Wallace, R. E., Ritchey, M. B., & Cano, F. R. (1988). Characterization of Vero cells. *Journal of Biological Standardization*, 16, 3–4.
- Thanikachalam, K., & Khan, G. (2019). Colorectal cancer and nutrition. In *Nutrients* (Vol. 11, Issue 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu11010164>

- Wong, S. H., & Yu, J. (2019). Gut microbiota in colorectal cancer: mechanisms of action and clinical applications. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 16, Issue 11, pp. 690–704). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0209-8>
- Zahidin, N. S., Saidin, S., Zulkifli, R. M., Muhamad, I. I., Ya'akob, H., & Nur, H. (2017). A review of *Acalypha indica* L. (Euphorbiaceae) as traditional medicinal plant and its therapeutic potential. *Journal of Ethnopharmacology*, 207, 146–173. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.06.019>
- Zhao, W., Dai, S., Yue, L., Xu, F., Gu, J., Dai, X., & Qian, X. (2022). Emerging mechanisms progress of colorectal cancer liver metastasis. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1081585>
- Zhou, Z., Edil, B. H., & Li, M. (2023). Combination therapies for cancer: challenges and opportunities. *BMC Medicine*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12916-023-02852-4>
- Ziegler, U., & Groscurth, P. (2004). Morphological features of cell death. In *News in Physiological Sciences* (Vol. 19, Issue 3, pp. 124–128). <https://doi.org/10.1152/nips.01519.2004>
- Zlatic, N., Jakovljević, D., & Stanković, M. (2019). Temporal, plant part, and interpopulation variability of secondary metabolites and antioxidant activity of *Inula helenium* l. *Plants*, 8(6). <https://doi.org/10.3390/plants8060179>